

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01396

研究課題名(和文)新規融合プロセスを用いた血管ネットワークを有する三次元硬組織の構築

研究課題名(英文) Construction of three-dimensional hard tissue with vascular network using a novel fusion process

研究代表者

本田 みちよ (Honda, Michiyo)

明治大学・理工学部・専任准教授

研究者番号：20384175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体親和性の高い足場材と血管内皮細胞と骨芽細胞からなる骨膜様シートと複合化し、三次元的な構造を有する骨様組織を構築することを本研究の目的とした。タンパク質吸着能と大きな気孔構造を有する足場材へ血管新生の発現するタンパク質を担持させ、その有効性を調査した。その結果、細胞-細胞間の相互作用と細胞-足場材料間の相互作用を介し、細胞の接着、生存、骨芽細胞の分化、血管内皮細胞の管腔形成などの細胞の機能を高められることを示した。さらに、材料の特異な構造は細胞の増殖や酸素や栄養素の循環に適した環境を提供することを証明した。本研究で得られた知見は、血管構造を有する組織再生に有用な技術となると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた我が国において、骨組織をはじめとする生体組織の再生はiPS細胞を含む幹細胞による生体の構築に大きく貢献することができる。将来的にはそれらの技術は国民の生活の質の向上に寄与することが期待できる。本研究では、組織再生において重要と位置付けられる血管構造を有する骨膜様組織の構築に成功した。ネットワーク構造を有する足場材料は、再生組織を構築する細胞と血管形成に必要な細胞が相互作用し得る環境を提供し、血管網を備えた機能的で移植可能なサイズを持つ骨膜様組織の作出を実現した。この技術は、骨折などを含む硬組織の再生に大きく貢献し得ると考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to construct bone-like tissue with three-dimensional structure by combination with biocompatible scaffold and periosteum-like sheet consisting of vascular endothelial cells and osteoblasts. The angiogenic proteins-loaded materials could enhance the cellular attachment through interaction with integrin and promote actin cytoskeletal reorganization. In the case of co-culture of osteoblasts and endothelial cells on a microfiber biomaterial, osteoblasts and endothelial cells could enhance and improve each other's function such as osteoblastic differentiation and endothelial cell tube formation. These results were supported by the properties of the scaffold such as the fibrous and topological structures. This approach can provide the evidences for the effectiveness of the tissue-engineered bone with vascular networks by crosstalk between osteoblasts and endothelial cells and interaction between these cells and the scaffold.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：骨再生 血管新生 バイオマテリアル スキャフォールド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療」は先天的、または事故や疾患によって後天的に失われた組織や器官を再生する医療として近年、注目を集めている。iPS (induced pluripotent stem cell)細胞の樹立により、再生医療の可能性は飛躍的に高められ、国内外を問わず、競争の激しい研究分野の一つと言える。組織工学・再生医療の研究には、細胞・増殖因子・足場材料(スキャフォールド)と呼ばれる三要素が提唱されている。より生体に類似した構造を持つ組織再生を実現するためには、優れた「三次元培養基材の開発」が強く求められている。また、幹細胞の基礎研究が進展し、iPS細胞を含む幹細胞による臓器構築技術には期待が寄せられているが、幹細胞の多分化能に関する研究の多くが二次元培養による成果であり、現段階では幹細胞から移植可能な三次元的な構造をもった再生臓器の構築は実現されていない。細胞・増殖因子、そして足場材料を利用して如何に三次元的な構造を有する臓器構築を試みるかが課題である。

三次元組織構築の技術的な手法は主に、トップダウンに基づく方法とボトムアップによる方法の二つに分けることができる。我々はこれまで足場材へ細胞を播種するようなトップダウンの方法により三次元的な構造を有する骨組織を構築することに注力してきた。しかし、トップダウンプロセスによるアプローチでは、材料内部への細胞侵入に限界があり、さらに、酸素の拡散範囲という制限により材料表層部においてのみ組織形成が行われ、マクロな三次元組織再生の実現には新たなアプローチを開発する必要性が生じた。

2. 研究の目的

本研究ではマクロな立体構造を有する生体硬組織の再生を実現させるために、既存の基盤技術を応用し、生体親和性の高いスキャフォールドと血管内皮細胞と骨芽細胞からなる骨膜様シートと複合化し、さらに、ボトムアップアプローチにより三次元的な構造を有する骨様組織を構築することを目指した。なお、骨再生過程における血管新生制御の重要性に注目し、血管新生能を有するタンパク質(periostrin, connective tissue growth factor; CCN2/CTGF)を担持させた材料も創製することで、血管誘導能を有する材料を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

足場材には、アパタイトファイバースキャフォールド(AFS)、NEOBONE (Alimedica MMT)、不織布状足場材料を利用した。均一沈殿法により合成されたアパタイトファイバー(AF)スラリーとエタノールを1/1[v/v]で混合スラリーを作製し、粒径150 μm および20 μm のカーボンビーズを50 mass%-50 mass%の割合で、AFの質量に対して3、5倍量添加し、成形圧30 MPaで一軸加圧成形し、1300 $^{\circ}\text{C}$ 、5 h、5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 、水蒸気雰囲気下で焼成して得た。本実験では気孔率が88%と93%の2種類を用いた。不織布状足場材料は、40 mass%の β -Tricalcium Phosphate (β -TCP)、30 mass%のPoly (Lactic-co-Glycolic) Acid (PLGA)、30 mass%のSilicon-coated Vaterite (SiV)から構成されたシート状足場材料(ORTHO ReBIRTH)を15 mm角にカットし、線滅菌したものをを用いた。

材料へ血管新生誘導性を付与させるために、periostrinまたはCTGFをそれぞれ担持させた。細胞培養はEGM2を用いてMG-63とHUVECを1:4で懸濁した $2.0 \times 10^5 \text{ cells}\cdot\text{cm}^{-3}$ の細胞懸濁液を1 cm^3 ずつ24-well plateに播種し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 雰囲気下で24時間培養した。その後、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 雰囲気下で最大21日間培養した。培地交換は2日毎に行った。

骨分化レベルの調査には、ALP活性染色及びALP活性測定を用いた。また、血管新生の評価には、免疫蛍光染色を実施した。

なお、生体内反応を調査する際には、ラットの背部皮下モデルもしくはラット頭蓋冠欠損モデル

を利用し、血管新生能と骨形成能について評価した。全ての実験は明治大学理工学部動物実験委員会の承認の下実施した。なお、一定期間飼育したラットを犠牲にし、脱灰研磨標本を作製することにより、組織適合性を含め、血管新生、骨形成に関連するタンパク質を免疫染色することで評価を行った。

4. 研究成果

In vitro におけるスキャフォールド(AFS)への細胞の侵入性と骨分化能について、気孔率が高く、また、血管新生能を有する CTGF を担持させた場合、培養日数の経過とともにスキャフォールド表面における細胞増殖は観察されたが、内部での ingrowth はあまり見られなかった。一方、骨分化能を骨分化関連マーカー遺伝子の発現を調査することによって調べた結果、高い気孔率を有するサンプルにおいて、マーカー遺伝子の発現が増加する傾向が認められた。

また、ラット背部皮下埋入したサンプルとその周囲の組織を観察した結果、CTGF 存在下においては、足場材周辺組織に血管を呼び集めているだけでなく、周囲に小さな内腔構造、AFS 内部には微小血管様を構築していることが明らかになった。この結果は、足場材に用いた水酸アパタイト(HAp)のタンパク質吸着能とそのイオン交換能に由来すると考えられる。HAp へ吸着した CTGF は細胞の侵入性や接着性を向上させ、またリリースされた CTGF は血管内皮細胞をはじめとする細胞を足場材内部へと誘導することが可能になったと考えられる。

さらに骨芽細胞と血管内皮細胞からなる骨膜様組織の構築に関しては、当初細胞のみで組織化を検討していたが、新たにスキャフォールド自体をシート化することについても本研究では検討した。

骨の代表的な無機成分であるリン酸カルシウムを主成分とし、優れた生体吸収性と骨伝導能を兼ね備えた不織布状足場材料を利用することで、骨膜様組織形成を試みた。本研究で用いた不織布状足場材料は、多数のマイクロファイバーによる大きな気孔を有している。この足場材料は平均直径 10-30 μm の繊維がランダムに配置されている。また、立体的な構造を有することから、細胞の増殖や血管網の形成に適していると考えられる。

実際、足場材において骨芽細胞と血管内皮細胞を共培養した結果、細胞-細胞間の相互作用と細胞-足場材料間の相互作用を介し、細胞の接着、生存、骨芽細胞の分化、血管内皮細胞の管腔形成などの細胞の機能が高められることが示された。さらに、本材料の特異な構造は細胞の増殖や酸素や栄養素の循環に適した環境を提供することが証明された。前述の通り、我々は、細胞単体で骨膜様シートを作製することを想定していたが、本材料を用いることで安定的に血管網を備えた移植可能なサイズを持つ骨膜様組織を構築できることを明らかにした。本材料は、その組成を変更することにより、柔軟性や気孔率を制御することができ、これは、血管形成や骨形成をはじめとする細胞の特性をトポロジカルに制御できる可能性を示唆している。

そこで、この不織布状足場材料へ血管新生や骨形成に関与することが報告されている periostin を担持させ、ラット頭蓋冠における組織再生能についても検証した。はじめに、材料周辺部を含めた細胞の分布について調べた結果、periostin を担持させた材料は担持させていないコントロールに比べ、細胞数が有意に増加していることが明らかになった。これは periostin の特性の一つである細胞の遊走性への寄与によるものと推測される。シートから徐放された periostin が欠損部周りの骨や組織に存在する骨芽細胞や骨芽前駆細胞などの骨形成に関わる細胞に作用して遊走性を高めることで、それらの欠損部への移動を促したのだと考えられる。さらに、periostin は細胞の接着性を高めることでも知られているため、この働きにより欠損部に留まる細胞数が増加したことが考えられる。また、血管新生について調査するために、血管内皮増殖因

子 (VEGF) , α -smooth muscle actin (α -SMA)および CD31 をマーカーとして、その発現量についても調査した。その結果、periostin を担持することにより各種マーカーの発現が増加する傾向が認められた。

ラットの頭蓋欠損に埋入した足場材から periostin が体内に放出され、その periostin が欠損部周りの細胞やニッチ内の骨芽前駆細胞に作用し、FAK シグナル伝達経路を活性化させることで欠損部位への移動および欠損部内での細胞の接着を促進させた結果、細胞数が増加したと考えられる。また、in vitro における検証においても確認されたが、血管新生に積極的に働きかける成長因子の一つである VEGF は骨芽細胞において非常に多量に分泌されることが明らかになっている。すなわち、periostin によって直接的に血管内皮細胞の増殖や管腔形成が促進された、もしくは活性化された骨芽細胞によって産生された VEGF などにより間接的に周辺の血管内皮細胞が影響を受けた可能性が考えられる。血管形成は生体内の様々な組織に酸素や栄養分を運搬する重要な役割を担っており、本研究で確認された現象は、血管構造を有する組織再生に有用であると考えられる。

本研究で作製した血管網を有する骨様シート自体を積層化する、または、構築した骨膜様構造体と既存の生体材料との複合化などにより、新規な構造を有する骨様組織の構築を実現できる可能性が高められたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Inomata Kouki, Honda Michiyo	4. 巻 12
2. 論文標題 Co-Culture of Osteoblasts and Endothelial Cells on a Microfiber Scaffold to Construct Bone-Like Tissue with Vascular Networks	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 2869 ~ 2869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma12182869	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Honda Michiyo, Hariya Ryo, Matsumoto Morio, Aizawa Mamoru	4. 巻 12
2. 論文標題 Acceleration of Osteogenesis via Stimulation of Angiogenesis by Combination with Scaffold and Connective Tissue Growth Factor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 2068 ~ 2068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma12132068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 M. Honda, N. Suzuki, K. Nagata, M. Aizawa	4. 巻 782
2. 論文標題 Inhibitory effects of zoledronic acid-loaded bioresorbable carrier on osteosarcoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Key. Eng. Mater.	6. 最初と最後の頁 297 ~ 302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokota Tomohiro, Nakano Kazuaki, Nagaya Masaki, Honda Michiyo, Nagashima Hiroshi, Aizawa Mamoru	4. 巻 33
2. 論文標題 In vivo evaluation of porous hydroxyapatite ceramics including bone minerals using pig model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Materials Technology	6. 最初と最後の頁 689 ~ 697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1080/10667857.2018.1495392	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 YOKOTA Tomohiro, MIKI Takuya, HONDA Michiyo, IKEDA-FUKAZAWA Tomoko, ISHII Ken, MATSUMOTO Morio, AIZAWA Mamoru	4. 巻 126
2. 論文標題 Fabrication and biological evaluation of hydroxyapatite ceramics including bone minerals	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the Ceramic Society of Japan	6. 最初と最後の頁 99 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2109/jcersj2.17216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 KIMINAMI Keishi, NAGATA Kohei, KONISHI Toshiisa, MIZUMOTO Minori, HONDA Michiyo, NAKANO Kazuaki, NAGAYA Masaki, ARIMURA Hidetoshi, NAGASHIMA Hiroshi, AIZAWA Mamoru	4. 巻 126
2. 論文標題 Bioresorbability of chelate-setting calcium-phosphate cement hybridized with gelatin particles using a porcine tibial defect model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the Ceramic Society of Japan	6. 最初と最後の頁 71 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2109/jcersj2.17197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Honda, Y. Kawanobe, H. Uchida, M. aizawa	4. 巻 3
2. 論文標題 Inhibition of bacterial adhesion using calcium phosphate microspheres loaded with protamine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int. J. Metall. Mater. Eng.	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15344/2455-2372/2017/136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 M. Honda, M. Aizawa	4. 巻 758
2. 論文標題 Preliminary study for Co-Culture of Osteoblasts and Endothelial Cells to Construct the Regenerative Bone	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Key. Eng. Mater.	6. 最初と最後の頁 269-272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Konishi, PN. Lim, M. Honda, M. Nagaya, H. Nagashima, ES. Thian, M. Aizawa	4. 巻 17
2. 論文標題 Fabrication of chelate-setting -tricalcium phosphate cement using sodium citrate and sodium alginate as mixing solution and its in vivo osteoconductivity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Biomed. Mater. Res. B	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 結城大悟、本田みちよ
2. 発表標題 血管内皮細胞との共培養による歯根膜線維芽細胞の分化への影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片桐奈津子、坂井秀昭、本田みちよ
2. 発表標題 骨芽細胞構造体の作製とその機能性評価
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪俣光稀、本田みちよ
2. 発表標題 温度変化に伴う骨分化及び血管新生への影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Honda, N. Suzuki, K. Nagata, M. Aizawa
2. 発表標題 Inhibitory effects of zoledronic acid-loaded bioresorbable cement on osteosarcoma
3. 学会等名 Bioceramics30 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Tashiro, M. Aizawa, M. Honda
2. 発表標題 Evaluation of antimicrobial activity of protamine against Cutibacterium acnes
3. 学会等名 The 18th Asian bioceramics symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iwao Sato, Mamoru Aizawa, Michiyo Honda
2. 発表標題 Zinc induces bone differentiation through Hedgehog-Gli Signaling Pathway
3. 学会等名 The 18th Asian bioceramics symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤巖, 本田みちよ
2. 発表標題 亜鉛のHedgehog-Gli経路を介した骨髄間質細胞の骨分化促進効果
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Honda, and M. Aizawa,
2. 発表標題 Three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering
3. 学会等名 STAC10 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. Honda, K. Nagata, T. Yokota, K. Ishii, M. Natsumoto, and M. Aizawa
2. 発表標題 Acceleration of osteogenesis and angiogenesis by CTGF-containing apatite-fiber scaffold
3. 学会等名 IUMRS-ICAM (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. Honda, and M. Aizawa
2. 発表標題 Promotion of osteogenesis by combination of apatite-fiber scaffold and connective tissue growth factor
3. 学会等名 Bioceramics29 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 本田みちよ, 相澤 守	4. 発行年 2017年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 526
3. 書名 動物細胞培養・自動化におけるトラブル発生原因と対策	

1. 著者名 M. Aizawa, M. Honda, M. Emoto,	4. 発行年 2017年
2. 出版社 ACS Books	5. 総ページ数 303
3. 書名 Advances in Bioinspired and Biomedical Materials	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	猪俣 光稀 (Inomata Kouki)		
研究協力者	佐藤 拓斗 (Sato Takuto)		