

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 28 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282134

研究課題名(和文) ナノ周期構造を利用した間葉系幹細胞自己生成組織の線維強化と軟組織修復の高度化

研究課題名(英文) Development of a stem cell-based self-assembled tissue cultured on a nano-periodic-patterned surface: Fiber reinforcement and improvement of soft tissue repair

研究代表者

藤江 裕道 (FUJIE, HIROMICHI)

首都大学東京・システムデザイン学部・教授

研究者番号：20199300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)をナノ基板上およびコラーゲンナノ線維上で生成し、nano-SATおよびfiber-SATを生成した。両SATともに線維配向度、線維強化度の高い生体由来材料であり、通常SATに比べ、破断強度と剛性が増大した。ついで、両SATをウサギ大腿骨荷重部軟骨欠損部に他家移植しところ、3ヶ月後において、両材料ともタイプIIコラーゲンの生成を伴う良性の軟骨修復を示した。特に、ナノ線維SATによる修復組織は低い摩擦係数を示し、個体間のバラツキも少なかった。ナノ線維SATによるラット膝蓋腱の修復の追加検討でも、形態学的、力学的に良好な修復経過が観察された。

研究成果の概要(英文)：Two kinds of stem cell-based self-assembled tissues (SATs) were produced through either a cell culture of mesenchymal stem cell (MSC) on a nano-periodic-structured surface (nano-SAT) or a cell culture of MSC on nano-collagen fibers (fiber-SAT). Both the STAs exhibited more complicated fiber-reinforced structure with stiffer and stronger properties than normal SAT. Then, either of the nano-SAT or the fiber-SAT was implanted into partial chondro-defects of rabbit femoral cartilage. At 3 months after implantation, the repair tissues exhibited well-organized cartilage-like structures with abundant type-II collagen. In particular, tissues repaired with the fiber-SAT exhibited a low coefficient of friction with a small variation. In addition, we found that the fiber-SAT had a significant property for the repair of transected patellar tendon.

研究分野：医用生体工学

キーワード：バイオメカニクス 間葉系幹細胞 自己生成組織 ナノ加工 軟組織修復

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) など、幹細胞に関する研究成果がトピックスとなっている。幹細胞は、増殖能と分化能をあわせもつ細胞であり、現代の組織再生医療において最も期待が寄せられる生体由来材料である。このなかで、体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞 (MSC) は分化能が劣るものの、個体から容易に収集でき、倫理的な問題が少ないため、再生医療の現実的な切り札として注目されている⁽¹⁾。しかし、これまでの研究では以下の3つの問題が存在した。

(1) 培養表面が二次元平面であり、細胞分化や生成組織の構造・性質が制約される。

(2) 補強用スキャフォールドによる拒絶反応が起こりうる。

(3) 修復評価において形態計測・観察が主で、力学的特性の検討が欠如している。

本研究申請者らは、関節滑膜より採取した間葉系幹細胞を含む細胞群に細胞外基質を自己生成させ、組織修復用材料 (Stem cell-based self-assembled tissue, scSAT) の開発に成功した⁽²⁾。scSAT は幹細胞が作り出す細胞外基質で構成されるため、前記(2)の問題を克服している。これまでに、scSAT を用いた軟骨修復では、良好な形態と力学特性が得られることが分かっている⁽³⁾。これまでの基礎研究において、培養表面のナノ構造が MSC の分化、増殖、細胞外基質生成に影響を及ぼし、scSAT の構造や力学特性を決定づけることを確認している⁽⁴⁾。この技術により(1)の問題が解決される。また、これまで蓄積した技術を用いて scSAT やその生成物の力学特性を把握することが可能であり、(3)の問題も解決できる。

2. 研究の目的

本研究では、ナノ構造表面上で培養した nano-SAT、およびコラーゲンナノ線維と複合培養した fiber-SAT を開発し、それらの構造

と力学特性を求め、scSAT の線維強化条件を明らかにする。そして、軟骨および靭帯の損傷動物モデルに対して修復実験を行い、scSAT が軟組織修復に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) SAT の生成と評価

フェムト秒レーザー (サイバーレーザー) で作成する種々のナノ周期構造を用いて MSC 培養を行い、nano-SAT を開発した (図 1)。また、コラーゲンナノ線維 (ニッピ) 上で MSC 培養を行い、MSC/複合組織/コラーゲンシート複合体である fiber-SAT を開発した。培養 28 日後の両 SAT について、表面構造や線維構造が MSC 等の分化、増殖、細胞外基質生成にあたる影響を組織観察および力学試験などで調べた。

(2) SAT による軟骨および腱の修復実験

実験動物に家兎を用いて、大腿骨部分欠損部にそれぞれの SAT を移植した (図 2)。術後 4 週、および 12 週における修復組織の形態観察 (肉眼観察、組織観察) と力学特性評価 (摩擦試験、インデンテーション試験) を行って、修復度を評価した。

(3) 実験動物にラットを用いて、膝蓋腱の中央 1/3 を欠損させ、欠損部に SAT を移植し、その修復度合を形態観察 (肉眼観察、組織観察、電子顕微鏡観察)、および力学特性評価 (引張試験) を行って修復度を評価した。

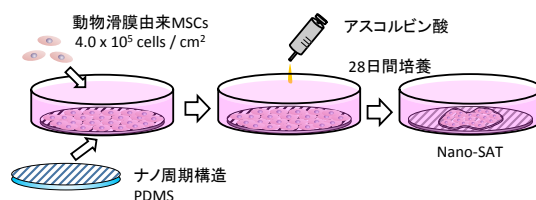


図 1: ナノ基板上での MSC の培養による nano-SAT の生成

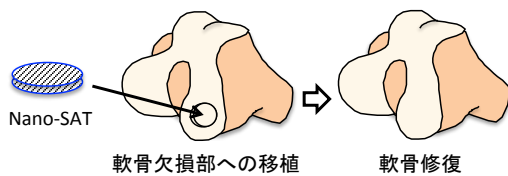


図 2: nano-SAT による軟骨部分欠損部の修復

4. 研究成果

(1) nano-SAT と fiber-SAT の生成と評価

チタンにおけるナノ加工条件の最適化を図ったところ、MSC の伸展度合いを最適にする条件は、パルス時間幅 190 fs, レーザフルエンス 0.5 J/cm², 走査速度 1200 mm/min であることが分かった。チタン上に形成したナノ溝形状を PDMS 上に転写し、その上で 28 日間の培養後の nano-scSAT は、ナノレベルのコラーゲン細線維が配向しており (図 3), 力学特性も通常 SAT に比べて有意に優れていることがわかった⁽⁵⁾ (図 4)。

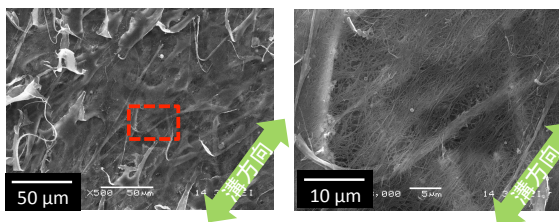


図 3: 培養 28 日後の nano-SAT の SEM による形態観察

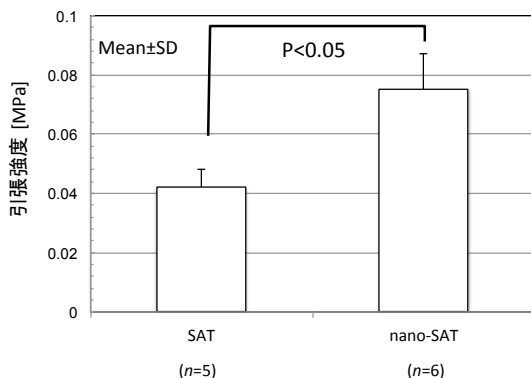


図 4: 培養 28 日後の nano-SAT の引張強度

コラーゲンナノ線維上で SAT を培養して生成した fiber-SAT は 3 層構造をなし、特に中間部位には MSC が産生したと思われる細胞外基質がコラーゲンナノ線維と密に絡み合い、生体軟組織を思わせる構造を有していた。培養 8 週では、破断荷重と剛性が通常 SAT に比べ、有意に増大した。

(2) 軟骨修復実験

nano-SAT を用いて修復した軟骨欠損部は 28 日後に良好な肉眼所見を示した。組織観察では、正常軟骨に劣らないほどのサフラニン O の染色性の高さを示し、良好な軟骨修復であった (図 5)。しかし、修復組織表面に不連続な構造が認められる個体もあった。往復動摩擦試験における摩擦係数は、往復動 1 回目と 10 回目ともに、通常 SAT による修復軟骨よりもやや高い値となった。

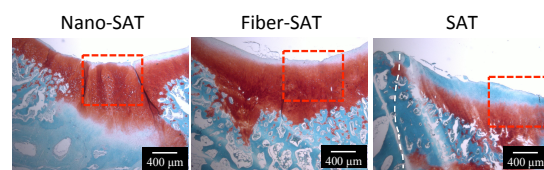


図 5: nano-SAT, fiber-SAT, 通常 SAT を移植したに軟骨修復組織の 12 週後の組織観察像 (サフラニン O 染色 (青紫色: 核, 赤色: プロテオグリカン, 緑色: 他の組織))

fiber-SAT を用いて修復した軟骨欠損部は 28 日後に良好な肉眼所見を示した。組織観察では、軟骨下骨の修復が良好であり、正常軟骨に劣らないほどのサフラニン O の染色性の高さが示された (図 5)。修復組織表面の連続性も高く、マクロレベルの構造的欠陥が認められなかった。往復動摩擦試験における摩擦係数は、往復動 10 回目で、通常 SAT による修復軟骨よりもやや低い値を示し、移植せずに修復させた Defect 群に比べ、低値となった (図 6)。

本研究で開発した両 SAT ともに軟骨修復能が認められたが、特に fiber-SAT による修復軟骨は下骨や軟骨実質部分の形態形成において、通常 SAT や nano-SAT に比べ、優れていることが分かった。

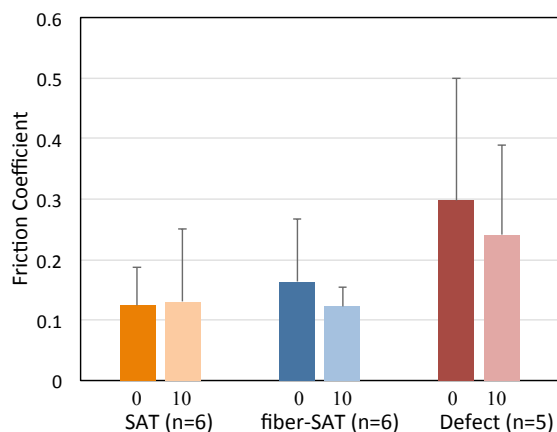


図 6: fiber-SAT および通常 SAT を移植した軟骨修復組織の 12 週後の摩擦係数 (0: 往復動 1 回目, 10: 往復動 10 回目)

(3) 膝蓋腱修復実験

fiber-SAT を移植した膝蓋腱切断部の修復組織は、移植 4 週間には破断荷重は移植を行わなかった Defect 群よりも高くなり、線形剛性は正常腱と同等レベルまで回復した。SEM 観察では、fiber-SAT 群では Defect 群に比べ太い径の線維が多数観察され、クリンプ様構造も観察された。fiber-SAT は軟骨修復のみならず、腱の修復にも有効であることが確認された。

<引用文献>

- (1) Bali, A&R, 2001
- (2) Ando, Nakamura, Fujie et al, Biomaterials 2007
- (3) Nansai, Fujie et al, J Biomech Sci Eng 2011
- (4) Oya, Fujie et al, Jpn J Applied Physics, 2012
- (5) Fujie, Oya, et al, Int J Automation Technology, 2016

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

①Fujie H, Oya K, Tani Y, Suzuki K, Nakamura N, Stem cell-based self-assembled tissues cultured on a nano-periodic-structured surface patterned using femtosecond laser processing, Int J Automation Technology, 2016; 10(1): 55-61. doi: 10.20965/ijat.2016.p0055.

②Fujie H, Nansai R, Ando W, Shimomura K, Moriguchi Y, Hart DA, Nakamura N, Zone-specific integrated cartilage repair using a scaffold-free tissue engineered construct derived from allogeneic synovial mesenchymal stem cells: Biomechanical and histological assessments, J Biomechanics, 2015 November; 48(15): 4101-4108. doi:10.1016/j.jbiomech.2015.10.015.

③Fujie H, Imade K, Effects of low tangential permeability in the superficial layer on the frictional property of articular cartilage, Biosurface and Biotribology; 2015 June; 1(2): 124-129. doi:10.1016/j.bsbt.2015.06.001.

④Shimomura K, Ando W, Moriguchi Y, Sugita N, Yasui Y, Koizumi K, Fujie H, Hart DA, Yoshikawa H, Nakamura N, Next generation mesenchymal stem cell (MSC)-based cartilage repair using scaffold-free tissue engineered constructs generated with synovial mesenchymal stem cells, Cartilage, 2015; 6: 13-29.

⑤Shimomura K, Moriguchi Y, Ando W, Nansai R, Fujie H, Hart DA, Gobbi A, Kita K, Horibe S, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N, Osteochondral repair using a scaffold-free tissue engineered construct derived from synovial MSCs and a hydroxyapatite-based artificial bone, Tissue Engineering Part A, 2014; 20: 2291-2304.

⑥池谷基志, 大家 溪, 鈴木大輔, 小倉孝之, 小山洋一, 杉田憲彦, 中村憲正, 藤江裕道, 組織再生材料 (TEC) / コラーゲンシート複合体の引張り特性, 臨床バイオメカニクス, 2014; 35: 401-406.

⑦谷 優樹, 大家 溪, 杉田憲彦, 中村憲正, 藤江裕道, ナノ周期構造上で作製した幹細胞自己生成組織 (scSAT) の引張特性, 臨床バイオメカニクス, 2014; 35: 407-412.

⑧Fujie H, Nakamura N, Frictional properties of articular cartilage-like tissues repaired with a mesenchymal stem cell-based tissue engineered construct, Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2013 Jul; 2013: 401-4.

⑨今出久一郎, 藤江裕道, 関節軟骨表層の透水率が摩擦特性に及ぼす影響, 臨床バイオメカニクス, 2013; 34: 441-445.

⑩望月翔太, 柳田 駿, 藤江裕道, 膝関節軟骨の変性が動摩擦に及ぼす影響, 臨床バイオメカニクス, 2013; 34: 427-432.

⑪大家 溪, 佐藤慶秀, 青木 峻, 下村和範, 鈴木健司, 中村憲正, 藤江裕道, 培養表面のマイクロ周期構造が間葉系幹細胞自己生成組織の力学特性におよぼす影響, 材料の科学と工学, 2013; 50(1): 34-39.

[学会発表] (計 42 件)

① Fujie H, Site-, direction-, and maturity-dependent hydraulic permeability of articular cartilage, Proceedings of the International Symposium on Articular Hydrogel Cartilage, Joint Replacement, and Related Topics, 2016 January 25, 26; Fukuoka: pp. 30-32. (Invited lecture).

② Fujie H, Mitsui H, Imade K, Low tangential permeability in the superficial layer improves the frictional property of articular cartilage, Proceedings of The 8th International Biotribology Forum and The 36th Biotribology Symposium, 2015 September 21-25; Yokohama: 49-52.

③Oya K, Tani Y, Koizumi K, Sugita N, Suzuki K, Nakamura N, Fujie H, Tensile properties of stem cell-based self-assembled tissue (scSAT) biosynthesized on nanoporous structured substrate,

Transactions of the ASME 2011 Summer Bioengineering Conference, 2015 June 17-20; Snowbird: 448, pp.669-670.

④ Fujie H, Nakamura R, Anisotropic hydraulic permeability in articular cartilage and menisci: A direct measurement using biopsy punches, Transactions of the ASME 2015 Summer Bioengineering Conference, 2015 June 17-20; Snowbird: 420, pp.614-615.
等

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 組織修復材
発明者: 藤江裕道
権利者: 公立大学法人首都大学東京
種類: A61L
番号: 161290
出願年月日: 平成 28 年 9 月 9 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

<http://www.comp.sd.tmu.ac.jp/fujielab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤江 裕道 (FUJIE, Hiromichi)

首都大学東京システムデザイン研究科・教授
研究者番号: 20199300

(2) 研究分担者

中村 憲正 (Nakamura, Norimasa)

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター・招聘教授

研究者番号: 50273719

(3) 連携研究者

なし