

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792141

研究課題名(和文) ヒト細胞由来スキャフォールドフリー新規骨移植材料の開発

研究課題名(英文) Development of novel bone graft material by using scaffold-free cell construct

研究代表者

佐々木 淳一 (Sasaki, Jun-ichi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50530490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は、機能的な骨再生を可能にするスキャフォールドフリーの新規骨移植材料をin vitroにて創製することである。本研究の結果、細胞のみから構成される三次元細胞集合体を骨系分化誘導することによって、生体骨組織と同様の軟骨内骨化の過程で軟骨基質および石灰化基質が形成されることを明らかにし、新規の骨移植材として応用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to develop artificial bone graft materials by using scaffold-free three dimensional cell construct. We were successful to fabricate novel bone-like tissue which contained cartilage and mineralized matrices formed by the endochondral ossification. The materials achieved in this study are expected to use as a novel biomaterial for bone regenerative medicine.

研究分野：医歯薬学

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：組織工学 生体材料学 骨再生 細胞集合体

1. 研究開始当初の背景

組織工学分野では組織や臓器の修復や再生を促進させる技術が多く開発されている。骨組織の再生においても、これまで様々なアプローチが試みられてきており、 β -TCP などの無機材料や、PLGA などの有機材料を用いた研究を中心に多くの技術が開発されてきた。これら多くの骨組織再生へ向けた技術については、一定の有効性が示されているが、骨と移植材料との生着に長期間を要する問題や、術後長期経過によって再生した骨組織の吸収が発生する問題は依然として解決されていない。その理由としては、スキャフォールドが分解されずに生体内に残存し、感染や炎症の原因になる場合や、これまでに開発されたスキャフォールドが十分な生体親和性を有していないことが挙げられる。

我々はこれまで、温度変化によって体積が変化する温度応答性高分子 (Poly-N-isopropylacrylamide: pNIPAAm) ゲルを用いて培養を行うことで、任意のサイズと形状の細胞のみで構成される三次元集合体を作製することに成功している (Sasaki J, et al. Tissue Engineering Part A. 2010)。この三次元細胞集合体は、細胞以外の構成要素を持たないことから、生体組織に近似した構造を *in vitro* で再現することが可能であり、安全かつ有用性の高いスキャフォールドフリー新規骨移植材料への応用が可能ではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) で構成される三次元集合体を作製し、その内部の状態や構造の解析、ならびに血管新生に与える影響についての検討を行い、スキャフォールドフリーの新規骨移植材料としての応用の可能性について評価することとした。

3. 研究の方法

(1) 三次元細胞集合体の長期培養法の確立

球状の BMSC 細胞集合体の形態を維持した状態で長期培養する技術の確立を目的に、スピナーフラスコを用いた回転培養、あるいはシーソー型バイオリアクターを用いた振盪培養を試みた。また、細胞集合体の大きさや形態の変化を光学顕微鏡を用いて最大 50 日まで観察した。集合体の培養には骨芽細胞分化誘導培地 (FBS 20%含有 DMEM に β -グリセロフォスフェイト、アスコルビン酸、デキサメタゾン) を用いた。

(2) 三次元集合体培養が内部の細胞に与える影響の検討

三次元集合体培養が内部の細胞に与える影響を検討することを目的として、大きさの異なる細胞集合体を 7 日間培養後、中心部の

酸素分圧をポルタンメトリー法を用いて測定した。また、培養 20 日から 50 日までの細胞集合体を 4%パラホルムアルデヒドで処理後、パラフィン包埋薄切切片を作製し、低酸素誘導因子 (HIF-1 α) および血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の免疫蛍光染色を行った。

(3) 三次元細胞集合体の内部構造の検討

細胞集合体の内部構造を観察することを目的として、培養 50 日までの試料について、凍結断面法を併用した走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、およびヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。細胞集合体内部に形成された軟骨様基質の観察には Alcian blue 染色および Type collagen (Col), Type X collagen, コンドロモジュリン (ChM-1) の免疫蛍光染色を施した。つづいて、集合体内の石灰化基質の観察には von Kossa 染色を行った。さらに、沈着した石灰化基質について詳細な検討を行うことを目的として、培養 50 日の細胞集合体に対して、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDX) および微小 X 線回折法 (micro-XRD) による定性評価を行った。

(4) 三次元細胞集合体が血管新生に与える影響の検討

培養 3 日あるいは 50 日の細胞集合体を血管内皮細胞・線維芽細胞積層組織上で 7 日間培養し、血管内皮細胞特異的表面抗原 CD31 の免疫蛍光染色を行った。得られた染色像から血管内皮細胞の占める面積割合を算出することで、細胞集合体が血管内皮細胞の成長に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 三次元細胞集合体の長期培養法の確立

細胞集合体をスピナーフラスコを用いて回転培養すると、2 - 3 日で集合体は分散消失した。一方、シーソー型バイオリアクターを用いて振盪培養を行ったところ、三次元的な球形状を維持したままでの長期間培養が可能であった。振盪培養において、作製直後の細胞集合体の大きさを 1 とした場合、培養 2 日目では 0.40 ± 0.09 と小さくなったが、その後は経時的に大きさを増し、培養 50 日目では 0.92 ± 0.20 となった (図 1)。

これらの結果から、振盪培養の場合、細胞集合体を構成する BMSC は、集合体内で細胞増殖あるいは細胞外基質を産生することが可能であることが示された。

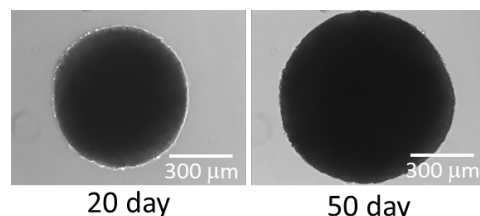


図 1. 細胞集合体の光学顕微鏡像

(2) 三次元集合体培養が内部の細胞に与える影響の検討

異なる大きさの細胞集合体中心部の酸素分圧を測定したところ、集合体の大きさが増加するにしたがって、中心部の酸素分圧は低下することが分かった。さらに、HIF-1 α および VEGF の免疫蛍光染色の結果、ともに細胞集合体中間層に存在する BMSC に強く発現していることが明らかとなった(図2)。

BMSC は低酸素環境に曝されることで HIF-1 α を、低栄養状態で VEGF を強く発現することが分かっており、これらの結果から、細胞集合体内部の BMSC は低酸素および低栄養環境に曝されていることが示された。

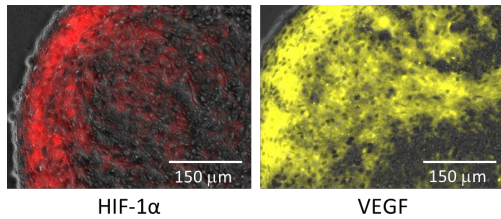


図2. 細胞集合体の免疫蛍光染色像

(3) 三次元細胞集合体の内部構造の検討

細胞集合体内で産生された軟骨基質の観察を行ったところ、培養期間を通じて Col などの軟骨基質は集合体最外層には沈着しておらず、内層のみに存在することが分かった。また、培養 50 日目の試料では、軟骨基質は中心部には沈着しておらず、集合体内部の中間層のみに沈着していることが明らかとなった(図3a)。これら軟骨基質は、HIF-1 α と VEGF の発現部位と一致していること、さらに、生体骨において、HIF-1 α や VEGF は骨端の軟骨細胞の生存や増殖、さらには軟骨内骨化過程において重要な役割を有していることから、集合体を構成する BMSC は軟骨細胞に分化したと考えられた。

von Kossa 染色の結果、培養 20 日および 30 日の試料においては、細胞集合体内部に石灰化沈着は観察されなかったが、培養 40 日目の試料では中心部にわずかに沈着していた。さらに培養 50 日目では、細胞集合体中心部に石灰化沈着が集積していることが明らかとなった(図3b)。また、細胞集合体中心部の SEM 観察の結果、培養 50 日目の試料において石灰化物の沈着が観察された。

また、観察された細胞集合体中心部の石灰化沈着物を EDX および micro-XRD を用いて組成分析したところ、骨基質の主成分であるハイドロキシアパタイトであることが明らかとなった。

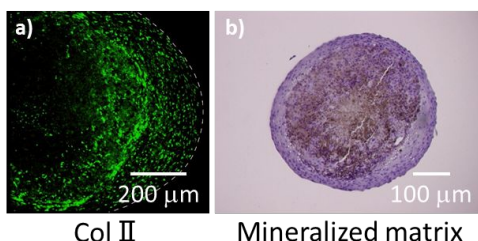


図3. 細胞集合体内の細胞外基質

さらに、各基質の染色強度を定量評価した結果、軟骨内骨化に特徴的な波形を示すことが分かった。以上の結果から、細胞集合体を骨系分化誘導することで、外層における軟骨細胞分化層の形成、その内層における骨系細胞分化層と石灰化沈着の形成過程を観察することができた。これは *in vivo* における硬組織生成過程を近似的に再現している。これらのことより、細胞集合体内において BMSC は、軟骨内骨化様の骨化過程によって石灰化沈着を誘導していることが示された。

(4) 三次元細胞集合体が血管新生に与える影響の検討

細胞集合体の血管内皮細胞との共培養の結果、培養 50 日目 (mature construct) の試料においては、血管内皮細胞の成長に影響は認められなかった(面積割合: $5.2 \pm 1.9\%$) が、培養 3 日目 (immature construct) の試料では、血管内皮細胞の成長が抑制された(同: $1.2 \pm 0.4\%$)(図4)。

生体内での軟骨内骨化初期段階において、軟骨に対する血管侵入は ChM-1 の影響により抑制されていることがわかっており、本研究で見られた結果は、生体内の骨化過程に近似しているといえる。これらのことから、BMSC からなる細胞集合体を骨系分化誘導することで、集合体が周囲の細胞へ与える影響についても軟骨内骨化を再現している可能性が示された。

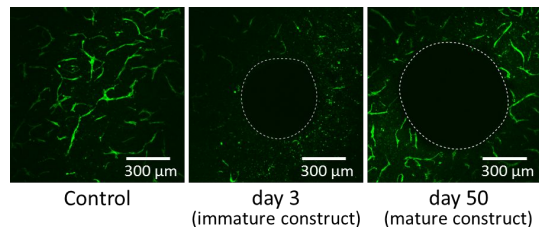


図4. 細胞集合体内の外部環境の検討

本研究において、細胞集合体の骨系分化誘導により、石灰化基質が内軟骨性骨化の過程で構築されることが示された。また、骨発生段階における軟骨組織に対する血管組織応答と同様に、細胞集合体外部においても血管成長が抑制されることが分かった。細胞集合体を骨系分化誘導することで、生体骨組織の発生過程や構造を *in vitro* で再現することが可能であり、これを応用することで安全かつ有用性の高い新規骨移植材料を創製できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Egusa H, Kayashima H, Miura J, Uraguchi S, Wang F, Okawa H, Sasaki JI, Saeki M, Matsumoto T, Yatani H. Comparative analysis of mouse induced pluripotent stem cells and mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation in vitro. *Stem Cells and Development* (in press). 査読有

佐々木淳一, 今里 聡. 歯髄再生技術はここまで進化した 第3回: 成長因子やシヤフォールドの応用. *日本歯科評論* 73(12), 141-143, 2013. 査読無

佐々木淳一, 今里 聡. 歯髄再生技術はここまで進化した 第2回: 歯由来以外の細胞を用いた歯髄再生の試み. *日本歯科評論* 73(11), 145-147, 2013. 査読無

佐々木淳一, 今里 聡. 歯髄再生技術はここまで進化した 第1回: 歯由来の細胞を用いた歯髄再生の試み. *日本歯科評論* 73(10), 153-155, 2013. 査読無

Egusa H, Kobayashi M, Matsumoto T, Sasaki JI, Uraguchi S, Yatani H. Application of cyclic strain for accelerated skeletal myogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells with cell alignment. *Tissue Engineering Part A* 19 (5-6), 770-782, 2013. 査読有

Sasaki JI, Matsumoto T, Egusa H, Matsusaki M, Nishiguchi A, Nakano T, Akashi M, Imazato S, Yatani H. *In vitro* reproduction of endochondral ossification using 3D mesenchymal stem cell construct. *Integrative Biology* 4(10), 1207-1214, 2012. 査読有

An SH, Matsumoto T, Miyajima T, Sasaki JI, Narayanan R, Kim KH. Surface characterization of alkali- and heat-treated Ti with or without prior acid etching. *Applied Surface Science* 258(10), 4377-4382, 2012. 査読有

An SH, Matsumoto T, Sasaki JI, Miyajima T, Narayanan R, Imazato S, Kim KH. *In vitro* bioactivity evaluation of nano- and micro-crystalline anodic TiO₂: HA formation, cellular affinity and organ culture. *Materials Science and Engineering C* 32(8), 2516-2522, 2012. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

佐々木淳一, 松本卓也, 今里 聡. 基質配向ハイドロゲルを応用した皮質骨様組織の構築. 第13回日本再生医療学会総会(2014年3月4日, 京都市)

佐々木淳一, 松本卓也, 今里 聡. 三次元細胞集合体内における血管内皮細胞の共培養. 第35回日本バイオマテリアル学会大会(2013年11月26日, 東京都)

佐々木淳一, 毛利有希子, 竹重文雄, 今里 聡. 歯髄組織工学に向けた棒状三次元細胞集合体の作製. 第138回日本歯科保存学会2013年度春季学術大会(2013年6月27日, 福岡市)

佐々木淳一, 松本卓也, 毛利有希子, 吉本いつみ, 今里 聡. 三次元細胞集合体における骨/軟骨基質形成プロセスの解析. 第10回日本再生歯科医学会学術大会(2012年9月2日, 神戸市)

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. 第59回日本歯科理工学会学術講演会(2012年4月15日, 徳島市)

〔その他〕

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=2796&a2=0000007&k=%E4%BD%90%E3%80%85%E6%9C%A8&kc=1&o=affiliation&pp=50&sm=affiliation&sl=ja&sp=1>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 淳一 (SASAKI JUN-ICHI)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号: 50530490