

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861904

研究課題名(和文) 差分進化アルゴリズムを応用し多細胞同時異方向制御を可能とする多目的培地の開発

研究課題名(英文) Development of multipurpose medium for guiding multiple cells toward different cell lineages using differential evolution algorithm.

研究代表者

本田 義知 (HONDA, Yoshitomo)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90547259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：単一細胞培養技術が著しく発展した今も、複数細胞をそれぞれ別目的へと「生体外の同一空間内で同時に」制御する技術は、未だ確立されていない。本申請は、申請者らが独自に開発している複合薬創生技術(FSC：情報工学と生物学的評価の融合技術)を駆使し、多目的培地開発の基盤を築く事を目的とした。特に、FSCを用いて数限りない組み合わせが考え得る複数の培地成分を迅速に最適化し、生体外で血管網を内包した骨様組織を、最小限の成分で構築しうる培地の創製を目指した。本期間内では、FSCに適した細胞ソース、培地成分の探索に成功した。

研究成果の概要(英文)：Despite the rapid advance of the cell culturing technique, controlling multiple cell types toward the different lineages at the individual culture dish is still challenge in the regenerative medicine. The goal of this project was to construct the basics of multipurpose medium, which can control the cell fate of different cell types at the same time in the same medium by using feedback system control technique (combinatory technique of information engineering and cell biology). As a result, we accumulated findings regarding the effect of ingredients against the cells used in this project. Additionally, we found that dedifferentiated fat cells and some ingredients would be applicable for the project.

研究分野：再生歯学

キーワード：組織幹細胞 成長因子 骨芽細胞 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔癌、顎骨骨折などによって生じた骨欠損修復は、歯科における重要な検討課題となっている。特に、広域にわたる骨欠損では、患者の手術的および、精神的負担は著しく、効果的な治療法の確立が可能となれば、患者の生活の質的向上へ大きく寄与できる。

広域骨欠損では、血管網が大きく喪失されており、骨再生担体または欠損中心部への迅速な栄養・酸素供給技術の確立が必須となる。従って、これまでも生体内で骨形成因子に加え血管新生因子を徐放させる試みや、幹細胞と血管内皮細胞を移植し、血管網と骨の両組織再生を促す方法などの試みが国内外で盛んに行われてきた (Nguyen L et al, *Tissue Eng B* 2012)。しかしながら、これらの手法はいずれも、生体内で初めて両組織再生が開始され、治癒期間が極めて長くなる点に大きな課題を残していた。

この課題を克服するため、生体外であらかじめ血管網を張り巡らせた骨様組織 (血管網内包型骨様組織) を構築し、その後移植を行う先駆的な試みが注目を集めている (Correia C et al, *Plos One* 2011)。しかしながら、これまでの報告では未だ、生体外で十分な血管網や骨組織の両方を構築するには至っていない (Correia et al, *Plos One* 2011)。一般的に、血管網を構築する血管内皮細胞の培地や、間葉系幹細胞 (MSC) の骨芽細胞分化用の培地は別々に開発され、互いの成分には濃度によって一方の細胞の分化・増殖を抑制しうる因子 (ヘパリン、Hydrocortisone 等) が含まれている。従って、既報の研究の様に、ただ両培地を簡易的に混ぜただけの培地を用いた研究では、実現が難しかったと考えられる。もし、培地成分・濃度が最適化され「同一空間 (同一培地内)」で血管内皮細胞による血管網構築と間葉系幹細胞の骨芽細胞分化という2つの目的を同時に達成しうる多目的培地が創生されれば、生体外における血管網内包型骨様組織構築が実現し、広域骨欠損治療の進歩に貢献する事が予想される。

2. 研究の目的

本申請は、申請者らが独自に開発している複合薬創生技術 (Feedback system control、FSC: 情報工学と生物学的評価の融合技術) を駆使し、多目的培地開発の基盤を築く事を目的とした。特に、FSC を用いて数限りない組み合わせが考え得る複数の培地成分を迅速に最適化し、生体外で血管網を内包した骨様組織を、最小限の成分量で構築しうる培地を創製することを目的とした。

本申請時には MSC をターゲット細胞の一つとして検討していた。しかしながら、その後の FSC を用いた多目的培地の開発過程において、MSC の骨芽細胞分化誘導は、培養期間が

長く、作業対効率に課題を持つ事が明らかとなった。従って、当初の FSC を用いた多目的培地創生のプロセスと平行して、脂肪より採取可能な脱分化脂肪細胞 (DFAT 細胞) の多分化能の調査を行い、本プロジェクトに向けた細胞資源としての適性を合わせて評価した。

3. 研究の方法

(1) 脱分化脂肪細胞の多分化能評価

DFAT 細胞の採取方法

ヒト DFAT 細胞の獲得・使用に関しては、事前に大阪歯科大学「医の倫理委員会」に実験計画書を提出して、倫理審査を受けて承認を得てから、「人を対象とする医学系研究」に関する規定を遵守して行った。脂肪組織は、口腔外科手術時に切除が必要と判断され、術後廃棄予定の組織を採取した。採取された脂肪組織を細切し、コラゲナーゼ溶液中に溶かす。その後、フィルター処理を行った後、遠心分離を行い、成熟脂肪細胞を含んだ上清を回収する。成熟脂肪細胞を含む上清を、牛胎児血清含有標準培地で完全に満たされた培養フラスコ中に注入し、脂肪滴を含む浮遊した細胞がフラスコ内側の天井表面に接着するようフラスコの接着面を上方にして培養する (天井培養法)。7 日後に培地を除去し、新たな培地をフラスコ底面が隠れる程度入れ、細胞がフラスコ底面に位置するようにフラスコを反対にして、DFAT 細胞を得た。

DFAT 細胞の骨芽細胞分化能評価

DFAT 細胞の骨芽細胞分化を確認するために、骨芽細胞分化誘導試験を行った。DFAT 細胞の骨芽細胞分化を促す高効率な骨芽細胞分化培地の開発は未だ開拓の余地を残す。更に、費用対効果の高い骨芽細胞分化因子は、本研究計画で用いる成分としての応用が期待できる。申請者らは新たに、安価で入手可能な緑茶カテキンの一成分であるエピガロカテキン 3-ガラート (EGCG) に着目し、EGCG 含有骨芽細胞分化培地が DFAT 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を合わせて評価した。

DFAT 細胞の軟骨細胞分化能評価

DFAT 細胞の多分化能を確認するために、軟骨分化誘導試験を行った。更に、DFAT 細胞に対する高効率な軟骨細胞分化誘導法は殆ど明らかになっていない。費用対効果の高い軟骨細胞分化因子は、将来的な他の多目的培地開発への応用が期待できる。従って、新たに安価で入手可能な、ストロンチウム元素 (Sr) に着目し、Sr 含有軟骨分化培地の効果を合わせて評価した。

(2) 多目的培地創生に向けた予備的検討

培地成分となる成長因子群および基礎培地候補の選定

培地成分は、申請者らが開発した骨形成複合薬含有成分 (Honda Y et al., *Sci Rep*, 2013) と、市販の血管内皮細胞培養用培地成分、論文において既に血管内皮細胞増殖能などが報告されている成分を基軸として複数選択した。

選定した成長成分が、MSC および、血管内皮細胞の細胞増殖に及ぼす影響

細胞毒性を示す濃度範囲での成長因子の利用は、FSC を用いた成長因子配合の最適化を混乱させる。従って、FSC に先んじて、既報の有効濃度を基準として、その 10 倍、100 倍濃度が、MSC 株 (RCB2153)、血管内皮細胞様細胞 (HU-VEC-C) の細胞生存率に与える影響を評価した。

(3) MSC と血管内皮細胞の共存培養の予備的検討

申請時の計画書では、Fibrin 内での 3 次元培養法を計画していたが、費用対効果、作業対効果の観点から、細胞シートの応用へと計画を変更した。従って、MSC と血管内皮細胞の 2 次元での共存培養時の細胞挙動は、本計画における基盤的な知見となった。これらの観点から、既報の方法を参考にして (Ren L et al., *BioMed Research International*, 2014)、MSC 血管内皮細胞シート調製の予備的検討を行った。

4. 研究成果

(1) DFAT 細胞の多分化能評価

DFAT 細胞のキャラクタリゼーション

脂肪組織から得た DFAT 細胞の細胞表面抗原マーカーをフローサイトメトリーを用いて評価した。その結果、MSC に発現が認められる CD90、CD105 の強発現が認められた。一方、CD34 などの発現は乏しく、MSC 様の細胞が採取された事が確認された。フローサイトメトリーのみでの評価では、同細胞が MSC か、DFAT 細胞かを識別することは困難である。しかし、申請者の所属する研究グループでは、過去に同様の天井培養法で得た細胞が、骨髄由来の MSC や脂肪由来の MSC と異なる分化挙動を取る事を明らかにしている事から、同細胞を DFAT 細胞と見なし、下記の実験を遂行した。

DFAT 細胞の骨芽細胞分化能評価

DFAT 細胞の骨芽細胞への分化を、骨分化培地を用いて確認した。更に、EGCG 含有骨分化培地で培養された DFAT 細胞は、標準培地や、EGCG 非含有骨分化培地内で培養された DFAT 細胞に比べて、迅速にアリザリンレッド染色で染まることを明らかにした。また、骨分化の転写マーカーかである Runx2 の発現がより早く上昇する事を明らかにした。一方、申請者らは、過去に、既報の骨分化培地培養下において DFAT 細胞が、MSC よりも迅速に骨芽細胞へ分化するという知見を得ている。これらの知見を考慮すると、DFAT 細胞は、一定の培養環境下におかれた場合、優れた骨芽細胞分化能を示し、本研究に活用しうる優れた細胞資源となることが明らかとなった。また、DFAT 細胞に対する EGCG の骨芽細胞分化誘導能の結果は、同細胞の骨再生医療応用への貴重な知見となることから、論文としてまとめ、*Int J Mol Sci* 誌に発表した (発表雑誌論文 1)。

DFAT 細胞の軟骨細胞分化能

DFAT 細胞が軟骨細胞へと分化し、多分化能を持つ事を、軟骨分化培地を用いて確認した。更に、Sr 含有軟骨誘導培地で培養された DFAT 細胞は、標準培地や、Sr 非含有軟骨誘導培地で培養された細胞に比べ、強くアルシアンブルーで染色されることを明らかにした。この結果は、Sr が軟骨基質の分泌を促進させた事を示唆する。これらの知見は、軟骨細胞資源として DFAT 細胞が有用である可能性を示唆していることから、論文としてまとめ、*Tissue Eng Part A* にて公表した (発表雑誌論文 2)。

(2) 多目的培地創生に向けた予備的検討

培地成分となる成長因子群および基礎培地候補の選定

過去の申請者らの研究結果と文献調査等から、血管内皮細胞の細胞増殖促進能または、MSC の骨芽細胞分化促進効果があると思われる成分 14 種類を決定した。また、基礎培地候補を決定した。

選定した成長因子が、MSC および、血管内皮細胞の細胞生存率に及ぼす影響

で選んだ成長因子が、RCB2153 および、HUV-EC-C の細胞生存率に及ぼす影響を調査し、FSC 実験を阻害しうる濃度範囲の知見を得た。

(3) MSC と血管内皮細胞の共存培養の予備的検討

RCB2153 と GFP-HUVEC の共培養を行い、血管網構造を持つ細胞シートの調製に関わる

予備的知見を得た。

以上の一連の研究を経て大きく下記の 2 点の知見を得た。DFAT 細胞は一定の培養環境下において、優れた骨分化能および、軟骨分化能を示す事を確認した。これは、同細胞が作業対効率および費用対効率の観点から、FSC に有用な細胞ソースである可能性を示唆する。DFAT 細胞の実験を平行して行っていたこともあり、本研究期間では、FSC を用いた複数の成長因子の最適な配合は完成していない。しかしながら、各種成長因子が MSC および血管内皮細胞に及ぼす影響、更に、共存培養下での細胞挙動の予備的検討の結果を得た。これらの知見は、今後の、DFAT 細胞あるいは MSC と血管内皮細胞を用いた血管内包骨組織構築実験への貴重な基盤情報であり、十分に活用していく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Kaida K, Honda Y, Hashimoto Y, Tanaka M, Baba S. Application of green tea catechin for inducing the osteogenic differentiation of human dedifferentiated fat cells in vitro. *Int J Mol Sci*, 2015; 16:27988-28000.

(2) Okita N, Honda Y, Kishimoto N, Liao W, Azumi E, Hashimoto Y, Matsumoto N. Supplementation of strontium to a chondrogenic medium promotes chondrogenic differentiation of human dedifferentiated fat cells. *Tissue Eng Part A*, 2015; 21: 1695-1704.

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) 本田 義知, 沖田 直也, 安積 瑛子, 岸本 直隆, 橋本 典也, 松本 尚之, 清水谷 公成. ストロンチウム含有培地による脱分化脂肪細胞の軟骨分化誘導. 第 15 回日本再生医療学会総会 2016.3.18 大阪国際会議場 (大阪市).

(2) 海田 浩治, 本田 義知, 橋本 典也, 馬場 俊輔, 川添 堯彬. 茶カテキン(エピガロカテキンガレート)によるヒト脱分化脂肪細胞の骨芽細胞分化. 日本口腔インプラント学会 第 35 回近畿北陸支部学術大会 2015.12.13 赤羽ホール (金沢市).

(3) 海田 浩治, 本田 義知, 橋本 典也, 田中 昌博, 馬場 俊輔. ヒト脱分化脂肪細胞の骨芽細胞分化誘導にむけた In vitro での緑茶カテキンの応用. 第 37 回日本バイオマテリアル学会 2015.11.9 京都テルサ (京都市).

(4) Honda Y, Okita N, Kishimoto N, Hashimoto Y, Matsumoto N, K Shimizutani. Strontium ions induce chondrogenic

differentiation of dfat cells. 93rd General Session & Exhibition of the IADR 2015.3.13 Boston, Mass, USA.

(5) Okita N, Honda Y, Kishimoto N, Hashimoto Y, Matsumoto N. A pilot study of a proposed prospective chondrogenic medium for generating chondrocytes from dedifferentiated fat cells. 90th Congress of the European Orthodontic Society 2014.6.18 Warsaw, Poland.

(6) 沖田 直也, 本田 義知, 橋本 典也, 岸本 直隆, 松本 尚之. 軟骨分化培地に添加されたストロンチウムは、ヒト脱分化脂肪細胞の軟骨細胞分化を促進する. 第 73 回日本矯正歯科学会 2014.10.20 幕張メッセ (千葉市).

(7) 沖田 直也, 本田 義知, 橋本 典也, 岸本 直隆, 坂本 章人, 西浦 亜紀, 松本 尚之. ストロンチウムを用いた脱分化脂肪細胞の高効率な軟骨分化誘導法の開発. 第 72 回日本矯正歯科学会 2013.10.9 キッセイ文化ホール・松本市総合体育館 (松本市).

(8) 沖田 直也, 本田 義知, 岸本 直隆, 橋本 典也, 有馬 良幸, 西浦 亜紀, 松本 尚之. ストロンチウムは脱分化脂肪細胞の軟骨分化を促進する. 第 11 回日本再生歯科医学会学術大会 2013.8.31 日本大学理工学部駿河台キャンパス CST ホール (東京).

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

本田 義知 (HONDA Yoshitomo)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号 : 90547259