

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659907

研究課題名(和文)最適空間を有する細胞基盤に反重力刺激を加えた幹細胞培養法の開発

研究課題名(英文)Stem cell culture system with optimal spaces and anti-gravitational stimuli

研究代表者

久保木 芳徳(KUBOKI, Yoshinori)

北海道大学・名誉教授

研究者番号：00014001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：各種の3次元培養法は、細胞基盤の体積が増すほど循環が不足するので、動力学的要素が必要となる。我々は最も単純に重力を力学刺激として応用する目的で培養皿を反転する反重力法を考案しその装置を発明した。本装置内によれば市販35 mm培養皿上で細胞を通常为正重力方向とそれを反転した反重力方向とで、形態学的、生化学的に比較分析できる。また、あらゆる3次元細胞基盤にも適用できる。該当年度では、骨原細胞MC-3T3 E1およびがん細胞MG63を用いた。その結果、反重力下では形態的な特性あるパターン形成のみならず、アクチンおよび、コラーゲンがRNAレベルで、正重力下の10～20倍以上に増大することを確認できた。

研究成果の概要(英文)：We report here a new invention of an anti-gravity device for cell culture, in that we can invert the position of conventional culture dishes up-side-down in the culture medium. Also, we can rotate the 3D scaffolds of any kind in culture medium by this device. Our hypothesis is: if we change the direction of gravitational force on cell systematically, we can eventually detect the effects of gravity on the behaviors of cells. In this paper we described the details of the structures and concept of anti-gravitational device, and also some of the preliminary results of application of the device for osteoblasts MC-3T3 E1 and cancer cells MG 63. Results included remarkable morphological changes of the cells under the anti-gravitational environment, with 10-20 times higher RNA values of actin and collagen, indicating to tal rearrangement of cyto-skeletons and protein productions.

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：3次元培養 アクチン コラーゲン 骨原細胞 反重力装置 チタン不織布 チタン結合蛋白 反重力効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々が提案してきた「最適空間理論」によれば、各種の細胞は、生体外で増殖分化するためには、それぞれ最適の幾何学的構造と、特定の最適空間を必要とする。骨芽細胞においては、直径 0.3~0.4 mm の空間の広がりが必要であることを我々は既に証明した。空間の形はトンネル、あるいはチャンパー型の空間が極めて効率的であったが、一方、太さ 50-80 ミクロンのチタン微細繊維の不織布(チタンウエブ、以下 TW) が形作る繊維間空間も重要である。なぜなら、チタンは唯一の骨伝導性金属として広く臨床応用されているからである。このようにして、トンネル型 T C P (Nano Biomedicine 2009 1(2), 85-94, 2009) の内部に、顕著な血管新生と、それに伴い骨新生を示してきた(第 27 回日本骨代謝学会抄録 202 頁 2009 年)、トンネルに全方向性を与えた「ランダム・トンネル型」はさらに骨形成の効率がよい。一方、ポリウレタンフォームをレプリカとしたセラミック「チャンパー型スカフォールド」(第 42 回結合組織学会・第 57 回マトリックス研究会抄録 74 頁 2010 年)、そして TW での骨形成効率が良いことも、動物実験で実証してきた。

(2) しかしながら、これらの 3 次元スカフォールドを培養細胞に基盤に利用する際には、基盤が大きくなる程、培地の還流効率は低下するので、そこには動力学的要素が必要である事がわかった。その目的で、最も簡単に、重力を動力学刺激負荷に応用する「反重力」装置の発明し、上記の 3 次元スカフォールドと組み合わせて、より生体に近い培養系で骨芽細胞を培養する計画を樹立した。

2. 研究の目的

(1) 平板上に静置させて細胞を育てるという従来の培養方法では、幹細胞など若い細胞(ES 細胞、骨芽細胞の前駆細胞を含む)を育て再生医に応用するには十分ではない。な

ぜなら、これらの細胞は、強力な分化・増殖能をもつため、生体により近い立体的環境と動力学要素を必要とするからである。応募者はこの点に早くから気づき、これまで 10 種類以上の立体的細胞基盤(人工立体マトリックス)を開発してきたが、これらのマトリックスでの細胞育成には動力学刺激が必須であった。

(2) そこで、今回、新しく反重力培養装置を開発したので、これによって自らが開発したチタン不織布である TW、ならびにトンネル型に並びにチャンパー型の細胞基盤に動力学刺激を加え、骨芽細胞の骨形成能の増強を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 直径 35mm の市販培養皿に細胞を播種・定着後、皿ごと 180 度反転させて重力方向を反転させる、いわゆる「久保木式・反重力培養装置」を用いて培養を行う。既に試作装置にて反重力培養の方が従来型の正重力培養よりも、骨芽細胞 MC3T3-E1 の増殖効率が高いことを確認しているので、今研究年度内には骨髄由来幹細胞も加えて、骨形成関連分子、接着分子、細胞骨格分子の遺伝子発現を経時的に追究する。そのために「反重力培養装置」の改良型を製作する(豊田電子工機製作所)。本装置によって培養して得た細胞から RNA を抽出して分析する。分析結果を総合して、重力が、骨芽細胞の分化と増殖にどのように関連しているかを明らかにする。

(2) さらに、最初に集中して行う「静止型」の反重力装置のほかに、重力の方向を回転によって変動させる「変動重力型

」を用いた実験に集中する。変動型装置はとくに、還流効果が加わるので3D細胞基盤に顕著な効果を示すことを既に確認している。そこで申請者開発の「ランダム・トンネル」および「チャンパー型」に加えて、「チタン不織布、TW」も重点的に用いて3D培養基盤で培養を行い、増殖・分化に最適の回転速度、回転方法を検討する。用いる細胞については、E1細胞の他に骨肉腫由来MG63細胞並びに市販のマウスES細胞について、変動型装置を用いて得られた結果を取りまとめ、成果の発表を行う。

4. 研究成果

(1) 3次元支持体TWでの反重力培養に関し顕著な予想以上の成果を得た。MC3T3細胞を直接3次元細胞支持体であるTW内に播種し、チタンメッシュ製の保持装置に挟んで1/4(90度)交互連続回転をかけた結果、非回転の対照に比較して細胞増殖の増大のみならず、コラーゲン産生が3.2倍に増大した。この機構を追求すべくTWと蛋白との反応を分析した結果、リン酸を含む蛋白一般がチタンと結合するという画期的な現象を発見した。骨の特徴的成分であるリン蛋白もチタンに結合するので、骨リン蛋白をコートしたTWをラット頭骸骨に埋植すると、非コート対照よりも遥かに高い骨量を形成した。この発見の重要性に鑑み、TWとリン蛋白複合体の反重力効果を、期間延長して研究続行するにした。

培養皿に静止状態での反重力効果は、まず形態的に認めることができた。すなわち骨原細胞MC3T3 E1細胞において、天井位置にある反重力下の細胞群(以下、天井細胞)は、列をなして盛り上がって増殖し、「堤防(bank)」を作り、その堤防状構造物が「うねり」を形成するほか、円を作り「池」の土手状の構造を形成する傾向を示した。ガン細胞MG63では「堤防」と「池」がいっそう顕著にあらわれた。これは、がん細胞が正常細胞よりも、接着能に劣ることに由来すると推定

される。E1細胞のRNAのリアルタイム測定の結果、細胞骨格であるアクチンが、天井細胞では、床細胞の20倍に増大したことは、反重力下においては、天井から脱落に抵抗して、アクチン線維の細胞骨格がより活発に作動するためと推定される。

(2) また、MC3T3 E1細胞培養皿の天地回転を続けた際、興味深い点は、天地を一方向に連続回転した場合と、1/4(90度)交互連続回転した場合とを比較したところ、後者の増殖が、2倍に増大したことである。交互回転効果の発見は明瞭であり実用性がきわめて高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Yoshinori Kuboki, Toshitake Furusawa, Masaaki Sato, Yongkun Sun, Hidero Unuma, Shigeaki Abe, Ryuichi Fujisawa, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Hiroko Takita, Rachel Sammons: Bone enhancing effect of titanium-binding proteins isolated from bovine bone and implanted into rat calvaria with titanium scaffold, *Biomedical Materials and Engineering*, 査読有, Vol. 24, Number 3, 2014, pp. 1539-1548, DOI 10.3233/BME-140958

Zhikun Guo, Shouhei Iku, Lingmin Mua, Yufeng Wangd, Takaki Shimab, Yasuo Sekib, Qiong Lia and Yoshinori Kuboki. Implantation with new 3D-porous titanium web for treatment of parietal bone defect in rabbit, *Artificial Organs*, 査読有, Vol. 37, No. 7, 2013, pp. 623-628, doi: 10.1111/aor.12058. [Epub ahead of print]

Saito A, Saito E, Kuboki Y, Kimura M, Nakajima T, Yuge F, Kato T, Honma Y, Takahashi T, Ohata N, Periodontal

regeneration following application of basic fibroblast growth factor-2 in combination with beta tricalcium phosphate in class III furcation defects in dogs. Dent Mater J. 2013; 32(2): 256-62

Yoshinori Kuboki,

Toshitake Furusawa, Masaaki Sato, Sun Yongkun, Hidero Unuma, Ryuichi Fujisawa, Shigeaki Abe, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Hiroko Takita, Rachel Sammons, Interaction between titanium and phosphoproteins revealed by chromatography column packed with titanium beads, Bio-Medical Materials and Engineering, 査読有, Vol. 22, No. 5, 2012, pp. 283-288

DOI: 10.3233/BME-2012-0718.

Zhikun Guo, Shouhei Iku, Zheng Xianjie, Rachel, L. Sammons, Yoshinori Kuboki, Three dimensional geometry of honeycomb collagen promotes higher beating rate of myocardial cells in culture, Artificial Organ, 査読有, Vol. 36, No. 9, 2012, pp. 816-819,

DOI: 0.111/j.1525-1594.2012.01446.x.

Saito E, Saito A, Kuboki Y, Kimura M, Honma Y, Takahashi T, Kawanami M., Periodontal repair following implantation of beta-tricalcium phosphate with different pore structures in class III furcation defects in dogs

Dent Mater J. 査読有、 2012, Vol. 31, No. 4, 681-688

Hirota M, Hayakawa T, Ametani A, Kuboki Y, Sato M, Tohnai I.: The effect of hydroxyapatite-coated titanium fiber web on human osteoblast functional activity, Int J Oral

Maxillofac Implants, 査読有, 2011, Vol. 26, No.2, 245-250.

M. P. Neupane, S. J. Lee, S. Park, M. H. Lee, T. S. Bae, Y. Kuboki, M. Uo, F. Watari: Synthesis of gelatin-capped gold nanoparticles with variable gelatin concentration, J Nanopart Res, 査読有, 2011, Vol. 13, 491-498, DOI 10.1007/s11051-010-9971-9

Yagami K, Shirota T, Shintani S, Mayahara M, Nishizawa M, Yanagisawa S, Sammons R, Kuboki Y, Honeycomb form β -tricalcium phosphate induces osteogenesis by geometrical property with BMSC, Biomed Mater Eng. 査読有 2011, Vol. 21, 5-6, 291-306. doi: 10.3233/BME-2012-0677.

〔学会発表〕(計 11 件)

久保木芳徳, 古沢利武, 鶴沼英郎, 劉闖, 藏崎正明, 中沖靖子, 藤澤隆一, 阿部薫明, 滝田裕子 Rachel Sammons, 反重力培養装置とチタン製不織布とを併用したチタン結合蛋白質の培養系での活性検出, 第26回代用臓器再生研究会、2014-3-1 北海道大学・医学部 (札幌市)

八上公利、定岡直、久保木芳徳、小野寺純、松永未知男、木村満利子
幾何構造による骨組織誘導能を持つアテロコラーゲンコート -TCP 担体による骨形成能の評価
第12回日本再生医療学会総会
2013-3-21 横浜市西区みなとみらい パシフィコ横浜 (会議センター)

久保木 芳徳, 古沢 利武, 佐藤 正明, 孫 永琨, 鶴沼 英郎, 滝田 裕子, 中沖 靖子, 藤澤 隆一, 阿部 薫明, 赤坂 司, 巨理 文夫, 小川 真吾, R.L.Sammons

チタンとタンパク質の反応についてー その基礎と応用
生物物理学学会北海道支部会
2013-3-5 北海道大学・理学部（札幌市）

久保木 芳徳, 古沢 利武, 佐藤 正明, 孫永琨, 鶴沼 英郎, 滝田 裕子, 藤澤 隆一, 阿部 薫明, 赤坂 司, 巨理 文夫, Rachel L. Sammons,
チタン製の人工骨・人工歯根が骨に結合する生化学的メカニズム、第25回代用臓器・再生医学研究会、2013年2月23日 社会医療法人北楡会 札幌北楡病院内（札幌市）

Yoshinori Kuboki, Toshitake Furusawa, Masaaki Satou, Sun Yongkun, Hiderou Unuma, Ryuichi Fujisawa, Shigeaki Abe, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Hiroko Takaita and Rachel L. Sammon
Biochemical Mechanism of Binding between Titanium Implant and Bone: Interaction of Phosphoproteins on the Surface of Titanium
9th World Biomaterials Congress
2012-6-2, Pride International Convention Centre, Chengdu, China

久保木芳徳, 古沢利武, 佐藤正明, 孫永琨, 鶴沼英郎, 阿部薫明
チタン反応性タンパク質をクロマトグラフィーと質量分析によって血清中より検出した。第9回日本バイオマテリアル学会 2011年11月22日京都テルサ（京都市）

久保木 芳徳, 古沢 利武, 佐藤 正明, 孫永琨, 鶴沼 英, 滝田 裕子, 藤澤 隆一, 阿部 薫明, 赤坂 司, 巨理 文夫
タンパク質とチタンの反応: インプラント定着の機構解明を目指して
北海道歯学会秋期例会 北海道大学 歯学部講堂（札幌市）
2011年11月19日

久保木芳徳, 孫永琨, 滝田裕子, 賀来亨, 西村浩之, 菊地敦紀
反重力装置による骨芽細胞に対する重力効果の研究

第19回顎顔面バイオメカニクス学会 2011年11月12日、大阪千里ライフサイエンスセンター（豊中市）

久保木芳徳, 滝田裕子, 賀来亨, 西村浩之, 八上公利, 安孫子宜光
最適空間を有する人工マトリックスに、新しい反重力装置を組み合わせた生体により近い3次元培養システムの構築
第53回歯科基礎医学会・学術大会 2011年..9月31日岐阜県長良川国際ホテル（岐阜市）

久保木芳徳, 孫永琨, 滝田裕子, 賀来亨, 西村浩之, 菊地敦紀, 小川真吾, 八上公利
反重力装置の創製による骨芽細胞に対する重力効果の研究
第29回日本骨代謝学会 2011年7月28日大阪国際会議場（大阪市）

Yoshinori Kuboki, Toshitake Furusawa, Masaaki Satou, Sun Yongkun, Hiderou Unuma, Shigeaki Abe, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Hiroko Takita, Rachel Sammons, A serum protein that interacts with the surface of titanium was identified as b-casein precursor by chromatography and mass, The 3rd International Symposium on Surface and Interface of Biomaterials (SIB2011),
2011年7月12日、北海道大学国際交流会館（札幌市）

〔図書〕(計 3 件)

久保木芳徳, 古沢利武, 鶴沼英郎: チタンビーズ充填カラムクロマトグラフィーによるチタンとリン蛋白質との相互作用 - 骨中に埋植されたチタン表面と骨が結合する生化学的機構の解明 - (バイオマテリアル最新の進歩) 金属学会 2014 印刷中

久保木芳徳、八上公利、小川真吾、滝田裕子、
蔵崎正明：技術情報協会、生体に近い培養
法：3次元環境と反重力刺激の融合（動物細
胞の培養を成功させる条件集）2014，総頁
584，分担頁 123-138，

Kuboki, Y., Fujisawa, R., Watari, F. and
Sammons, L. R.: Impact of carbon nanotubes
upon protein chemistry. In Navam S.
Hettiarachchy (Ed), Food Protein and
Peptides (Chemistry, Functionality,
Interactions, and Commercialization),
CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca
Raton, London, New York, 2012, pp.454,
(pp. 423-429)

〔産業財産権〕
出願状況（計 1 件）

名称：チタン-タンパク質複合体、
生体インプラントおよび細胞培養機材

発明者：久保木芳徳、古澤利武
権利者：久保木芳徳、古澤利武
種類：
番号：特願 2012-124582
出願年月日：2012年5月31日
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保木 芳徳 (KUBOKI, Yoshinori)
北海道大学・名誉教授
研究者番号：00014001

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者
無し