

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293402

研究課題名(和文)硬組織発生時物理化学的環境の機能性ハイドロゲルによる再現

研究課題名(英文)Reproduction of physico-chemical environment of bone tissue development by using functional hydrogel

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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：硬組織発生部位における物理化学的性状を理解するため、マウス大腿骨の二次骨化中心部分の検討を進めた。この部位における初期石灰化は生後5日目以降に開始し、その領域は遠心方向に拡大していくこと、初期石灰化における非晶質相は成熟過程、特に24時間ほどで結晶相に変換すること、また同時にヤング率が上昇することなどがわかった。また、この部位におけるアルカリフォスファターゼの分布、pH環境などについても知見を獲得した。これら結果をもとにこの局所物理化学的環境をハイドロゲルにて再現し、適切な堅さ環境が骨石灰化を促進することや機能性ペプチド固定化ゲルが細胞凝集塊形成に有効であることなどを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：To understand the physico-chemical property of hard tissue development region, we investigated the secondary ossification center of mouse femur. Early stage of calcification can be seen at day 5. The amorphous phase calcium phosphate turned into crystalline calcium phosphate after 24 h, and the calcified region expanded to the distal region of secondary ossification center in mouse femur. Also, the Young's modulus, alkaline phosphatase activity and pH of that region were increased according to the tissue maturation.

Based on these findings, we reproduced such physico-chemical properties by using hydrogel and applied them for bone tissue generation in vitro. Consequently, we found that a certain young's modulus of hydrogel enhances mineralization of ex vivo bone tissue as well as cell aggregations.

研究分野：歯科医用工学

キーワード：ハイドロゲル 堅さ アガロース 骨 石灰化

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患、インプラント埋植時の骨造成などを対象に骨組織再生を目指した研究が多く進められている。骨再生を達成するためには、骨組織の発生を広い観点から理解することが重要である。20世紀後半から急速に進んだ分子生物学的検討によって、骨組織発生に関与する分子メカニズムはかなり理解が進んでいるが、これら研究の多くは化学的因子(増殖因子、サイトカインなど)がどのようにトリガーとなって他の分子に作用し、細胞内あるいは核内シグナルへと変換されていくか、ということを中心に研究されてきた。ところが、実際の生体では化学的因子だけでなく、機械的刺激や周囲基質の物性など物理的因子が時間空間的に変化し、これらも骨組織発生に大きく関与している。

近年、機械的刺激に関しては、種々の機械的刺激デバイスを応用しメカノトランスダクションといわれる、機械的刺激に対する分子発火メカニズムの検討や理解が進められている。しかし、物理的因子は単にメカノレセプターといわれる分子に関与しているだけではない。例えば、周囲基質の物性(堅さや基質濃度)は、メカノレセプター分子との関与に加え、種々の化学的因子の分布や分散、濃度勾配形成などにも関与する。ところが、このような物理的因子と化学的因子の複合的関与を検討するための適切な *in vivo*、*in vitro* のシステムは、ほぼ無いのが現状である。

ハイドロゲルは親水性高分子鎖が水を含み膨潤したものであり、生体内環境と近く、また、高分子の濃度変化により容易にゲル物性を制御できる。さらに化学修飾および修飾量制御により、種々の機能性ドメインやその分布制御も可能である。申請者はこれまでに、ゲル堅さ環境の変化を利用した骨芽細胞機能変化や唾液腺分岐形態変化などの検討を進め、ハイドロゲル材料のこれら研究への有用性を示している。今回、上記問題の解決策として、骨組織発生周囲の物理化学的環境を *in vitro* にて再現できる新規機能性ハイドロゲルの創製と利用を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、硬組織発生周囲における物理化学的性状の理解を進めたうえで、機能性ハイドロゲルを創製し、骨組織発生周囲の物理化学的環境を *in vitro* で再現することを目的に研究を進めた。具体的には、マウス骨組織の発生過程の物理化学的性質の詳細検討、生体活性ドメインを導入した高分子鎖の合成とゲル化、合成した機能性ゲルの物理化学的特性評価と最適化、機能性ゲルを基盤とし

た骨系細胞、骨器官の培養と有用性検討、といった研究の遂行である。

3. 研究の方法

硬組織発生部位における物理化学的性状を理解するため、マウス大腿骨の二次骨化中心部分の検討を進めた。具体的には、生後マウスの大腿骨を経時的に採取し、マイクロCTによる撮影、ならびに組織切片を用いた観察を行った。さらに、組織切片における特殊染色(II型コラーゲンやX型コラーゲン、Sox9、ALP、CD31、CD44など)によりタンパク質発現を検討した。マイクロCTから得られた三次元データを基にして、骨幹長、骨幹部断面における石灰化部面積などの変化も経時的に定量的に評価した。さらなる検討として、SEM、TEMによる石灰化結晶部の微細構造観察を行うとともに、EDSを用いた元素分析も行った。また、微小なデバイスを自作、採取した骨組織への応力負荷を行い、同部の機械的性質評価も行った。上記方法を通じて、得られた結果をもとに、物理化学的特性を再現したハイドロゲルを作製した。具体的にはアガロースゲルを基材にその濃度を制御することで堅さの異なるハイドロゲルを作製した。堅さ範囲は発生初期の胎児堅さである約1 kPaから類骨の堅さである200 kPaの範囲である。作製したゲルについては微小メカニカルテスターを用いて、物性計測を行った。

また、ゲルへの機能性ペプチド導入も進めた。具体的にはフィブロネクチンの接着性ドメインであるRGD、また、最近細胞スフェロイド作製に有効であることが示されたKP24、これら2つのペプチドをモデルペプチドとして使用した。基盤ゲルとしてはアルジネートゲルを使用、このゲルにカルボジイミド化学を用いて、カルボキシ基とアミノ基との共有結合を誘導、ペプチド導入アルジネートゲルを作製した。ペプチド導入については、アミノ酸分析装置をもとに定量化を行った。これらゲルを用いて、組織生成についての検討も行った。具体的には骨組織の成長変化、および唾液腺組織の成長変化についての検討を行った。

4. 研究成果

採取したマウス大腿骨を基にマイクロCTにより三次元データを取得した。さらにそのデータを基に、様々な変化を定量化した。例えば、E13から出生、さらに出生後2週間に至るまで、骨幹長の断続的な増加が認められ、断面部石灰化面積の増加が認められた。しかし、出生を境に一時的な断面部石灰化面積の急激な減少を認めた。これは出生後の骨髄形成増加にともない生じているものと考えられ

た。断面二次モーメントの算出から、興味深いことに、この時期における結晶性向上にともない、骨としての強度は維持されていたことが確認された。

また、二次骨化中心石灰化生成部位におけるさらなる物理的、化学的、生物学的理解を深めた。その結果、マウス大腿骨の骨端部における内軟骨骨化の最初期石灰化は生後 5.5 日頃に生じ、その部位は前後的に中央、近遠心的に少し近心側であることが明らかとなった。この部位における石灰化を詳細に検討したところ、この部位における石灰化は当初、非晶質のリン酸カルシウムであり、石灰化球の成長にともない、結晶化が進むことがわかった。また、この部位における pH も全体としては弱アルカリ性の可能性が示唆された。

これら結果を基に作製したハイドロゲルを用い、単離した生体組織の培養を行った。大腿骨を堅さの異なるゲルの中で培養したところ、ゲルの堅さ違いによって、大腿骨の長軸方向への成長は有意な差が認められなかった。一方で、2-60 kPa の範囲のゲル堅さ環境において、コントロールとして用いた浮遊状態の場合と比較して、有意に高い石灰化の促進が認められた。また、10 kPa 程度の堅さのゲルを用いることで石灰化は最も促進した。この石灰化促進メカニズムの検討を目的に、採取した組織の染色を行ったところ、石灰化が促進された二次骨化中心部分における軟骨細胞肥大化の促進が確認された。また、II 型コラーゲンの発現は認められる一方で、I 型コラーゲンの発現は認められなかったことから、昨今いわれている、軟骨細胞の骨芽細胞へのトランス分化については、この初期の段階においては起こっていないことが確認できた。また、機能性ペプチドを導入したゲルでは現段階では軟組織である唾液腺組織の細胞凝集塊促進、さらに成長促進が認められており、以降、骨組織への成長影響についても検討を進める予定である。

このように、本研究では、硬組織生成周囲の詳細な物理化学的特性を理解し、それを材料を基に再現することで、新たな *in vitro* 用組織成長制御システムの構築につながる結果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1) Sasaki J, Hashimoto M, Yamaguchi S, Itoh Y, Yoshimoto I, Matsumoto T, Imazato S. Fabrication of Biomimetic Bone Tissue Using Mesenchymal Stem Cell-derived Three-dimensional Constructs Incorporating Endothelial Cells. PLoS ONE 10 (2015) e0129266.doi:10.1371/journal.pone.0129266. 査読有

2) Hara ES, Ono M, Hai PT, Sonoyama W, Kubota S, Takigawa M, Matsumoto T, Young MF, Olsen BR, Kuboki T. Fluocinolone acetonide is a potent synergistic factor of TGF- β 3-associated chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for articular surface regeneration. J Bone Miner Res 30 (2015) 178-184 doi: 10.1002/jbmr.2502. 査読有

3) Sathi GA, Kenmizaki K, Yamaguchi S, Nagatsuka H, Yoshida Y, Matsugaki A, Ishimoto T, Imazato S, Nakano T, Matsumoto T. Early initiation of endochondral ossification of mouse femur cultured in hydrogel with different mechanical stiffness. Tissue Eng Part C Methods., 21 (2015) 567-575 doi:10.1089/ten.tec.2014.0475. 査読有

4) Sasaki J, Matsumoto T, Imazato S. Oriented bone formation using biomimetic fibrin hydrogels with three-dimensional patterned bone matrices. J Biomed Mater Res A 103 (2015) 622-627 doi: 10.1002/jbm.a.35212. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1) Matsumoto T. Hydrogel-based biomimetic environment for understanding bone tissue formation. Japanese Association for Dental Research general meeting Dec. 2014. (Invited)

2) Matsumoto T. Hydrogel-based biomimetic environment for *in vitro* cell and tissue manipulation, Interface Oral Health Sciences, Sendai, Japan, Jan, 2014 (Invited)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/biomat/>

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

山本 雅哉 (Yamamoto Masaya) 京都大
学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：10332735

(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