様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：２２６０４
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｈ０３１７２

研究課題名（和文）ナノ周期構造・ナノ繊維構造を用いた幹細胞由来組織再生材料の高度化と軟骨修復

研究課題名（英文）Improvement of stem cell-derived biomaterials for tissue regeneration using nano-periodic and nano-fibrous structures and their application to cartilage repair

研究代表者

藤江　裕道（FUJIE，HIROMICHI）

首都大学東京・システムデザイン学部・教授

研究者番号：２０１９９３００

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,100,000円

研究成果の概要（和文）：フェムト秒レーザーでナノ加工した基板上でヒトおよび動物滑膜由来の間葉系幹細胞を含む細胞の培養を行って，ナノ周期構造SATを生成した．また，動物由来のコラーゲン溶液を，温度とPHを調整することにより分子間結合を促進させ，同幹細胞とともに遠心分離することで，ナノ線維構造SATを生成した．両ナノSATとも，ナノ構造やナノ線維を用いない従来のSATに比べ，コラーゲンの遺伝子発現が強く，より太いコラーゲン線維がより密に充填されていることを確認した．両ナノSATを家兎の大腿骨軟骨に移植したところ，正常軟骨構造に近い軟骨ー軟骨下骨の構造連続性が得られ，高い軟骨修復能を有することが明らかになった．

研究成果の学術的意義や社会的意義
関節軟骨は円滑な関節運動を可能とする重要な組織であるが，老化や運動により変性，損傷することが多く，その際に血液循環が乏しいため治癒しにくいという問題を有している．特に変形性関節症患者数は我が国だけで３０００万人にのぼり，その抜本的な治療法の開発が望まれている．本研究により開発された二種類のバイオマテリアルは，内部のコラーゲン線維が異方性を有するなど機能構造化されており，移植後に高い軟骨修復能を示すことから，これらの問題解決に資する材料であると考えられる．

研究成果の概要（英文）：A nano-periodic structured stem cell-based self-assembled tissue (SAT) was developed through cell culture on a surface processed by a femto-second laser. In addition, a nano-fibrous structured SAT was also created through centrifugal treatment of animal-derived collagen fibers and stem cells. Biological tests revealed that gene expression of type I collagen is significant while morphological tests revealed that they are consisted of thick and dense collagen structure in both the SATs. Animal experiments indicated that a continuous and gradual cartilage-subchondral bone structure was observed in cartilage-like tissue repaired with the STAs in chondro-defects created in rabbit femoral cartilage. It was, finally, suggested that both the SATs have enough capacity of cartilage repair.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス　組織工学　再生医療　コラーゲン　幹細胞　関節軟骨

１．研究開始当初の背景

幹細胞は，増殖能と分化能をあわせもつ細胞であり，現代の組織再生医療において最も期待が寄せられる生体由来材料である．幹細胞のなかで，体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞（MSC）は分化能が ES 細胞や iPS 細胞ほどでないものの，個体から容易に収集でき，倫理的な問題が少ないため，再生医療の現実的な切り札として注目されている．しかし，これまでの研究では以下の２つの問題が存在した．

(1) 通常の２次元培養環境は，実際の生体内環境である３次元空間とは異なるため，細胞分化や生成組織の構造・性質が制約される．

(2) 生成組織に異方性を持たせることが困難である．

本研究申請者らは，関節滑膜より採取した間葉系幹細胞を含む細胞群に細胞外基質を自己生成させ，組織修復用材料（Stem cell-based self-assembled tissue, scSAT）の開発に成功した．scSAT は幹細胞が作り出す細胞外基質で構成されるため，培養過程で３次元化することにより，前記(1)の問題を克服することが可能である．また，培養表面に異方性の高い溝構造を加工する方法により，(2)を克服することも可能である．

２．研究の目的

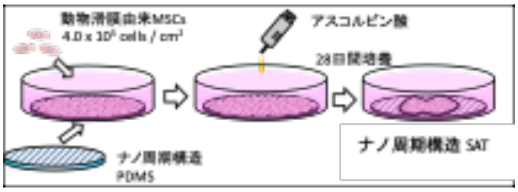
本研究では，ナノレベルの溝構造による幹細胞培養により，厚みと異方性を有するナノ周期構造　SAT を生成する．また，コラーゲン分散体を有する溶液に幹細胞を混入させ，遠心力作用によりコラーゲンと細胞を密にパックし，幹細胞による細胞外マトリクス凝集効果により組織を一体化させて，ナノ線維構造 SAT を生成する(4)．それらの SAT の特性を調べるとともに，動物実験により軟骨修復能について調べる．

３．研究の方法

(1) ナノ周期構造 SAT の生成

フェムト秒レーザー（サイバーレーザー）でナノ周期構造を生成し，その構造を転写した PDMS の培養皿で MSC 培養を行って，ナノ周期構造 SAT を開発した（図１）．

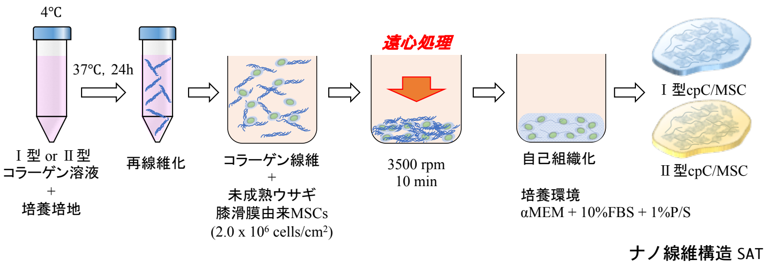
図１：ナノ周期構造 SAT の生成法



(2) ナノ線維構造 SAT の生成

動物由来のコラーゲン分散体を含む溶液に幹細胞を混入させ，遠心力作用によりコラーゲンと細胞を密に圧縮した（図２）．培養期間中にアスコルビン酸を投入して幹細胞による細胞外マトリクス凝集現象を引き起こさせ，これにより組織を一体化させて，ナノ線維構造 SAT（close-packed collagen/MSC complex, cpC/MSC）を生成した(4)．

図２：ナノ線維構造 SAT の生成法



(3) 両 SAT の特性試験

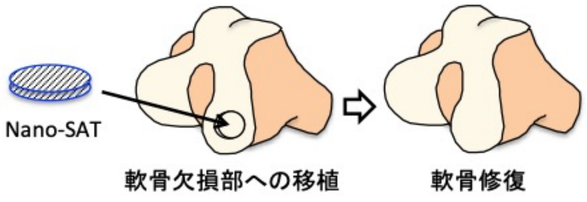
(1)と(2)で生成した SAT に対して電子顕微鏡観察および力学試験等を行なって，表面構造や線

維構造が MSC 等の分化，増殖，細胞外基質生成にあたえる影響等について調べた．

(4) 軟骨修復実験

実験動物に家兎を用いて，大腿骨部分欠損部に両 SAT を移植した（n=3〜6）（図３）．術後４週，および１２週における修復組織の形態観察（肉眼観察，組織観察）と力学特性評価（インデンテーション試験，動的粘弾性試験）を行って，修復度を評価した．

図３：ナノ周期構造 SAT およびナノ線維構造 SAT の家兎軟骨部分欠損部への移植



４．研究成果

(1) ナノ周期構造 SAT の特性

ナノ周期構造 SAT，および比較対照の通常培養皿で通常培養して生成した SAT の顕微鏡観察像を図４に示す．また，引張り試験による破断強度と接線係数を図５に示す．通常培養皿での培養では等方性を有するコラーゲン線維構造が観察されたが，ナノ周期構造 SAT では，コラーゲン線維が培養皿の溝方向に配行していた．ナノ周期構造 SAT は，通常の SAT や溝無し PDMS 上で生成した SAT に比べ，破断強度と接線係数が有意に高かった．

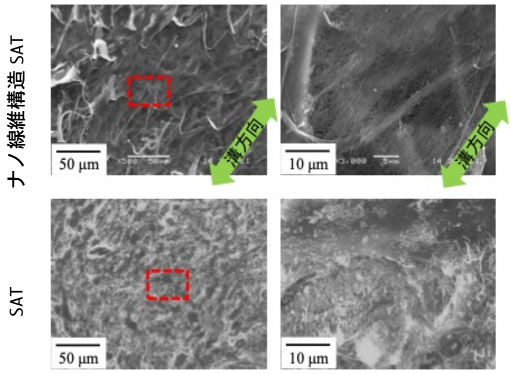


図４：ナノ周期構造 SAT の顕微鏡観察像

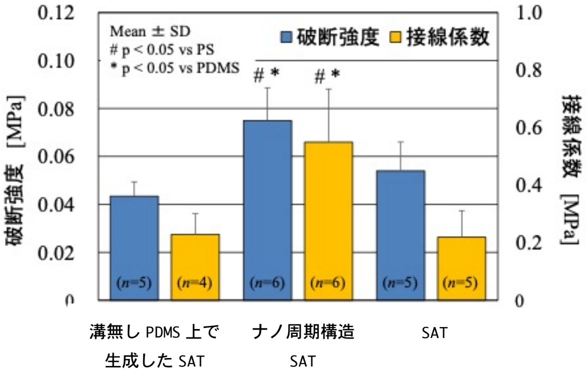


図５:ナノ周期構造 SAT の破断強度と接線係数

それぞれの SAT に含まれる細胞については，観察・検討することができなかった．

(2) ナノ周期構造 SAT による軟骨修復

修復軟骨の４週後の肉眼観察像と 12 週後のサフラニン O による組織観察像を図６と図７に示す．ナノ周期構造 SAT 群では，欠損部の溝が小さく，修復軟骨の染色性が高かった．

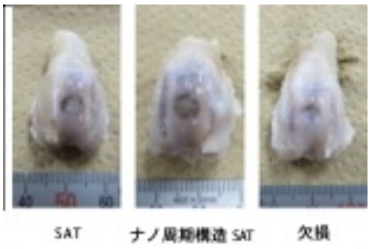


図６：ナノ周期構造 SAT による修復軟骨肉眼観察

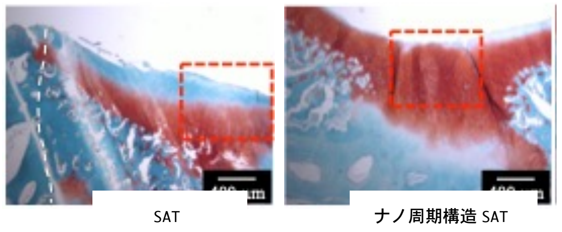


図７：ナノ周期構造 SAT による修復軟骨組織観察像（サフラニン O）

(3)

I 型コラーゲンおよび II 型コラーゲンを用いたナノ線維構造 SAT の，培養３日目における電子顕微鏡観察像，培養４週目における蛍光染色像と組織観察像を図８に示す．各群の試料数は n=3 である．電子顕微鏡像観察では，I 型コラーゲンによるナノ線維構造 SAT は，細線維が複数束ねられたフィブリル線維性構造が観察され，細胞様物質が点在していたのに対し，II 型コラ

ーゲンによるナノ線維構造 SAT ではそれらが観察されなかった．細線維径と空孔径は約 0.2 μm と約 0.3 μm で有意差がなかった．蛍光顕微鏡観察では，I 型ではアクチン線維が多いのに対して，II 型では細胞核が大きく，細胞が凝集していることが分かった．組織観察では，I 型では多くのコラーゲン線維と細胞が確認されたのに対し，II 型ではコラーゲン線維が薄く，細胞が凝集している様子が確認された．

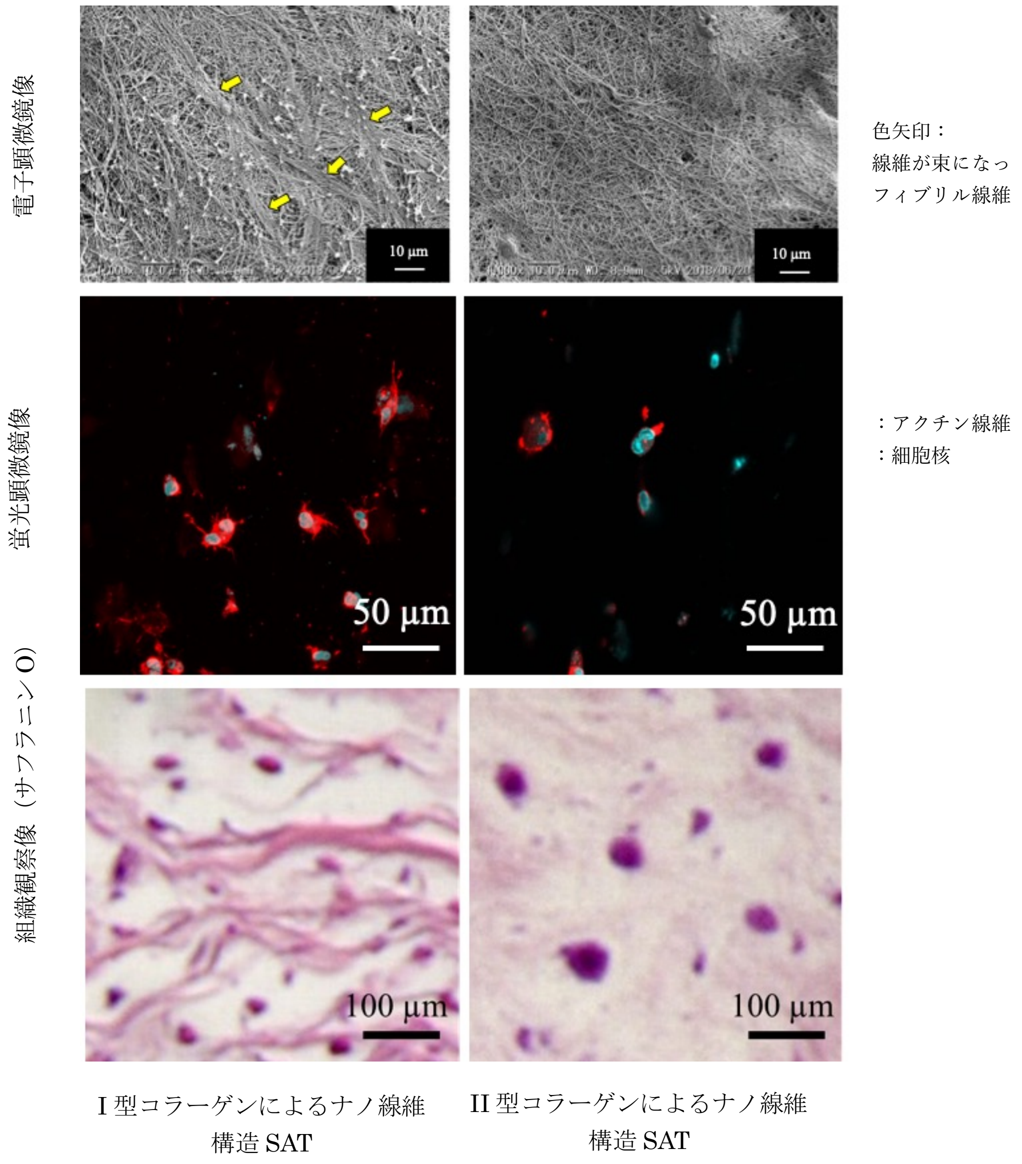


図８：ナノ線維構造 SAT の電子顕微鏡像（３日目），蛍光顕微鏡像および組織観察像（４週目）

(4) ナノ線維構造 SAT による軟骨修復

ナノ線維構造 SAT を移植した４週後における軟骨修復部の肉眼観察結果とサフラニン O による組織観察結果を図９に示す．各群の試料数は n=3 である．欠損群では表層軟骨の染色性が低く，コラーゲンゲル群では軟骨下骨の構造が乏しく，表層修復軟骨の染色性が低かった．それに対し，ナノ線維構造 SAT 群では，軟骨下骨の構造が発達し，表層軟骨も厚く，染色性が高かった．全ての試料に対して ICRS スコアリングを行ったところ，ナノ線維構造 SAT のスコアは 6.5±1.5 であり，欠損群（5.3±2.4）とコラーゲンゲル群（3.8±2.4）に比べ，高い傾向を示した．これに対し，II 型ナノ線維構造 SAT による修復軟骨は，I 型ほどの回復を示さず，肉眼観察ではやや不整な骨表面を呈した．

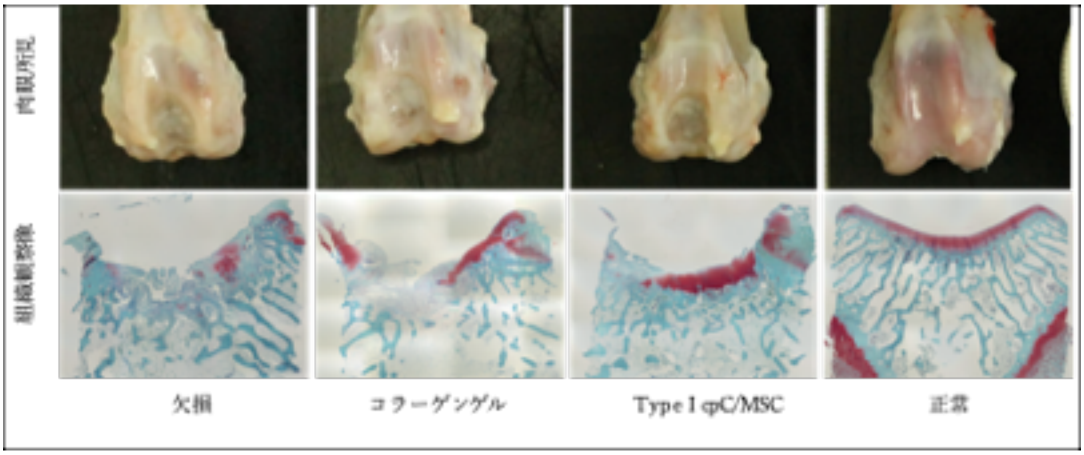


図９：I 型ナノ線維構造 SAT による軟骨修復４週後の肉眼観察と組織観察の結果

(5) 研究成果のまとめ

本研究で開発したナノ周期構造 SAT は内部コラーゲン線維の高い異方性を認め，線維強化による力学特性向上が認められた．また，その軟骨修復能は，等方的な線維構造を有する従来の SAT に比べて高いことが分かった．

ナノ線維構造 SAT は，等方的構造を有するものの，内部に多くの幹細胞を含有すること，および，内部コラーゲンの型によりコラーゲン線維の形態や細胞形態が異なることが分かった．特に，II 型コラーゲンは I 型コラーゲンのようには固化できないことが知られていたが，本研究で，幹細胞と混合して遠心分離により close pack することで固体できることが，はじめて明らかになった．コラーゲン生成物の開発史に記録されるべき発見であると考えられる．しかし，軟骨修復では，I 型コラーゲンによるナノ線維構造 SAT の方が優れていた．組織観察の結果，I 型コラーゲンの場合，軟骨下骨の修復が十分であり，そのために表層部の軟骨修復が良好に進行することが推察された．

全体では，軟骨下骨の回復が早い I 型コラーゲンによるナノ線維構造 SAT が軟骨修復の点で優れていると考えられる．将来的には，軟骨深層の下骨を同 SAT で修復し，表層は II 型コラーゲンによるナノ線維構造で修復する方法が考えられる．さらには，内部のコラーゲン線維や幹細胞などを傾斜構造配置させる手法も考えられる．本研究成果を基礎として，さらなる検討を加えていく．

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 15 件）

原著論文

1. Fujie H, Oya K, Tani Y, Suzuki K, Nakamura N, Stem cell-based self-assembled tissues cultured on a nano-periodic-structured surface patterned using femtosecond laser processing, Int J Automation Technology, 2016; 10(1): 55-61. doi: 10.20965/ijat.2016.p0055.
2. Ishiguro H, Fujie H, et al, Intervertebral disc regeneration with an adipose mesenchymeal stem cell-derived tissue-engineered construct in a rat nucleotomy model, Acta Biomaterialia, 2019; 87: pp.118-129.

他 13 件

〔学会発表〕（計 48 件）

1. Fujie, H, et al, Stem-cell-based tissue engineered constructs (TEC) combined with collagen sheets for cartel repair, Abstract of the International Society of Cartilage Repair, 2016 September 24-27; Sorrento-Naples, Italy: Oral and e-poster presentation 18.20. (Best rated abstract award).
2. Yamasaki, M, Fujie, H, et al, Development of a novel tissue-engineered material composed of mesenchymeal stem cells and collagen fibril, 26th International Society of Biomechanics, Abstract p. 451, July 26, 27, 2017; Brisbane Convention & Exhibition Centre, Brisbane, Australia.

他 46 件

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 2 件）

名称：組織修復材
発明者：藤江　裕道
権利者：首都大学東京
種類：特許
番号：特願 2016-176270
出願年：2016 年
国内外の別： 国内

名称：新規組織再生材料およびその製造法
発明者：藤江　裕道，山崎　雅史
権利者：首都大学東京
種類：特許
番号：特願 2017-4526
出願年：2017 年
国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）
なし

〔その他〕
ホームページ等：http://www.comp.sd.tmu.ac.jp/fujielab/

６．研究組織
(1)研究分担者
研究分担者氏名：中村　憲正
ローマ字氏名：NAKAMURA Norimasa
所属研究機関名：大阪大学
部局名：国際医工情報センター
職名：招聘教授
研究者番号（8 桁）：50273719

研究分担者氏名：鎗光　清道
ローマ字氏名：YARIMITSU Seido
所属研究機関名：首都大学東京
部局名：システムデザイン学部
職名：助教
研究者番号（8 桁）：90723205

研究分担者氏名：大家　渓
ローマ字氏名：OYA Kei
所属研究機関名：成蹊大学
部局名：理工学部
職名：助教
研究者番号（8 桁）：50549962

(2)研究協力者
研究協力者氏名：山崎　雅史
ローマ字氏名：YAMAZAKI Masashi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。