

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560218

研究課題名(和文) 環状・球状ハルバツハ配列磁界による幹細胞自己生成組織の線維配向化

研究課題名(英文) Improvement of the fiber orientation of stem cell-based self-assembled tissues cultured in a magnetic field via a Hallbach array

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では立方体状のネオジウム磁石9個を用いて、環状ハルバツハ配列と呼ばれる磁石配列・設置を行い、均一な強磁場環境下で細胞培養を行うシステムを構築した。そして、この磁場環境下で家兔滑膜由来の間葉系幹細胞(MSC)を培養し、磁場環境がMSCに与える影響を調査して、以下のことを明らかにした。1) 磁束密度は0.674 Tであり、ほぼ均一であった。2) MSCを静磁場環境下で培養すると、接着面積は培養18日目までは大きくなる。3) MSCを静磁場環境下で25日間培養することで、細胞占有率は減少し、細胞密度は低下する。4) 静磁場環境は、MSCの配向角度、アスペクト比には影響をおよぼさない。

研究成果の概要(英文)：It is necessary to promote the generation of extracellular matrix of mesenchymal stem cell (MSC)-based self-assembled tissue (scSAT) for a better application of the scSAT to tissue repair. In this study, MSC was cultured in static magnetic field of 0.674 T via Hallbach cylinder-like array. As a result, the cell adhesion area was significantly increased at 18 days while the cell occupation ratio significantly decrease at 25 days in magnetically stimulated cells. However, no obvious differences were observed in cell number, aspect ratio, and orientation angle. It is suggested that the MSCs are affected by static magnetic field of 0.674 T.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：間葉系幹細胞 静磁場 ハルバツハ配列磁界 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

我々の体内に存在する腱、靭帯、軟骨等の軟組織は、血行やリンパ管が乏しく、損傷すると自己治癒が困難であるという問題がある。その問題を解決するため、我々は間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells : MSC) を高密度で長期間培養することで作製される、幹細胞自己生成組織 (stem cell-based self-assembled tissue : scSAT)¹⁾と呼ばれる細胞シートを開発し、腱、靭帯、軟骨などの難治性疾患の修復、治療に応用することを目標に研究を行ってきた。従来の軟組織修復法に比べ、scSAT による修復法の有意差は認められているが、修復組織の特性をより向上させる必要がある。コラーゲン線維を配向させることにより scSAT 自体を高強度化し、MSC の増殖、分化を促進させることにより修復能を高めるといった方法が考えられる。

これまでに、細胞およびコラーゲン線維が強磁場によって配向することが報告されている²⁾。また、磁場環境下で MSC を培養することで、MSC の増殖、骨分化が促進されることが報告されている³⁾。それらの先行研究では磁場発生のための装置類が長大であり、電気系装置が必要であるなどのため、培養系実験環境内に導入しにくいという問題があった。

2. 研究の目的

本研究では、環状ハルバツハ配列⁴⁾と呼ばれる磁石の配列を使用し、永久磁石を用いて均一な強磁場を発生させる装置を開発し、磁場環境下で MSC の培養を行った。そして磁場環境が MSC に与える影響を調査した。

3. 研究の方法

3.1 磁場発生装置の開発

寸法 30×30×30 mm のネオジウム磁石 N48 (残留磁束密度 1.36 ~ 1.42 T) を 8 つ用いて、ハルバツハ配列を模擬した形に配列させた (図 1)。磁石を固定するため、アルミニウム製のフレームを作製し、フレーム内に磁石をはめ込んだ。配列中央は細胞培養皿を設置する空間であり、その寸法は 34 mm である。有限要素解析ソフト Femtet[®] (Ver2014.0, ムラタソフトウェア) を用いて装置に発生する磁束密度の解析を行った。また、作製した磁場発生装置の磁束密度を、ガウスメータ (MG-3002, 佐藤商事) によって測定した。

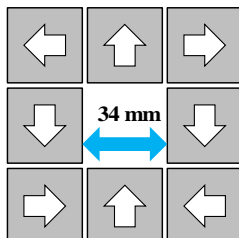


図 1 ハルバツハ配列磁石

3.2 磁場環境下での MSC の短期間培養

ウサギ膝滑膜由来 MSC を、培養培地 (Dulbecco's modified Eagle medium : DMEM (Gibco BRL), 10% fetal bovine serum : FBS (Nchirei Bioscience), 1% 10000U/mL ペニシリン+10000µg/mL ストレプトマイシン:P/S (P/S, Gibco BRL)) に播種密度 2000 cells/cm² で播種し、作製した磁場発生装置を図 2 のように用いて、培養面に対して平行 (parallel-MF 群) および垂直 (vertical-MF 群) 方向に磁場を与え、7 日間培養し、培養後の細胞数を血球計算盤 (エルマ) を用いて測定した。

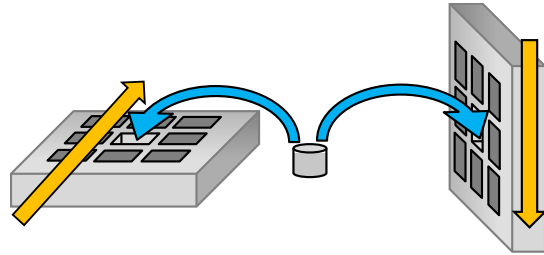


図 2 MSC のハルバツハ配列磁界内への設置

3.3 磁場環境下での MSC の長期間培養

ウサギ膝滑膜由来 MSC を、アスコルビン酸 2 リン酸 0.2 mM を含む培養培地中に播種密度 2000 cells/cm² で播種し、作製した磁場発生装置を用いて磁場環境下で 25 日間培養した (MF 群)。磁場の方向は培養面に対して平行とした。位相差顕微鏡 (IX71, オリンパス) によって細胞の形態、配向を観察した。画像解析ソフト Image J (version 1.49, National Institute of Health) を用いて細胞の輪郭から接着面積を求め、細胞の輪郭を楕円近似し、楕円の長軸と短軸の比をアスペクト比、長軸と磁場の方向の角度を配向角度として求めた。さらに、画像上の細胞が存在している領域の面積の割合を求め、細胞占有率を求めた。

4. 研究成果

4.1 発生磁場の磁束密度

考案した磁場発生装置に発生する y 軸方向 (図 3 の上下方向) の磁束密度の大きさを有限要素解析によって求めた (図 3)。比較として作製した磁石を 2 つ環状ハルバツハ配列と同寸法の空間を有するように並べたモデルでは磁界が不均一であり、中心の磁束密度は 0.267 T だった。ハルバツハ配列を模擬した装置は、中心の磁束密度は 0.704 T で、細胞培養を行う範囲内では均一な磁界が発生していた。実際に作製した装置の中心の磁束密度は 0.674 T であり、解析結果と近い値だった。

4.2 磁場環境下での MSC の短期間培養

7 日目の細胞数測定結果を図 4 に示す。control 群は 12000 ± 3079 cells/cm²、vertical-MF

群は 11333 ± 2309 cells/cm², parallel-MF 群は 8333 ± 1513 cells/cm² であり, control 群, vertical-MF 群と比べて parallel-MF 群は少ない傾向があったが, 有意差はなかった.

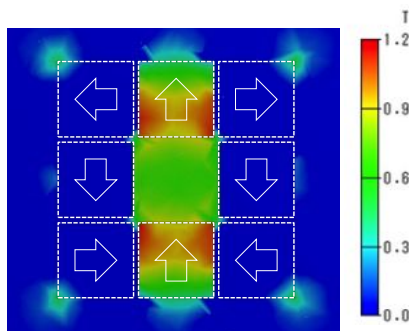


図3 ハルバツハ配列磁石の磁束密度

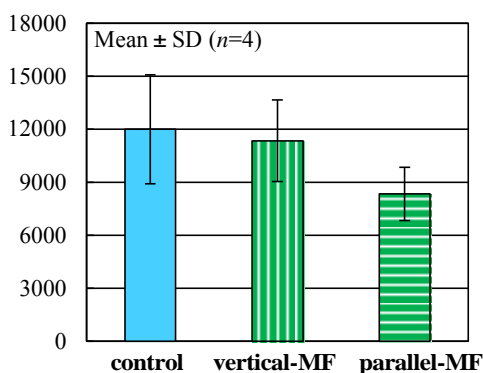


図4 磁場環境下培養7日目の細胞数

4.3 磁場環境下でのMSCの長期間培養

培養6日, 18日, 25日の培養したMSCの位相差顕微鏡による観察結果では, 細胞の形態に関して2群間に大きな差は見られなかった.

細胞の接着面積を図5に示す. 6日目ではMF群はcontrol群と比べて高い傾向を示し, 18日目では有意に高かったが, 25日目では同等となった. また, 25日目は6日目, 18日目と比べて低い値であった. 細胞のアスペクト比は, 培養日数が長くなるにつれて大きくなる傾向があったが, 2群間に有意な差はなかった. 細胞占有率は, control群では画像上の99%以上の範囲に細胞が存在しているのに対し, MF群では画像上の約86%の範囲に細胞が存在しており, control群と比べ有意に低い値となった. 培養25日目の配向角度はややばらつきが見られ, 傾向や規則性は見られなかった.

4.4 結果考察

静磁場が細胞の形態や増殖・分化等に与える影響に関しては, いくつかの先行研究があるが^{2, 3)}, 1T程度の磁場環境に関しては, 細胞培養環境に導入するのが困難であるため,

十分に調べられていない. 本研究では, 環状ハルバツハ配列を模擬することで, 細胞培養環境に導入しやすい永久磁石を用いて, 約0.7 Tの一方方向に均一な磁束が発生する磁場環境を生成することができた. この磁場環境でMSCの培養を行い, その増殖, 形態に及ぼす影響に関して検討を行った. その結果, 細胞の接着面積は6日目, 18日目でMF群の方が大きい傾向があり, 18日目では有意に大きくなった. 一方, アスペクト比は有意差がなかった. 1.5 Tの変動磁場でクロム親和性細胞の細胞内F-アクチン量が培養2時間で減少し, 細胞が膨張するような形態の変化が起きたという報告がある⁵⁾. また, 高勾配の静磁場環境下で1日間培養した白血病細胞の体積が約1.9倍になったという報告がある⁶⁾. 前者は変動磁場であり, 後者は静磁場だが, 浮遊細胞であるため, 細胞に与えられている磁場は変動している. 静磁場であることと, 細胞種が異なるという差異があるが, 本研究でも静磁場環境下でMSCを培養することで, 細胞内のF-アクチン量が減少し, 細胞が膨張したため, 培養18日目に接着面積が大きくなった可能性が考えられる. 培養25日目では, 細胞密度が大きくなったことで, 細胞が十分に伸展できず, 6, 18日目より接着面積が小さくなったと考えられる. 磁場環境下で培養したMSCは, 接着細胞数に有意差はなく, 細胞占有率が有意に低い結果となった. 磁場環境下でMSCを長期間培養することにより, MSCの増殖が抑制された, もしくはMSCが細胞死した可能性がある.

4.5 結果総括

本研究により以下のことがわかった.

- ・環状ハルバツハ配列を模擬して作製した磁場発生装置は, 磁束密度0.674 Tの均一な磁界を発生する.
- ・MSCを0.674 Tの静磁場環境下で培養すると, 培養18日目までは接着面積が大きくなる.
- ・MSCを0.674 Tの静磁場環境下で25日間培養することで, 細胞占有率が減少し, 細胞密度が低くなる.
- ・0.674 Tの静磁場環境は, MSCの配向角度, アスペクト比には影響をおよぼさない.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

山崎雅史, 大家 溪, 沼尾 学, 藤江裕道, コラーゲン線維と間葉系幹細胞による組織修復材料の開発, 第37回バイオトライボロジシンポジウム, 2017年3月11日, 首都大学東京(東京都千代田区)

山崎雅史，大家 溪，杉田憲彦，中村憲正，藤江裕道，滑膜細胞由来組織再生材料/コラーゲンシート複合体による軟骨修復：組織学的評価，第43回日本臨床バイオメカニクス学会 2016年10月8,9日，北海道立道民活動センター（北海道札幌市）。

秋葉泰徳，大家 溪，小泉宏太，中村憲正，藤江裕道，ハルパツ八配列磁場環境下での間葉系幹細胞の培養，第28回バイオエンジニアリング講演会，2016年1月9日，10日，東京工業大学（東京都目黒区）。

〔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〕

なし

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学部・教授
研究者番号：20199300

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし