

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22954

研究課題名(和文) 椎間板前駆細胞と力学場から構成される3次元椎間板組織モデルの創出

研究課題名(英文) Development of the 3D intervertebral disc tissue model reconstituted with its precursor cells and the tissue-specific mechanical environment

研究代表者

三浦 重徳 (Miura, Shigenori)

東京大学・生産技術研究所・特任講師

研究者番号：70511244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体内における椎間板組織の変形を模倣するため、円形培養チャンバーの中央部に髄核を模倣した伸縮性のバルーンを設置し、培養ゲル組織の円周方向に力学刺激を負荷可能な伸展培養デバイスを作製した。同デバイスにおいて特定のECMを用いて線維輪細胞のゲル内培養を行うことで、自己組織化が顕著に促進されリング状の椎間板様培養組織を構築することに成功した。また、線維輪細胞は、伸展刺激により線維性組織分化が亢進し、軟骨性組織分化が抑制されることを見出した。本研究を通じて、3次元椎間板組織構築のための基盤となるデバイス開発および組織の力学刺激応答性に関する知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

椎間板を構成する線維輪構造の破綻は、椎間板ヘルニアをはじめとする種々の椎間板変性疾患を引き起こす。本研究では、椎間板組織に生じる力学刺激を模倣した培養デバイスを開発することで、3次元椎間板組織モデル構築のための培養技術の開発および椎間板線維輪細胞の力学刺激応答性について明らかにした。これらの基盤技術および知見は、椎間板の形成・成熟化に関わる分子メカニズムの解明および組織再生のための創薬スクリーニングなどに資するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed a stretching culture system for 3D tissue model of the intervertebral disc under the mechanical loading conditions as observed in the in vivo tissue. This culture system has a circular chamber structure for 3D culture of annulus fibrosus (AF) cells with the stretchable balloon at the center of the chamber. This balloon can be inflated by infusing air or liquid to mimic the deformation of the nucleus pulposus, caused by the mechanical loading on the spine. By exploring the best ECM components for 3D culture of AF cells, we could prepare a ring-shaped AF-like tissues through the cell-autonomous shrinkage process in our device. Interestingly, we found that stretching culture upregulated the genes to promote the fibrous tissue formation but suppressed the genes to induce cartilage differentiation. We believe our device is useful to reconstruct the fibrocartilaginous lamellar structure of the AF tissues.

研究分野：細胞生物学

キーワード：椎間板 力学刺激 線維輪 BioMEMS 生体模倣デバイス Pax1 硬節 再生医療

1. 研究開始当初の背景

椎間板を構成する線維輪構造の破綻は、椎間板ヘルニアをはじめとする種々の椎間板変性疾患を引き起こす。しかしながら、現在、椎間板の組織再生を伴う抜本的な治療法は存在せず、椎間板形成に関わる分化・成熟機構を理解するための研究基盤の拡充が強く望まれている。椎間板線維輪の前駆細胞を含む硬節は、微小な組織であり硬節細胞のみを分離することは極めて困難である。研究開始当初、我々は Pax1 の硬節エンハンサーに関する研究に取り組んでおり、このエンハンサーを利用して GFP リポーターマウスを作製することで、椎間板線維輪細胞及びその前駆細胞集団を可視化し、FACS により生体から高純度に分離できるのではないかと考えた。椎間板の分化ステージに応じた椎間板線維輪前駆細胞の分離を高純度で行うことができるようになれば、従来の技術的な問題を解決できるだけでなく、椎間板の分化・成熟機構における力の役割を解析可能な新たな研究基盤を創出できる可能性がある。

2. 研究の目的

椎骨と椎間板線維輪の原基である「硬節」で発現する転写因子 Pax1 の組織特異的な転写制御領域を利用して、椎間板線維輪前駆細胞をマウスより高純度に分離・培養する新たな手法を確立し、線維輪の分化・成熟過程と力学刺激との関連性を明らかにする。また、MEMS (微細加工) 技術を利用することで、前駆細胞から作製した微小3次元組織に対して持続的な力学刺激を印可可能な力学刺激デバイスを開発し、生体と類似した階層的な線維輪構造を有する3次元椎間板組織モデルの創出を目指す (図1、2)。

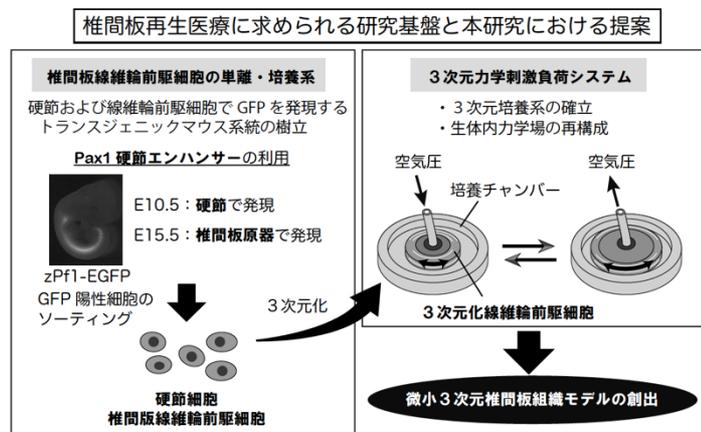


図1. 本研究が目指す3次元椎間板組織モデル。

3. 研究の方法

① 椎間板線維輪前駆細胞の単離・培養系の確立

脊椎形成の制御因子として知られる転写因子 Pax1 は、椎骨と椎間板線維輪の原基である「硬節」で発現し、脊柱形成後には椎間板線維輪に発現が限局するようになる。我々がこれまで解析を行ってきた Pax1 の硬節特異的な発現制御配列 (エンハンサー) mXe1 (マウス) または zPfl (ゼブラフィッシュ) を利用して、蛍光タンパク質 GFP を硬節及び椎間板線維輪において段階的に発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、系統化する。Tg マウス胚 (E10.5~E15.5) または新生仔マウス組織を酵素処理により消化し、GFP 陽性細胞を FACS によりソーティングすることで硬節細胞または椎間板線維輪前駆細胞を分離・培養する手法を確立する。

② 3次元力学刺激負荷デバイスの開発

椎間板線維輪はドーナツ状の強靱な線維構造を有し、円周方向に持続的な引張り刺激を受けている。本研究では、分担研究者森本雄矢氏の協力を得て、生体組織と同様に円周方向への伸展刺激を再現可能な3次元力学刺激負荷デバイスを開発する。

③ 椎間板線維輪前駆細胞と力学場再構成による

3次元微小椎間板モデル組織の創出

椎間板線維輪は、I型コラーゲンを豊富に含む外線維輪と軟骨性の ECM を含む内線維輪から成る特有の層状構造を有している。線維輪形成に関わる転写因子 Pax1 や Mohawk (Mkx)、Scleraxis (Scx) は、組織の張力が弱い線維輪の内側で比較的発現が低く、張力が強い外線維輪に向かって段階的に発現が増加するが、軟骨性 ECM の蓄積は逆の様相を示す (図2)。

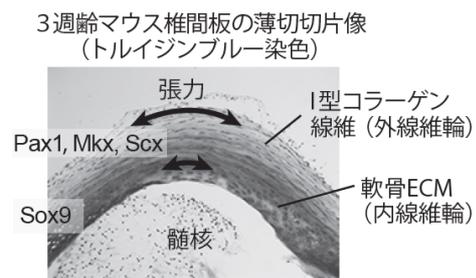


図2. 線維輪の特異な層状構造。

①、②で開発した前駆細胞およびデバイスを用いて、組織形成における力学刺激の役割を明らかにし、上述のような特有の層状構造を有する微小椎間板線維輪の構築を目指す。

4. 研究成果

① 椎間板線維輪前駆細胞の単離・培養系の確立

硬節および椎間板線維輪において GFP を発現させ可視化するために、ゼブラフィッシュの Pax1 硬節エンハンサー-zPfl を用いた GFP リポーターマウスの作製を試みた。zPfl(0.7 kb)および minimal promoter 制御下で GFP を発現するコンストラクトを作製し、トランスジェニックマウスを作製した。その結果、図3に示すように、founder マウスの硬節および椎間板と思われる組織で GFP の発現を確認することができた。しかしながら、複数回インジェクションを実施したが、本研究の目的に見合う F1 マウスを取得することはできなかった。原因は不明であるが、transgene が複数コピー入ることで、正常な胚発生に必要な転写因子が transgene にトラップされ、マウスが胎生致死となっている可能性が推察された。このように研究開始当初は予測できない結果となってしまったが、代替案として当面ラットから採取した椎間板線維輪細胞を用いて研究を行うことにした。そこで、3週齢の雄ラットから採取した尾椎を用い、組織の処理方法、酵素処理条件、培地などについて検討し、条件の最適化を行った(図4)。採取した椎間板細胞は継代によって Pax1 などのマーカー遺伝子の発現が顕著に低下することはなく、デバイスを用いた力学刺激負荷実験に利用可能であることを確認した。

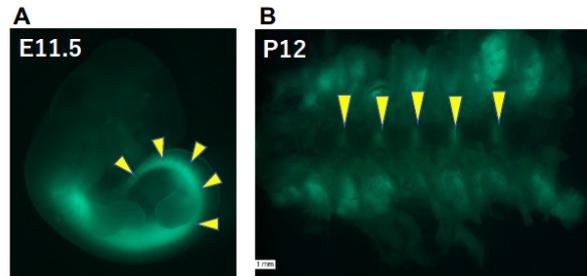
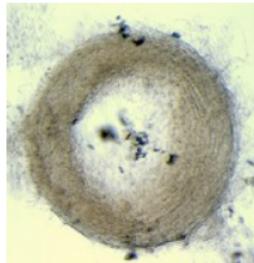


図3. 硬節(A)および椎間板(B)における zPfl のエンハンサー活性。

IVD細胞

ラット尾椎の線維輪



線維輪のラメラ構造

Outgrowth culture

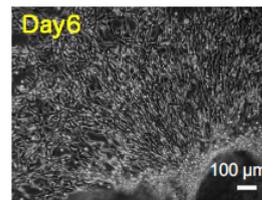
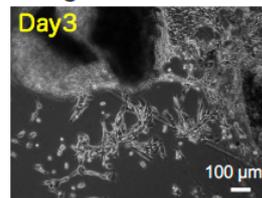


図4. ラット尾椎より採取した椎間板線維輪細胞。

② 3次元力学刺激負荷デバイスの開発
生体組織と類似した力学刺激を培養コンストラクトに負荷するため、PDMS とエコフレックスから成る伸展性の混合部材でできた円形の培養チャンバーと風船膜を組み合わせた3次元伸展培養デバイスを作製した(図5)。このデバイスは、シリンジポンプを用いて中央にある風船膜内に空気圧または液体を流入・吸引させることによりチャンバー内で培養されたゲル組織が変形し、組織の環状方向に伸展刺激を与えることができる。動作プログラムを入力することで、周期的な伸展刺激を印加できる培養システムを開発した。

3D伸展培養システム

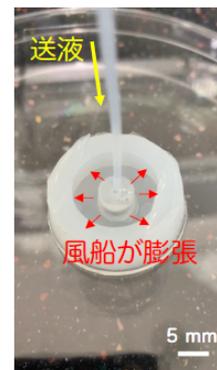
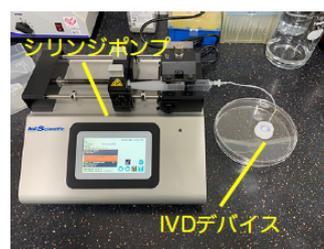


図5. 3D 椎間板組織伸展培養デバイス。

③ 椎間板線維輪前駆細胞と力学場再構成による3次元微小椎間板モデル組織の創出

本研究で作製したデバイスを用いて力学刺激負荷実験を行うに先立って、2次元伸展チャンバーを用いて椎間板線維輪細胞を伸展培養し、外線維輪(線維性組織; Scx, Mxk, Pax1, type I collagen)および内線維輪(軟骨性組織; Sox9, Acan, type II collagen)で発現するマーカー遺伝子の力学刺激応答性を解析した。その結果、伸展刺激により線維性マーカーの多くは発現レベルが上昇し、軟骨マーカーは発現が低下する傾向が認められた。この実験結果から、伸展培養デバイスのチャンバー内で、内側から外側に向けて円周方向の伸展刺激が強くなるように力学刺激を負荷できれば、軟骨性組織から線維性組織に移行する椎間板線維輪特有の階層構造を再現できる可能性があることが示唆された。

作製したデバイスを用いて3次元ゲル組織の伸展培養を行うにあたり、コラーゲンを含むゲル

組成5条件について条件検討を行った。その結果、1条件でのみ培養3日目からゲル組織の収縮が観察され、7日後にはピンセットで取り扱えるほど丈夫なリング状組織がデバイス上で形成された(図6)。培養ディッシュ上で同様のゲル組成において3次元培養を行い、線維組織マーカー (Scx, Mx, typeI collagen) および軟骨マーカー (Sox9, Acan, typeII collagen) の遺伝子発現を比較したところ、自己組織化を促進するゲル組成条件では、これらの遺伝子発現レベルは他のゲル組成条件と比較しておおよそ高いことがわかった。また、デバイスを用いて力学刺激を負荷しながら3日間培養を行ったところ、線維輪細胞は円周方向に配列する様子が観察され、staticな培養条件と比較して、より生体組織に近い形状を有していることが確認された。一方、3次元培養組織の薄切切片を作製してトルイジンブルー染色を行ったところ、異染性は認められず軟骨組織への組織分化が不十分であることが判明した。現在、軟骨分化誘導培地を用いて伸展培養を行うことで、2層性の階層構造を再現できないか引き続き検討を進めており、データが揃い次第論文として成果発表する予定である。

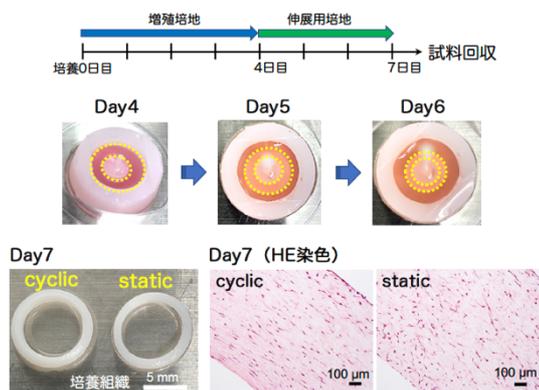
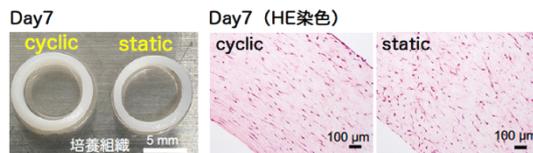
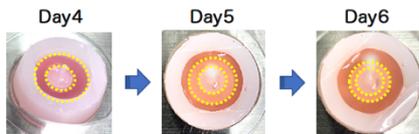


図6. デバイスを用いて作製した椎間板様3次元組織. 増殖培地で培養後, 3日間デバイスを用いて伸展培養を行った. デバイスで培養を続けると培養ゲル組織(点線で囲まれた部分)は収縮し, 伸展条件下では細胞の配向性が向上している.

培養0日目 増殖培地 4日目 伸展培地 7日目 試料回収



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦重徳、森本雄矢、竹内昌治
2. 発表標題 3次元椎間板組織モデルの創出を目指した力学刺激負荷デバイスの開発
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦重徳
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを利用した生体組織モデルの開発
3. 学会等名 第64回日本薬学会 関東支部大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦重徳
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた組織再構成アプローチによる生命現象の理解
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 三浦重徳、宿南知佐	4. 発行年 2020年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 5
3. 書名 整形・災害外科，連載企画「腱・靭帯研究のフロンティア」：椎間板の形成と恒常性の維持	

〔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 分担者	宿南 知佐 (Shukunami Chisa) (60303905)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	
研究 分担者	森本 雄矢 (Morimoto Yuya) (60739233)	東京大学・大学院情報理工学系研究科・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------