

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82626
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659733
 研究課題名（和文） 血管内皮細胞と骨髄細胞の共存培養系による骨再生に関する研究
 研究課題名（英文） Study of Coculture System of Vascular Endothelial Cells and Bone Marrow cells
 研究代表者
 植村 寿公（TOSHIMASA UEMURA）
 独立行政法人産業技術総合研究所・ナノシステム研究部門・上級主任研究員
 研究者番号：60176641

研究成果の概要（和文）：組織工学による再生骨は骨グラフトに代わる技術として注目されているが、臨床応用可能な大きさや形を持つ骨の再生は、血管を伴わないと難しい。本研究では、骨髄細胞(MSCs)と骨髄由来血管内皮細胞(ECs)とを多孔性細胞足場材料に播種し、RWVバイオリアクターによる3次元培養を行うことにより、血管を伴う骨組織の再生に成功した。RWVバイオリアクターによる回転培養によって、MSC由来のECsは足場材料中に、vWFの免疫染色、フローサイトメーターによるCD31の発現により確認できた。再生組織は、トルイジンブルー、ヘマトキシリン-エオジン染色、オステオポンチン、オステオカルシンの免疫染色、トマトレクチン染色により解析した。その結果、血管を伴った骨組織が再生されていることが確認できた。RWVバイオリアクター中の培地の流れ、MSCs、ECsの相互作用がうまく作用して、血管を伴った3次元骨組織が再生できたものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Tissue-engineered bone has attracted much attention as an alternative material for bone grafting; however, implantable bone tissue of an appropriate size and shape for clinical use has not yet been developed due to a lack of vascularization, which results in necrosis of the seeded cells in vivo. This is the first report of bone tissue engineering associated with vascularization by co-culturing bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) with MSC-derived endothelial cells (ECs) within a porous scaffold using a rotating wall vessel (RWV) bioreactor. MSC-derived ECs were identified by immunofluorescence staining for von Willebrand factor (vWF) and by flow cytometry for CD31 expression. The tissue obtained was histochemically analyzed using toluidin blue, hematoxylin and eosin, anti-osteopontin antibody, anti-osteocalcin antibody, and tomato-lectin stain. Results showed that bone tissue containing vascular-like structures was generated. Three-dimensional culture condition created by medium flow in the RWV vessel and the interaction of MSCs with MSC-derived ECs might provide the cells an advantage in the construction of three-dimensional bone tissue with blood vessels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：骨再生、血管内皮細胞、骨髄細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、骨欠損の治療法としては、自家骨移植が一般的に用いられている。しかし、移植できる大きさ、形の骨が準備できない、または移植用の骨を得るためにさらに侵襲的な手術を行わなくてはならないなどの問題がある。そこで、移植用の骨を組織工学的に作製することが注目されている。また、三次元組織は薬剤スクリーニングや動物実験モデルの代替法に利用することも検討されている。三次元培養法では、従来の二次元培養法（細胞培養皿上での培養など）に比べ、生体内に近い環境で細胞を培養できるため、実際の組織の細胞に近い機能を持たせることができる。

組織再生において、血管をもたない移植組織は、組織が生存するために必要な酸素及び栄養素などを組織内部に送達することができないため、移植後に内部が壊死することが問題となっている。軟骨組織や水晶体など一部を除き、組織を三次元的に構築・移植する際には組織内に速やかに血管ネットワークが構築される必要がある。組織工学的に構築した組織の生体内への移植の試みはこれまでも報告されているが、移植した組織への宿主由来の血管の侵入に時間がかかり、移植組織が壊死する場合がある。そこで、血管様構造を備えた三次元骨組織を生体外で構築して移植することにより、移植後に組織内への宿主側からの血管侵入を待つことなく、速やかに血管ネットワークが構築されることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では骨髄間葉系幹細胞と骨髄間葉系幹細胞由来の内皮細胞を共培養することにより、*in vitro*で血管を備えた三次元骨組

織の再生を目指した。細胞ソースとしては骨髄細胞を利用する。骨髄幹葉系細胞(MSC)は比較的採取が容易であり、増殖能力も高い。また、MSCは骨に分化するだけでなく、内皮細胞へ分化することも報告されている。さらに、血管周囲の細胞の良い供給源となり血管を安定化させることができる。すなわち、MSCは骨成分の細胞を供給し、さらに血管を形成、安定させることが期待できる。さらに、培養方法としては回転培養装置(Rotating wall vessel (RWV) bioreactor)を利用して三次元培養を行った。RWV回転培養装置は、アメリカ航空宇宙局(NASA)によって開発されたガス交換機能を備えた1軸式の回転式培養装置である。RWV回転培養法を用いることにより、細胞は三次元的に増殖すること(三次元細胞培養)が可能である。通常の細胞培養皿上で培養することによって得られる組織モデルと比べ、三次元細胞培養では、より生体内に近い培養環境を実現することができるため、培養組織は実際の組織に近い機能をもつことができる。

3. 研究の方法

(1)骨髄間葉系幹細胞(MSC)から内皮細胞への分化

日本白色家兔(JW/ SCK、10日令、メス)より骨髄細胞を採取し、T-75 フラスコ(底面積: 75 cm² (BD))に播種した。1-3週間培養後、T-25 フラスコ(底面積: 25 cm² (BD))に2 x 10⁵ cells/cm²の濃度で継代した。骨髄細胞の培養は、 α -MEM (Sigma) with 10% FBS 中で行い、継代後は内皮細胞用培地(EGM-2-MV medium (Lonza))中で行った。

次に、播種してから3日後と1週間後の細胞をガラスボトムディッシュ(底面積: 1 cm² (IWAKI))に継代し、24時間培養した。リン酸緩衝液(PBS)で洗浄後、4%パラホルムアルデ

ヒドリン酸緩衝液で固定し、0.2% Triton x-100/ PBS 溶液と 1% FITC-conjugated anti-von Willebrand factor antibody (Sheep polyclonal (abcam)) / PBS 溶液を 30 分間反応させた。染色の様子は蛍光顕微鏡を用いて観察した。得られた画像の蛍光強度は Axio Vion Rel 4.6 を用い、細胞の面積あたりの蛍光強度を測定し、分化前の MSC の蛍光強度を基に定性的解析を行った。各サンプルから 8 個の細胞を無作為に選び出し、その平均値を求めた ($n = 1$)。

さらに、播種してから 1 週間後の各細胞表面上における CD31 (platelet cell adhesion molecule (PECAM)) の発現を FACS (BD FACS Aria™セルソーター)により解析した。各細胞を 1×10^6 cells ずつ回収し、PBS で洗浄した後に、氷上の PBS with 2% FBS 中で 1% FITC-conjugated anti-CD31 antibody (Mouse monoclonal (WM-59) (abcam)) と 30 分間反応させた。PBS で洗浄後、PI (Propidium Iodide: 200 μ g/mL) を加え、FACS で解析した。30000 events を調べ、ヒストグラムには 5000 events を表示した。

(2) 骨髄間葉系幹細胞 (MSC) と骨髄間葉系幹細胞由来内皮細胞 (MSC-derived EC) の回転培養

準備した MSC-derived EC を OPLA® Scaffold (BD) (5 mm ϕ x 2 mm) に播種し (1×10^6 - 5×10^7 cells)、減圧 (100 mmHg, 5 min) により細胞懸濁液を Scaffold 内部へ取り込ませた。3 時間培養後、回転培養装置 (Rotating wall vessel (RWV) bioreactor) で培養を行った。1 週間 EGM-2-MV medium 中で培養を行い、MSC を播き足し (1×10^6 - 5×10^6 cells)、さらに 1 週間、骨分化誘導培地で培養した。培地は 3 日おきに交換した。また、回転速度は組織の沈降の様子を確認しながら上昇させた (7.5-12 rpm)。

(3) 組織学的評価

各組織を 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液中で固定 (4° C、1 週間)、0.1 M tris-0.5 M EDTA 溶液で脱灰 (25° C、1 週間) を行い、パラフィンに包埋した後にマイクローム (Leica, RM2135) で切片 (5 μ m) にした。各切片を脱パラフィンした後、Toluidin blue、Hematoxylin and eosin (HE)、Alizarin Red S で染色し、組織学的評価を行った。また、脱パラフィン後、proteinase K 溶液 (Dako Cytomation) でタンパク質を除去し、Peroxidase Blocking Regent (Dako Cytomation)、Blocking Regent (Roche Diagnostics) と反応させた後に、Fluorescein Lycopersicon Esculentum (Tomato) Lectin (Vector Laboratories) で免疫染色を行った。

(4) 調製した組織の骨形成能の検討

免疫不全ラット (F344/NJcl-rnu/rnu、8 週齢、雄) の左右の大腿骨の内側に孔を開け左大腿骨に試験物質を埋植し、右大腿骨は埋植せず非移植群とした。

ペントバルビタール酸 Na (ソムノペンチル、Lot No. 8546101, 共立製薬株) を 25mg/kg の割合でラットの腹腔内に投与して麻酔を行なった。維持麻酔として V1 (VetEquip 社) を用いて、イソフルラン (エスカイン®、製造番号 0460YS、マイラン製薬株) を麻酔薬として吸入麻酔した。大腿骨への埋植は、外側部から皮膚、筋肉を 20-25mm 切開し、直径 0.5mm のドリル針で骨幹端部のほぼ中央部分に孔を開けた後に、 ϕ 約 2mm のドリルで窩を作製して被験物質を埋植した。

術後は化膿の防止のために 5 日間、こまめに術部をイソジンで消毒し、抗生物質としてはペニシリン G カリウム (Lot No. PGSD205, 明治製薬株) を、鎮痛剤としてはレペタン注 0.2mg/mL (Lot No. 9D85L2, 大塚製薬株) を

20 μ g/0.1mL/kg の割合で皮下投与した。

全生存例について、ペントバルビタール酸 Na の過麻酔下で安楽死させ、左右の大腿骨を被験物質ごと採取した。各生存例の左右大腿骨は股関節および膝関節で切り離し、1本のまま採取し、部分的に切断せずに摘出して余分な筋肉を除去し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液に浸し、試験番号、動物番号等を記載したラベルを添付した容器に4°Cで保存した。

最後に、凍結切片を作製し、各切片を Toluidin blue, HE, Osteopontin, Osteocalcin, Arizalin Red S で染色し、組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) 骨髄間葉系幹細胞 (MSC) から内皮細胞への分化の検討

骨髄細胞から内皮細胞への分化を確認するため、von Willebrand factor (vWF) による蛍光免疫染色と、細胞表面の CD31 の発現を FACS により解析した。vWF の免疫蛍光ラベルの結果より、 1×10^4 、 2×10^5 cells/cm² で播種された細胞は、培養するにつれ蛍光強度が増すことが確認された。しかし、 1×10^3 cells/cm² で播種した細胞の場合、培養1週間では蛍光強度の増加は観察されなかった。また、1週間培養した細胞の CD31 の発現を調べたところ、 2×10^5 cells/cm² で播種された細胞は 1×10^3 、 1×10^4 cells/cm² で播種された細胞に比べ、CD31 を多く発現していた。CD31 は内皮細胞が成熟してから発現するマーカーとして知られているため、 1×10^4 cells/cm² で播種された細胞は1週間の培養では成熟していないと考えられる。以上より、高濃度で細胞を播種して培養することで、分化を促進できることが確認された。

(2) RWV 回転培養装置を用いて血管内皮細胞用培地中で培養した組織の解析

RWV 回転培養装置を用いて血管内皮細胞用培地中で培養した組織の解析を行った。HE 染色の結果より、細胞は足場材料の外周のみではなく、中心部にも存在することが確認された。また、切片像および切片像の Image 解析より、足場材料に対して播種した細胞数が増加するにつれ、培養1週間後の組織の切片内の細胞が占める領域が増加することが確認された。しかし、 5×10^7 cells/scaffold の濃度で播種した組織では、培養1週間後の組織中に壊死した部分が観察された。

また、レクチン染色の結果より、 1×10^7 cells/scaffold 以上の播種数では、血管様構造 (直径約 20 μ m) が観察された。これらの構造には分岐している像も観察された。

(3) RWV 回転培養装置を用いて骨分化誘導培地中で培養した組織の解析

次に、骨髄間葉系幹細胞由来内皮細胞 (5×10^6 cells) を1週間 EGM2-MV 培地中で培養し、MSC (5×10^6 cells) を播き足した後に、骨分化誘導培地で1週間培養した組織 (Figure 4 (a)) の組織学的染色を試みた。

トルイジンブルー染色の結果より、足場材料内に直径約 1.2 mm の組織が構築されていることが確認された。さらに、骨分化誘導マーカーであるオステオポンチン及びオステオカルシンで切片を染色すると、陽性を示すことが確認された。さらに、レクチン染色より、骨分化誘導培地中で培養した組織においても血管様構造が観察された。

(4) 調製した組織の骨形成能の検討

調製した組織を免疫不全ラットの骨欠損部位に移植することにより、組織の骨形成能を検討した。トルイジンブルー染色、ヘマトキシリン・エオジン染色像より、非移植群では移植後3週間では穴はほとんど埋まらなかったが、移植群では移植後3週間で穴が埋まっていた。以上より、調製した組織を移植す

ることにより、骨形成を促進させられる可能性が示された。

(5)まとめ

本研究では、回転培養装置を利用して *in vitro* での骨組織の構築を目指した。骨髄間葉系幹細胞と骨髄間葉系幹細胞由来の内皮細胞を共培養すること、さらに scaffold の使用や段階的な播種方法により、生体外で血管様構造を備えた三次元骨組織の構築に成功した。また、この組織を免疫不全ラットの骨欠損部位に移植し、生体内での骨再生を観察したところ、非移植群に比べて骨再生能が高いことが確認された。本研究の組織工学・再生医工学的アプローチが、低侵襲な治療法の1つに寄与することを期待したい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Masanori Nishi, Rena Matsumoto, Jian Dong, Toshimasa Uemura, Engineered bone tissue associated with vascularization utilizing a rotating wall vessel bioreactor. J Biomed Mater Res A. 101(2):421-427 (2013).
- ② Masanori Nishi, Rena Matsumoto, Jian Dong, Toshimasa Uemura, Effects of implantation of three-dimensional engineered bone tissue with a vascular-like structure on repair of bone defects. Applied Surface Science 262, 60-63 (2012)
- ③ Masanori NISHI, Rena MATSUMOTO, Jian DONG, Toshimasa UEMURA, Regeneration of Bone Tissue in a Controlled *in Vitro* Environment with a Rotating Wall Vessel Bioreactor, Nano Biomedicine 3(2) 267-274 (2011)

[学会発表] (計11件)

- ① 植村寿公、RWV微小重力培養を用いた3次元組織の構築と再生医療、第25回バイオエンジニアリング講演会(招待講演)、2013.1.9
- ② 植村寿公、RWVバイオリクターによる擬微小重力培養法を用いた3次元硬組織の再生技術、日本再生歯科医療学会設立10周年記念セミナー(招待講演)、2012.9.2(兵庫県)

[図書] (計1件)

- ① Toshimasa Uemura, Masanori Nishi, Kunitomo Aoki, Takashi Tsumura, Cartilage Regeneration from Bone Marrow Cells and its Automation System for Clinical Application, TISSUE ENGINEERING FOR TISSUE AND ORGAN REGENERATION ed by Daniel Eberli, INTECH, 2011, pp216-222

6. 研究組織

(1)研究代表者

植村寿公 (TOSHIMASA UEMURA)

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノシステム研究部門・上級主任研究員

研究者番号：60176641