

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659874

研究課題名(和文) 三次元細胞集合体を用いた粘膜・骨複合組織の *in vitro* 生成研究課題名(英文) *In vitro* fabrication of epithelial/bone tissue complex using 3D cell construct

研究代表者

松本 卓也 (Matsumoto, Takuya)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40324793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では上皮、間葉それぞれの細胞を原料にした厚みのある三次元細胞集合体を作製し、この作製シートの *in vitro* 特殊培養を通じた分化、成長制御により、三次元生体組織様移植材、特に粘膜組織と骨組織それぞれの *in vitro* での製作を目指した。研究の結果、厚みのある骨髄間葉系幹細胞シートを用いた骨系組織を *in vitro* にて誘導することに成功した。さらに、このシステムを利用することで *in vivo* にて配向骨組織を構築できることも示した。これら技術と生成する上皮組織との複合化により、これまでにない新しい移植材の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to fabricate cell aggregates constructed with epithelial cells and mesenchymal cells, and to lead the constructed cells to biological tissue including epithelial tissue and bone tissue. By using mesenchymal stem cell aggregates, we have succeeded in fabricating bony like tissue *in vitro*. Moreover, we have also succeeded in making an oriented bone formation in back of mouse by using this system. Thus, by combining with epithelial tissue layer, which is now under construction, these *in vitro* fabricated tissue would be a promising tool as a new implantable material.

研究分野：医歯薬

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：細胞操作 骨組織 上皮組織 細胞集合体 組織工学

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は、胎生期第二鰓弓突起部の閉鎖癒合不全を原因とする先天性形態異常であり、その結果、口腔と鼻腔が機能的に分離されず、摂食障害や構音障害といった病態が認められる。この処置として様々な閉鎖手術療法が開発され、効果を上げている一方、術後、特に硬口蓋において粘膜、骨組織の不足が生じ、瘢痕化や発育障害が生じることも多い。このような背景から、患者個人への負担が少ない組織補填技術、特に粘膜、骨の複合組織を効率よく補填できる移植材の開発が渴望されている。

この対策として現在、自己組織移植やコラーゲンなど生体吸収性材料を用いた修復が行われている。しかし、自己組織移植の場合、組織採取における二次的外科侵襲の問題や採取できる組織量の限界といった問題があり、生体吸収性材料を利用した場合、材料吸収速度制御の困難にともなう治療不全の問題がある。また、近年、細胞と生体吸収性材料とを混合し移植する、組織工学的手法も試みられているが、この場合も材料の存在による治癒遅延など、依然、解決すべき問題が残っている。

これら問題の解決策として、「合成材料を使わず細胞のみを原料にし、サイズ、形状、形質を工学的に制御した三次元粘膜/骨複合組織様移植材の開発と利用」は、理想的である。

2. 研究の目的

本研究では上皮、間葉それぞれの細胞を原料にした厚みのある三次元細胞集合体を作製する。この作製シートの *in vitro* 特殊培養を通じた分化、成長制御により、三次元生体組織様移植材、特に粘膜組織と骨組織それぞれの *in vitro* での製作、さらには、その複合化を目指す。

3. 研究の方法

まず、単一細胞種からなる厚みのある(100 μm

以上)三次元細胞シートの作製を試みる。細胞シートの作製にはすでに開発している温度応答性高分子ゲル(pNIPAAm + PEGDMA)を使用する。任意形状、任意サイズのゲル鑄型の作製には3Dプリンターにより作製したUV硬化性樹脂鑄型を利用する。

細胞は、マウス口腔粘膜上皮細胞、およびマウス骨髄間葉系幹細胞を使用する。それぞれの細胞を、準備した温度応答性ゲルモールドに流し込み、使用するメディアム、培養時間、ゲル表面修飾など異なる培養条件下での培養後、回収する。回収した細胞シートについて上皮細胞シートについてはE-カドヘリンなど細胞間接着に關与するタンパク質の発現を、間葉系細胞シートに関しては、フィブロネクチンなど基質タンパク質の発現、骨基質、軟骨基質の発現、さらには石灰化物の定性化、定量化を検討し、シート構成細胞の結合状態を確認する。また、作製した細胞シートの材料学的物性についても、検討を行う。これら評価を通し、細胞播種条件、培養条件など、細胞種に特化した細胞シート作製技術の最適化を図る。

さらに、これら作製した細胞集合体の粘膜への分化、骨への分化を試みる。骨への分化においては、その機能性向上の観点から、骨基質の配向制御についても試みる。

4. 研究成果

温度応答性高分子ゲル材料を鑄型として用いることで、骨髄間葉系幹細胞を元に、直径サイズの異なる球状細胞集合体を作製することに成功した。この球状細胞集合体を長期間骨系誘導培地にて培養を行ったところ、培養期間に応じて、細胞集合体サイズが大きくなり成長していることが認められた。この細胞集合体内部について組織学的な検討を行ったところ、培養初期より軟骨組織特異的基質であるアグリカンやタイプ2コラーゲンの発現が認められ、また、時間経過とともに石灰化の沈着が認められた。これら基質の沈着は細胞集合体内部において部位特異的であ

り、軟骨細胞分化層は表層から少し内側、石灰化層はその層よりさらに内側で認められた。このように細胞の塊から生体組織様軟骨、骨組織の生成を in vitro で達成できた。

また、この骨様組織生成にあたり、細胞集合体内部における酸素分圧が重要であることが考えられ、これについては球状細胞集合体内の実際の酸素分圧を測定することで評価した。その結果、酸素分圧として 100-130mmHg、球の直径として 1.0-1.5mm 程度のものが骨様組織生成のサイズとして適していることも明らかとなった。

また、骨髄間葉系幹細胞を含有したフィブリンゲルに伸展を加えることで形成した細胞配向ゲル複合体を生体内に埋入することで、長軸方向への配向性を示す骨組織の再生にも成功した。

一方、粘膜組織構築について、上皮細胞からなる集合塊の作製まで至っているが、その集合塊の成長制御、特に角化層形成の厚さ制御が今後の課題として残っている。

今回の技術は個人個人に必要な形状、サイズをコントロールできる培養系、かつ組織生成法であり、これら技術を組み合わせることで、将来的に、これまででない理想的な人工生体組織による鼻咽腔封鎖が達成できるものと期待する。

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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1) Sasaki J, Matsumoto T, Imazato S. Oriented bone formation using biomimetic fibrin hydrogels with three-dimensional patterned bone matrices. J Biomed Mater Res A (2014) in press 査読有り

2) Sasaki J, Matsumoto T, Nishiguchi M, Matsusaki M, Egusa H, Nakano T, Akashi M, Imazato S, Yatani H. In vitro reproduction of endochondral ossification using 3D cell

constructs. Integr Biol, 4 (2012) 1207-1214 査読有り

〔学会発表〕(計 5 件)

1) 松本卓也 細胞周囲環境制御と細胞操作 第 2 回日本バイオマテリアル学会中四国シンポジウム 招待講演 2014 年 2 月 28 日 岡山

2) Matsumoto T. Hydrogel-based biomimetic environment for in vitro cell and tissue manipulation, Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium 招待講演 2014. 1.20-21 Sendai, Japan

3) 松本卓也 次世代歯科医療技術の開発 岡山大学歯学会 招待講演 2012 年 11 月 岡山

4) 松本卓也. 石灰化を理解する in vitro の系を作ってみました. BS in Naoshima 2012 年 8 月 岡山

5) 佐々木 淳一、松本卓也、江草 宏、矢谷博文、今里 聡. 細胞集合体を用いた内軟骨性骨化 in vitro 定量解析ツールの開発. 日本歯科理工学会 2012 年 4 月 徳島

〔図書〕(計 1 件)

1) 松本卓也. 硬組織再生用材料 機能材料 (2012) CMC 出版 Vol. 32, p. 22-27.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

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

松本 卓也 (Matsumoto Takuya) 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授 研究者番号：40324793

(2)研究分担者

飯田 征二 (Iida Seiji) 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授 研究者番号：40283791

(3) 研究分担者

平野 義明 (Hirano Yoshiaki) 関西大学・工学部・教授 研究者番号：80247874