

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 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791945

研究課題名（和文） 積層化骨芽細胞シート - rhBMP による骨再生系の確立

研究課題名（英文） Bone regeneration by layered osteoblast cell sheets - rhBMP

研究代表者

林 達秀（HAYASHI TATSUHIDE）

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：70367621

研究成果の概要（和文）：本実験の目的は積層化した細胞シートを骨欠損部に移植することにより、同部位の再生を促すことである。まずは、温度応答性培養皿を用いてラット骨芽細胞（V-1細胞）をシート状に回収することを試みた。その際、処理温度を15℃～25℃まで1℃ずつ変えて試みたが、何れも部分的にしかシート状に回収できなかった。さらに、この部分的に回収した細胞シートの積層化を試みたが、きわめて困難であった。これらの結果から、温度応答性培養皿を用いて細胞をシート状に回収できるか否かは細胞の種類に依存すると考える。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to promote bone defect healing by layered osteoblast cell sheets implantation. First of all, temperature-responsive culture dishes were used to obtain cell sheets of rat osteoblast cells (v-1 cell). However, only partial cell sheets were obtained. Furthermore, it was quite difficult to make layered osteoblast cell sheets using these partial cell sheets. These results suggest that it depends on the type of cell cultured whether cell the sheet was successfully obtained or not.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医師薬学

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：再生歯学

1. 研究開始当初の背景

骨の実質欠損を再建する手法として、自家骨移植、他家骨移植の他にヒドロキシアパタイトやリン酸3カルシウムなどのリン酸カ

ルシウム系材料が骨補填材として臨床応用されている。また、組織工学（Tissue Engineering）的手法、即ち、細胞と細胞を生着・増殖させるための足場材料、および細胞を目的の細胞へ分化させるサイトカインを

上手く組み合わせることで臓器・組織の再生を促す方法もある。これまでの実験において、この組織工学的手法を用いて筋芽細胞と筋管細胞からなる未成熟筋組織から軟骨および骨誘導を試みてきた。その結果、特に ePTFE (expanded-Polytetrafluoroethylen) を Scaffold とした場合には軟骨を安定して誘導させることが可能となった。その後の継続した実験過程において、培養条件を変えることにより、同組織から *in vitro* で類骨と骨芽細胞様細胞からなる骨様組織を誘導させることが可能となった。さらに、*in vitro* で誘導された骨様組織をラットの背部皮下に移植したところ、移植 2 週間後にはこの骨様組織は骨化することが確認できた。

一方、近年 組織・臓器を再生する手法として細胞シート工学という新しい概念が再生医療に台頭した。これまでは、培養した細胞を回収する際にはトリプシンなどの酵素を用いてバラバラに細胞を回収せざるを得なかったが、温度応答性培養皿を用いることによって、細胞をシート状に回収することが可能となった。この温度応答性培養皿はその培養皿の表面に温度応答性ポリマー (PIPAAm) を固定化したものであり、32°C を境に細胞接着面が可逆的に疎水性⇄親水性に変化するものである。これにより、従来のように薬剤によって細胞を損傷させることなく細胞を回収することが可能となった。また、回収した細胞シートは細胞外マトリックスを保持しているため、移植の際に縫合が不要というのも特徴の一つである。

医科では既にこの手法が臨床応用されており、角膜、心筋、食道など各種 組織・臓器の再生が行われている。しかし、同手法による骨の再生に関する報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、温度応答性培養皿を用いて、まずはラット骨芽細胞をシート状に回収することを試みる。続いて、この細胞シートの積層化を試みる。さらに、作製した積層化骨芽細胞シートをラット頭蓋に作製した骨欠損部に移植し、骨の再生を促す。さらに、細胞シートを積層化時に各種リコンビナント BMP (以下、rhBMP) を添加した際に、骨の再生を助長する、あるいは治癒期間の短縮が可能かを検討する。

3. 研究の方法

(1) 培養準備

本研究ではプライマリーセルである Sprague-Dawley ラット頭蓋由来骨芽細胞 (以

下、V-1 細胞) を用いた。その前準備としてまずは 3.5×10^4 /ml の V-1 細胞を T-25 フラスコに播種しコンフルエントに達するまで培養した。

(2) 細胞シートの回収

1×10^5 個/ml の V-1 細胞を 48 穴の温度応答性培養皿に播種し、オーバーコンフルエントに達するまで培養した。培養終了後、培養液を吸引除去し、さらに細胞の乾燥を防ぐために 18 μ l の培養液を加えた後に CellShifter をウェル内に置き、15°C から 25°C まで 1°C ずつ温度を変えて 5 分間静置した。その後、CellShifter を培養皿よりピンセットを用いて剥がし、寒天ゲル上に置き 20°C で 1 分間静置した。再度 18 μ l の培養液を滴下後、CellShifter を寒天ゲルから剥がし、光学顕微鏡で観察した。

(3) 細胞シートの積層化

(2) と同様 1×10^5 個/ml の V-1 細胞を 48 穴の温度応答性培養皿に播種し、オーバーコンフルエントに達するまで培養し、培養液を吸引除去、18 μ l の rhBMP-2 を加えた後に CellShifter を 1 枚目のウェル内に置き、21°C で 5 分間静置した。また、静置終了 30 秒前に、2 枚目のウェルから培養液を除去し、1 枚目のウェルから剥がした Cellshifter を 2 枚目のウェル内に置き、再度 21°C で 5 分間静置した。さらに細胞シートの複数の積層化を試みる際には同様の作業を繰り返した。静置終了後、積層化した細胞シートを回収し、寒天ゲル上に置き 20°C で 1 分間静置した。再度 18 μ l の rhBMP-2 を滴下後、CellShifter を寒天ゲルから剥がし、その様子を光学顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 培養準備

T-25 フラスコに播種した V-1 細胞 (図. 1) は培養 7 日目でコンフルエントに達した。その後、細胞密度を 1×10^5 個/ml に調整し、48 穴の温度応答性培養皿に 250 μ l ずつ播種した。



図. 1 V-1 細胞 (培養 2 日目)

温度応答性培養皿上で培養した V-1 細胞は培養 10 日目でオーバーコンフルエントに達した。図. 2A に寒天ゲル上に細胞をトランスファーした図を示す。その際、処理温度は 25°C~15°C まで 1°C ずつ変えた。図. 2B に回収した細胞シートを示す (処理温度 21°C)。何れの温度においても部分的には細胞をシート状に回収することができたが、完全なシート状に回収することはできなかった。この理由として、V-1 細胞が形成する石灰化基質の影響による、即ち、石灰化基質が産生されたことにより細胞が培養皿により強固に接着したためと考える。また、使用した温度応答性培養皿は 48 穴 (1.1cm²/well) であり、CellShifter の直径は 8mm と小さなものであったことから、細胞と CellShifter との接触面積が小さかったために両者間において十分な摩擦力が得られなかったことも要因と考える。



図. 2A 各温度毎に CellShifter を用いて細胞を寒天ゲル上にトランスファーした様子



図. 2B 部分的に回収した細胞シート (処理温度: 21°C)

(3) 細胞シートの積層化

まずは通常通り、細胞をシート状に回収することを試みた。その際、従来は培養液除去後に細胞の乾燥を防ぐために培養液を添加するが、細胞シートを積層化後に動物実験に使用することを想定して、培養液を添加する代わりに 18μl の rhBMP-2 を添加した。また、寒天培地上に細胞をトランスファーした後

の処理温度は、これまでの実験において比較的良好な結果が得られた 21°C とし、本実験では細胞シート 2 枚から 5 枚の積層化を試みた。

図. 3A (マクロ) および 3B (位相差顕微鏡像) に細胞シートを 3 枚積層した図を示す。本来ならば円形を呈するはずであるが、部分的にしか細胞をシート状に回収できなかったために不定形を呈している。位相差顕微鏡像では立体的な構造を呈している様子が観察された。また、積層化は細胞シートの枚数が増すにつれて困難となった。これは (2) の実験結果と同様、部分的に回収された細胞シート間において十分な摩擦力が得られなかったためと考える。



図. 3A 3枚積層化した細胞シート (肉眼所見)

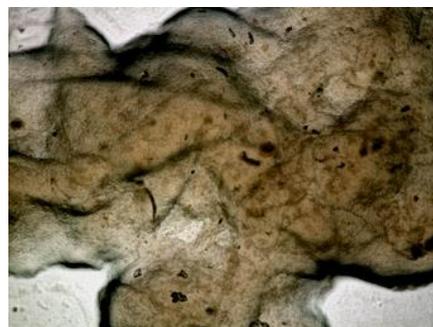


図. 3B 3枚積層化した細胞シート (位相差顕微鏡像)

(4) まとめ

温度応答性培養皿上を用いて線維芽細胞や筋芽細胞をシート状に回収、さらにはそれらの細胞シートの積層化、あるいは線維芽細胞シート間に血管内細胞を挟み込んだ血管内皮細胞の網目を持つ 3 次元組織を作製したといった報告は多数あるが、骨芽細胞に関する同様の報告は知るところではない。本研究プロジェクトにおいて、培養終了後細胞を CellShifter を用いてトランスファーする際の処理温度を詳細に変えるなど、様々な条件下で何度も細胞をシート状に回収すること、その積層化を試みたが、期待するような

結果は得られなかった。また、本研究プロジェクトを試みる際はラット頭蓋に骨欠損部を作製し、同部に積層化した細胞シートを移植しその治癒の様子を経時的に観察することまで計画していたがそこに到達するに至らなかった。

この温度応答性培養皿を用いて細胞をシート状に回収できるか否か、あるいは細胞をシート状に回収後積層化できるか否かは細胞の種類に大きく依存すると考える。

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)

[学会発表] (計2件)

① T. Hayashi, S. Kobayashi, A. Miki, H. Kataoka, T. Kawai. Bone-like tissue induced by rhBMP-2, rhBMP-4 and rhBMP-7 *in vitro* has ossification potential after implantation. 3rd TERMIS World Congress 2012, Vienna (Austria), 9. 5. 2012.

② T. Hayashi, S. Kobayashi, T. Asai, A. Miki, H. Kataoka, Y. Uematsu, T. Kawai. Promotion of rat calvarial defect healing by induced bone-like tissue. 90th IADR General Session & Exhibition, Iguacu Falls (Brazil), 6. 20. 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 達秀 (HAYASHI TATSUHIDE)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号：70367621

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：