

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05533

研究課題名(和文) 体外での生体組織成長制御を目指すメカノ・ケミカルコントロール環境の構築

研究課題名(英文) Mechano-chemical control of in vitro environment for biological tissue manipulation

研究代表者

松本 卓也 (Matsumoto, Takuya)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40324793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、三次元細胞塊の成長制御に対し適切な機械的刺激、化学的刺激を複合的に負荷できる培養系の開発を目的とした。唾液腺組織については、単離した唾液腺細胞を凝集塊としてマトリゲル中に存在させ実験室にて三次元自己組織化できる系を構築した。この構築した培養系を利用した結果、MCSFやRGDペプチドが自己組織化を促進することを見出した。一方、硬組織として骨組織生成過程の理解の結果、肥大軟骨細胞の破裂の結果生じた細胞膜断片が骨形成の核形成起点になることを明らかにした。これら結果をもとに、新たな石灰化形成過程をin vitroにて再現するための培養系を構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では軟組織、硬組織それぞれの組織において、新たな培養系を提案、構築し、これまでにない新たな組織発生制御を可能とするin vitroの実験系、ならびに組織成長制御環境を生み出すに至った。これら新しい培養系は現在注目を集めているオルガノイドの成長制御など、将来的なin vitroでの組織作製に有効な技術として社会的意義が大きい技術と言える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a culture system that can be loaded with appropriate mechanical and chemical stimuli for growth control of three-dimensional cell mass. In salivary gland tissue, a system was established that could allow isolated salivary gland cells to be present as aggregates in matrigel to achieve three-dimensional self-assembly in vitro. As a result of using this constructed culture system, it was found that RGD, which is a functional motif of MCSF and fibronectin, promotes self-assembly. On the other hand, as a result of the understanding of the bone tissue formation process as hard tissue, it was clarified that the cell membrane fragment generated as a result of the rupture of hypertrophic chondrocytes becomes the nucleation origin of bone formation. Based on these results, we could construct a culture system to reproduce the new calcification process in vitro.

研究分野：生体材料学

キーワード：細胞操作 組織操作 バイオマテリアル バイオメカニクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

組織工学を基本手技とした場合の組織再生研究は現在2つの異なるアプローチで進められている。1つは、分化した細胞あるいは幹細胞をスキャフォールドとともに生体に移植し、組織再生を誘導する従来からの組織工学的手法であり、これについては世界中ですでに数万を越える研究が報告されている。2つ目は、3次元細胞集合体を元に、体外において3次元生体組織そのものを構築する手法であり、これは「オルガノジェネシス」という名のもと、近年注目を集めている。例えば、笹井らはコラーゲンゲル内に包埋したES細胞から眼杯や下垂体の作製に成功している(2,3)。他にも過らによる歯牙や毛包、武部らによる肝臓組織の構築といった研究がある。我々も骨髄間葉系幹細胞の3次元集合体を任意形状で作製する技術を開発し、この技術でつくった細胞集合体をもとに軟骨/骨複合組織を *in vitro* にて作製することに成功している。しかし、現況、体外で作られる組織は生体組織としてのサイズ、形態、機能どれにおいても、未成熟、不十分であり、実際の臨床応用にはさらなる改善が必要である。

2. 研究の目的

サイズ、形態、機能を兼ね備えた実際の生体組織を体外で作るためには、細胞増殖・分化や自己組織化、さらに組織成長・成熟などを制御できる、これまでに無い新しい細胞/組織培養系の構築が必要である。生体材料学、組織工学の進展にともない、人工材料と細胞/組織との良好な関係(生体親和性)を再現する手法が明らかとなっており、さらに高度な細胞/組織の成長・成熟制御できる環境(場)の構築が可能な状況にある。また、分子細胞生物学ならびにメカノバイオロジーの進展にともない、生体組織の成長・成熟に關する多くの機械的刺激、化学的刺激、これら刺激に関連したシグナル伝達系が明らかとなってきた。これら知見、技術を融合し発展させることで、より高機能な人工環境(場)の構築が期待できる。

そこで、本研究では、三次元細胞塊の成長制御に対し適切な機械的刺激、化学的刺激を複合的に負荷できる培養系の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

軟組織である唾液腺について、その化学的因子の影響について検討を進めた。具体的に使用した化学的因子は複数あり、1つは細胞外基質として知られているフィブロネクチンおよびこの機能性ドメインであるRGDペプチド、もう1つはM2マクロファージの分化誘導因子の1つであるマクロファージコロニー刺激因子(MCSF)である。これまでに我々はハイドロゲルの堅さを変えることで唾液腺組織の成長制御が可能なことを見出している。本研究ではこの特殊環境、特に堅いハイドロゲル基材を利用しこれら化学的因子が唾液腺組織成長に及ぼす影響について検討を進めた。

ところで、この系で認められるのは組織発生後ある程度の組織成長が進んだ段階以降の成長であることから、より発生初期の組織形成時期における影響の検討も重要である。そこで、単離した唾液腺組織を酵素処理により細胞レベルにまで単離したうえで機能性ハイドロゲルに封入することで唾液腺組織の発生初期を再現できる実験系の確立も試みた。さらに実験によっては *in vivo* マウスを用いた実験系で確認実験を行った。

一方、硬組織である骨組織について、その周囲環境が骨組織発生に及ぼす影響を検討するため、マウス発生初期からの骨組織形成について、特に二次骨化中心部分を重点的に継時的な検

討を進めた。この検討にはマイクロ CT を用いた画像解析、組織切片を用いた染色や電子顕微鏡を用いた微細結晶の抽出ならびに定性を行った。また、この検討の結果得られた知見の確認実験としては、ex vivo 単離組織に対する力学負荷を可能とする新しい培養実験系を構築し進めるとともに、in vivo での力学負荷試験も合わせて行った。さらにこの新知見を確認するための新たな in vitro 骨組織形成再現培養系を構築し検討を進めた。

4 . 研究成果

唾液腺組織においては、マトリゲル中に単離した唾液腺細胞を凝集塊として存在させ実験系の最適化、特に増殖因子添加の調整を進めることで、in vitro にて三次元自己組織化を達成できる系の構築に成功した。この構築した in vitro 培養系において、MCSF を添加することで、その自己組織化が促進されること、また、この際、神経細胞の伸長、分布が有意に増加することが明らかとなった。この知見を確認するため、堅さの異なるハイドロゲルを基材とした検討を行った。本来、その組織成長が抑制される堅いゲル上であるにも関わらず、MCSF の添加は唾液腺組織の成長を促進することが示され、また、in vivo 腹腔内への MCSF 抗体の投与により唾液腺組織成長の抑制が認められた。以上のことから MCSF が唾液腺組織発生の初期において、その成長を促進する重要な働きを示すこと、ならびにその作用の結果、生成される唾液腺組織の周囲にマクロファージの存在が増加し広がること、といった新しい知見を獲得するに至った。また、同様に進めたフィブロネクチンが唾液腺組織成長におよぼす影響についての検討ではこの基質添加によりコントロールよりも有意に唾液腺組織の管腔形成が促進されることを発見した。この事実について、in vitro での組織培養実験においてその濃度依存性についても確認した。さらに、フィブロネクチンの機能性モチーフである RGD を基本骨格とする機能性ペプチドを合成し利用した実験を行い、このペプチドを導入したゲル上での唾液腺組織成長の促進を確認した。さらなる外部環境のコントロールとして、カドヘリン関連ペプチドの合成ならびにこれら残基数違いによる影響について検討を進めた。その結果、このペプチドが唾液腺組織成長促進に重要な働きを示すこと、特に、添加量の違いにより発芽促進や管腔形成促進など異なる働きを示すことが明らかとなった。現在、さらにこの分子メカニズムについて、特に上皮細胞系におけるシグナル伝達系を中心に検討を進めている段階にある。

一方、硬組織として骨組織生成過程の検討を進めた。長管骨骨端部、二次骨化中心における詳細な検討の結果、肥大軟骨細胞の破裂の結果生じた細胞膜断片がミネラル形成の核形成起点になることや、肥大化軟骨細胞の破裂の結果、石灰化形成のためのスペースができることなどを明らかにした。これら結果をもとに、実際に機械的刺激を負荷できる実験系を構築し利用した。具体的には単離組織に対する機械的刺激負荷によって生じる細胞破裂数やミネラル形成スペースの変化などを評価した。この結果、これら要素が機械的刺激の程度に依存していることが明らかとなった。また、この結果生じる石灰化物はそのできる時期にともない結晶形態および結晶成長が異なることを示すに至った。次に、このような新たな石灰化形成過程を in vitro にて再現するための培養系を構築した。ここでは細胞凝集塊を粉碎して獲得した細胞膜ナノフラグメントを用い in vitro での石灰化を再現した。現状、ナノフラグメントの高い石灰化促進能メカニズムについて理解するとともに、石灰化を起こすための最適条件についてさらなる検討を進めている。

このように本研究では軟組織、硬組織それぞれの組織において、新たな培養系を種々提案、構築し、これまでにない新たな組織発生制御を可能とする in vitro の実験系、ならびに組織成長

制御環境を生み出すに至った。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Kunitomi Y, Hara ES, Okada M, Nagaoka N, Kunitomi Y, Hara E.S., Okada M, Nagaoka N, Kuboki T, Nakano T, Kamioka H, Matsumoto T : Biomimetic mineralization using matrix vesicle nanofragments. J Biomed Mater Res A. 107 (2019) 1021-30 doi: 10.1002/jbm.a.36618.査読有

松本卓也, ハラ・エミリオ・サトシ. 最初期石灰化過程を詳細に観察し模倣する. 化学工業 69 (2019) 23-28.査読無

松本卓也, ハラ・エミリオ・サトシ. 骨組織発生の材料学的再検討が新しい骨組織工学につながる. バイオマテリアル 37 (2019) 50-51.査読無

Hara ES, Okada M, Nagaoka N, Hattori T, Kuboki T, Nakano T, Matsumoto T. Bioinspired mineralization using chondrocyte membrane nanofragments. ACS Biomater Sci Eng. 4 (2018) 617-625. doi: 10.1021/acsbio.7b00962.査読有

Hara ES, Okada M, Kuboki T, Nakano T, Matsumoto T. Rapid bioinspired mineralization using cell membrane nanofragments and alkaline milieu. J Mater Chem B. 6 (2018) 6153-6161. doi:10.1039/c8tb01544a.査読有

Hara ES, Okada M, Nagaoka N, Hattori T, Kuboki T, Nakano T, Matsumoto T. Chondrocyte burst promotes space for mineral expansion. Integrat Biol. 10 (2018) 57-66. doi: 10.1039/c7ib00130d.査読有

Kazi GAS, Rahman KA, Farahat M, Matsumoto T. Fabrication of single gel with different mechanical stiffness using three-dimensional mold. J Biomed Mater Res A. 107 (2018) 6-11. doi: 10.1002/jbm.a.36455.査読有

Sathi GA, Farahat M, Hara ES, Taketa H, Nagatsuka H, Kuboki T, Matsumoto T. MCSF orchestrates branching morphogenesis in developing submandibular gland tissue. J Cell Sci. 130 (2017) 1559-1569. doi: 10.1242/jcs.196907.査読有

Farahat M, Sathi GA, Hara ES, Taketa H, Kuboki T, Matsumoto T. MSCs feeder layers induce SMG self-organization and branching morphogenesis. PLoS One, 12 (2017) e2017. doi: 10.1371/journal.pone.0176453. eCollection 2017.査読有

Ikedo A, Taketa H, Sathi GA, Hirano Y, Iida S, Matsumoto T. Functional peptide KP24 enhances submandibular gland tissue growth in vitro. Regener Ther. 3 (2016) 88-96. doi:10.1016/j.reth.2016.02.006.査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

Matsumoto T, Hara ES. Cell nanofragment inspired from natural bone mineralization. Bioceramics 31. Nagoya, Oct, 2018 (Invited)

Matsumoto T. Temporal control of 3D tissue morphogenesis in artificial cellular microenvironments. Termis World, kyoto, Sep, 2018 (Invited)

松本卓也. 細胞を原料とした新規バイオミメティック骨誘導材料の開発. 高分子討論会, Sep, 2018(Invited)

Matsumoto T. Re-evaluation of bone biomineralization - by engineer's point of view-. International Association for Dental Research. London, Jul, 2018 (Invited)

Matsumoto T. Reevaluation of bone tissue development. 日中韓フォーサイト シンポジウム, 札幌 日本, Jul, 2018 (Invited)

松本卓也. 細胞を原料とした新規バイオミメティック骨誘導材料. 日本化学会, 東京 日本, Mar, 2018(Invited)

松本卓也. Reevaluation of bone tissue development. 日本再生医療学会, Mar, 2018 (Invited)

松本卓也. 唾液腺組織の人工合成と生命科学研究への応用. 糖尿病臨床研究開発センター講演会, 徳島 日本, Feb, 2017 (Invited)

松本卓也. 二次骨化中心における最初期石灰化の形成と拡大. 日本再生医療学会, 仙台 日本, Mar, 2017 (Invited)

Matsumoto T, Hara E. How is bone tissue generated? - Perspective from material scientist's point of view- Brain Korea 21+ International Symposium on Innovative Biomaterials and Future therapy (BK21), Seoul, Korea, Nov, 2016 (Invited)

Matsumoto T. In vitro tunable cell and tissue culture system for understanding salivary gland tissue development. 2016 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society- Asia

〔図書〕(計 1件)

・松本卓也. 医療・診断を支えるペプチド科学(平野義明 編). CMC 出版 p.114-120. 2017.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山本 雅哉

ローマ字氏名：Masaya Yamamoto

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学院工学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：10332735

研究分担者氏名：平野 義明

ローマ字氏名：Yoshiaki Hirano

所属研究機関名：関西大学

部局名：化学生命工学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：80247874

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：岡田 正弘

ローマ字氏名：Masahiro Okada

研究協力者氏名：ハラ エミリオ

ローマ字氏名：Emilio Hara