

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791926

研究課題名（和文） 生体骨組織の構造を模倣したヒト細胞由来人工骨移植材料の開発

研究課題名（英文） Development of artificial bone graft materials simulating native bone structure.

研究代表者

佐々木 淳一（SASAKI JUN-ICHI）

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50530490

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、機能的な骨再生を促す生体骨組織構造を高度に模倣した人工骨移植材料を *in vitro* にて創製することである。本研究の結果、生体骨組織と同様に骨基質が高度に配向した新規生体材料を作製することに成功した。また、細胞集合体システムを用いることで、骨基質とその周囲に軟骨基質を有するハイブリッド材料の作製に成功した。本研究によって構築した新規材料およびシステムは、骨再生医療の発展に貢献する有望な新規技術である。

研究成果の概要（英文）：

The objective of this study was to develop artificial bone graft materials simulating native bone structure which enabled promotion of functional bone regeneration. We were successful to fabricate novel bone-like materials which contained highly oriented bone matrix. Furthermore, we established a technique to fabricate the bone-cartilage hybrid materials by applying 3D cell construct system. The systems and materials achieved in this study are expected to contribute to advancement of bone regenerative medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：組織工学、生体材料学、再生歯学、骨再生

1. 研究開始当初の背景

大腿骨などの長管骨は皮質骨と呼ばれる方向性をもった硬い組織を有しており、この

軸方向の強い力学的特性はアパタイトの結晶配向によるものであることが知られている。近年、組織工学的手法を応用した骨再生

医療の研究が急速に進んでおり、 β -TCP などの無機材料や PLGA などの有機材料を用いた研究を中心として多くの骨再生技術が開発されてきた。しかし、これらの技術を応用して *in vitro* で作製された人工骨は、前述したような実際の生体骨の構造を有しておらず、生体内での骨との生着に長期間を要し、さらに、術後長期間経過後に移植材の吸収が生じる等の問題があり理想的な移植材とは言えない。本研究代表者は、あらかじめ *in vitro* にて患者由来の細胞を組織化培養し、生体骨の構造に近い生体材料を構築して移植することで、この問題を克服できると着想するに至った。

これまで本研究代表者らは、伸展を加えることによってゲル構成細線維が凝集して一定の方向に高配向する高分子ハイドロゲル(配向ゲル)に着目し、これを新規培養担体材料として用いた骨芽細胞培養技術を開発してきた (Matsumoto T, Sasaki J, *et al.* PLoS One 2007)。そして、配向ゲルを用いて骨芽細胞を培養することで、三次元的に高度に配向した細胞集合体を構築することに成功した。また、この配向ゲルシステムを用いた筋芽細胞および血管内皮細胞の培養法を考案した。

こういった技術を応用して、臨床応用可能な人工骨移植材料を創り上げるためには、次の段階として、配向ゲルシステムを改良し、再生医療開発研究に多く用いられている骨髄間葉系幹細胞 (BMSC) を使用することが有益であると考えられ、さらには、骨移植材料創製に最適な BMSC の培養環境条件を検討することが重要であることから、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、BMSC を複合化した配向ゲルシステム、および BMSC を用いた新規細胞集合体システムを構築し、*in vivo* で効率的な骨再生を可能にする人工骨移植材料を創製することである。

3. 研究の方法

(1) 配向ゲルシステムを応用した新規骨移植材料の構築

配向ゲルシステム内で骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) を培養し、骨系細胞分化誘導法を確立したうえで、配向ゲル内に高度に配向した石灰化沈着の誘導を試みた。また、細胞を用いる生体材料を *in vitro* で迅速かつ効率よく作製するためには、材料内における細胞の機能制御(細胞増殖および細胞分化)を行う必要がある。そこで、配向ゲルシステムに加える培地添加物(液性因子)、および伸展応力を変化させた場合の、ゲル内細胞の機能

変化を評価した。液性因子として、BMSC 培養培地に骨系分化に有用な試薬(アスコルビン酸、デキサメタゾン、 β -グリセロフォスフェイト)や骨形成因子 (BMP2) あるいは、カルシウムイオンを添加し、骨系細胞に分化誘導した。さらに、機械的因子として配向ゲルに加える伸展応力を変化させてゲル内の細胞の機能制御を試みた。骨系細胞分化の評価にはオステオポンチン、オステオカルシンの骨分化マーカーを Real time RT-PCR 法によって定量評価した。これらの結果をもとに配向ゲル内 BMSC の迅速な骨系分化誘導法を確立した。さらに、上記検討で得られた培養条件を援用し、配向ゲル内での BMSC 由来骨基質沈着を誘導した。骨基質沈着の配向や分布は、液体窒素凍結切断法を併用した走査型電子顕微鏡観察、パラフィン包埋薄切切片に対するタイプ I コラーゲン免疫蛍光染色および von Kossa 染色の各結果を総合的に考察した。また、こうして得られた配向ゲル内の石灰化沈着について、微小 X 線回折装置を用いた定性評価を行った。

(2) 細胞集合体システムを用いた新規骨移植材料の構築

上記で得られた知見を援用して、配向ゲルシステムの改良を行い、より骨組織構造を模倣した生体材料の創生を試みた。これまでに本研究代表者らは、温度応答性高分子 (poly-N-isopropylacrylamide : pNIPAAm) ゲルを応用することによる二次元細胞シート作製法の開発に成功しており、この技術を改良することで細胞のみから構成される三次元細胞集合体の作製を試みた。また、この新規システムを応用することで任意のサイズ、形状を有した BMSC 集合体の作製を行った。さらに、BMSC 集合体の長期培養法を確立したうえで、生体骨組織内に近似した環境での石灰化沈着誘導を試みた。次に、BMSC 集合体の骨系分化誘導に適したサイズ決定を行うことを目的として、異なるサイズの pNIPAAm ゲルモールドを利用し、BMSC 集合体を作製した。これら異なる大きさの BMSC 集合体のパラフィン包埋薄切切片試料に対して、ヘマトキシリン・エオジン染色および核染色を行うことで、集合体構成細胞の生存について検討した。さらに、上記の結果を参考に骨系分化誘導を行うことで、細胞集合体に骨基質沈着を誘導した。骨基質や石灰化沈着の分布および産生過程は、薄切切片を作製して von Kossa 染色、あるいはアルシアンブルー染色を行い観察した。

4. 研究成果

(1) 配向ゲルシステムを応用した新規骨移植材料の構築

配向ゲルシステム内で、BMSC は高度に配向することが明らかとなった (図 1A)。また、配向ゲル内の BMSC は、ゲル線維束によって増殖方向が制限され、三次元ゲル内で一列の細胞群を構築することがわかった (図 1B)。

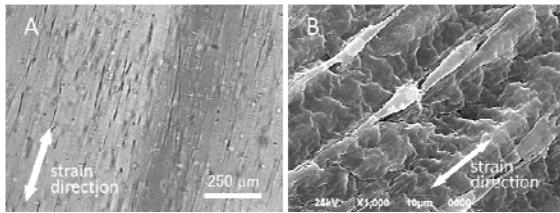


図 1. 配向ゲル内の BMSC

また、配向ゲルに加える応力を増加させることで細胞増殖が促進すること (図 2)、さらに、応力を減少させることで細胞分化が促進することを明らかとした (図 3)。このことから、配向ゲルに加える伸展応力を制御することで、ゲル内部の細胞機能制御が可能になることが明らかとなった。

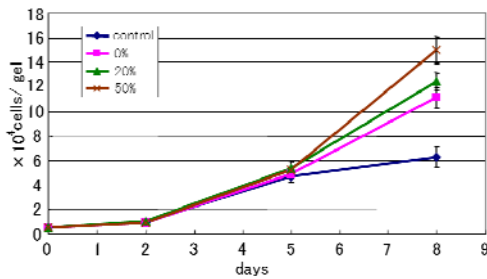


図 2. 伸展応力変化による細胞増殖の変化

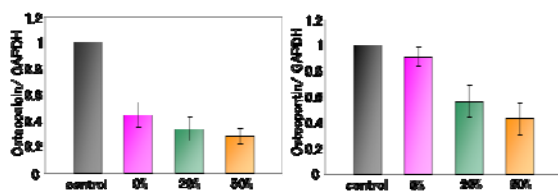
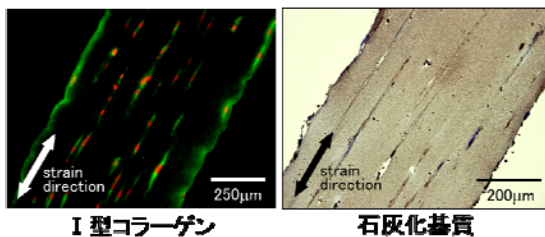


図 3. 伸展応力変化による細胞分化の変化

これらの方法を用いることで、配向ゲル内部に高度に配向した骨基質 (I 型コラーゲン) や石灰化基質沈着を誘導することに成功した (図 4)。配向ゲルシステムを応用することで作製した当材料は、生体骨組織を模倣した hidroキシアパタイト構造を具備しており、新規骨移植材料として有用である可能性が示された。



I 型コラーゲン 石灰化基質

図 4. 配向ゲルシステム内の骨基質

(2) 細胞集合体システムを用いた新規骨移植材料の構築

温度応答性高分子を用いることで、任意の形状を有するスキャフォールドを用いない細胞集合体を作製することに成功した (図 5)。

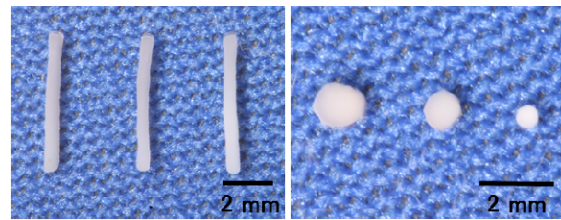


図 5. 任意形状の細胞集合

この集合体システムを応用し、生体骨組織の構造を高度に模倣した生体材料の創製に取り組んだ。具体的には、BMSC のみから成る細胞集合体を作製し、新規骨移植材料の創製に有用なサイズ、形状を検討した。その結果、直径 2.0 mm 以上のモールドで作製した BMSC 集合体内部の細胞の多くがアポトーシスを起こしていることが明らかとなり、以降の研究では直径 1.5 mm の球状のモールドを使用することとした。

次に、BMSC 集合体の培養培地に骨系分化に有用な試薬を添加して培養を行った。その結果、細胞集合体の中心部に石灰化基質、その周囲に軟骨基質が沈着したハイブリッド材料を作製することに成功した (図 6)。

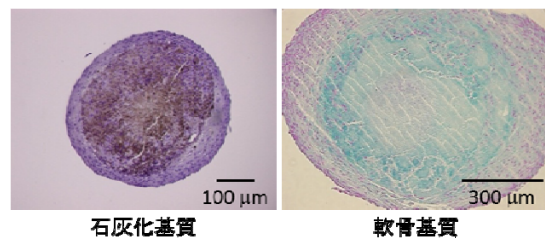


図 6. BMSC 集合体内の基質沈着

この細胞集合体を構成する BMSC を取り巻く環境について検討を行ったところ、低酸素および低栄養状態であることが分かり、これは生体骨組織に存在する BMSC と同様の環境であることが明らかとなった。また、中心部に形成された石灰化沈着について定性解析を行ったところ、骨組織の主成分である hidroキシアパタイトであることが示された。本研究で創製した細胞集合体は、生体内と同様の環境を *in vitro* において再現することで骨組織が構築可能な、生体骨組織を高度に模倣した新規材料である。本研究によって、細胞集合体が有用性の高い新規骨移植材料に应用可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

① An SH, Matsumoto T, Miyajima H, Sasaki JI, Narayanan R, Kim KH (2012). Surface characterization of alkali- and heat-treated Ti with or without prior acid etching. *Applied Surface Science* 258(10), 4377-4382. 査読有

② Matsumoto T, Mizuno A, Kashiwagi M, Yoshida S, Sasaki J, Nakano T (2011). Cell-based fabrication of organic/inorganic composite gel material. *Materials* 4(1), 327-338. 査読有

③ 佐々木淳一、松本卓也、江草 宏、矢谷博文 (2011). ハイドロゲルを応用した三次元配向組織の *in vitro* 構築. 大阪大学歯学会雑誌 55(2), 83-89. 査読無

④ Sasaki J, Asoh TA, Matsumoto T, Egusa H, Sohmura T, Alsberg E, Akashi M, Yatani H (2010). Fabrication of 3D cell constructs using temperature-responsive hydrogel. *Tissue Engineering Part A* 16(8), 2497-2504. 査読有

⑤ Nakamura S, Matsumoto T, Sasaki J, Egusa H, Lee KY, Nakano T, Sohmura T, Nakahira A (2010). Effect of calcium ion concentrations on osteogenic differentiation and hematopoietic stem cell niche-related protein expressions in osteoblasts. *Tissue Engineering Part A* 16(8), 2467-2473. 査読有

⑥ Sasaki JI, Matsumoto T, Egusa H, Nakano T, Ishimoto T, Sohmura T, Yatani H (2010). *In vitro* engineering of transitional tissue by patterning and functional control of cells in fibrin gel. *Soft Matter* 6(8), 1662-1667. 査読有

[学会発表] (計10件)

① 佐々木淳一、松本卓也、江草 宏、矢谷博文、今里 聡. 三次元細胞集合体を利用した内軟骨骨化の *in vitro* 再現. 第33回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11.21, 京都市)

② 萱島浩輝、江草 宏、佐々木淳一、中野環、矢谷博文. 規骨移植材料の開発を目指した歯肉由来 iPS 細胞の骨芽細胞分化誘導法の

確立. 第41回日本口腔インプラント学会学術大会 (2011.9.17, 名古屋市)

③ 萱島浩輝、江草 宏、佐々木淳一、裏口真也、于 冠男、王 放放、福安 翔、矢谷博文. 小分子化合物を用いた歯肉由来 iPS 細胞の骨芽細胞分化促進. 第120回日本補綴歯科学会学術大会 (2011.5.21, 広島市)

④ 綿本隆生、伊村沙織、佐々木淳一、江草宏、矢谷博文. 義歯床用レジンの表面性状は *Candida albicans* の抗真菌剤感受性に影響を与える. 第120回日本補綴歯科学会学術大会 (2011.5.21, 広島市)

⑤ 松本卓也、佐々木淳一、江草 宏、麻生隆彬、明石 満、今里 聡、矢谷博文. 温度応答性ハイドロゲルを用いた三次元細胞集合体の作製. 第50回日本生体医工学会大会 (2011.4.30, 東京都)

⑥ 佐々木淳一、松本卓也、江草 宏、矢谷博文. 細胞集合体を利用した硬組織生成過程の *in vitro* 再現. 第50回日本生体医工学会大会 (2011年4月30日, 東京都)

⑦ Kayashima H, Egusa H, Sasaki J, Yu G, Fukuyasu S, Yatani H. Enhanced osteogenesis of gingival fibroblast-derived iPS cells by small molecules. 89th General Session & Exhibition of the IADR (2011.3.16, San Diego, USA)

⑧ 松本卓也、佐々木淳一、江草 宏、矢谷博文. スキャフォールドフリー三次元細胞構造体の作製. 第56回日本歯科理工学会学術講演会 (2010.10.9, 岐阜市)

⑨ 佐々木淳一、松本卓也. ハイドロゲルを応用した三次元配向組織の構築. 第110回大阪大学歯学会例会 (2010.7.8, 吹田市)

⑩ 佐々木淳一、松本卓也、江草 宏、荘村泰治、矢谷博文. 生体骨組織を模倣した細胞配向構造を有する新規骨移植材料. 第119回日本補綴歯科学会学術大会 (2010.6.12, 東京都)

[その他]

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=2796&a2=0000007&k=%E4%BD%90%E3%80%85%E6%9C%A8&kc=1&o=affiliation&pp=50&sm=affiliation&sl=ja&sp=1>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 淳一 (SASAKI JUN-ICHI)
大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号：50530490