

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293404

研究課題名(和文) 生体類似組織構築のための人工細胞外マトリックスの創製

研究課題名(英文) Creation of Extracellular Matrices for Duplicating Natural Tissue Structure

研究代表者

加藤 功一 (Kato, Koichi)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：50283875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：顎関節軟骨は基底部の硝子軟骨層および関節摺動面の繊維軟骨からなる複合組織である。この例に代表されるように、異なる組織構造が機能発現の鍵を握る組織は少なくない。顎関節症に伴う損傷軟骨の再建には間葉系幹細胞を用いた再生治療が有効であると期待されているが、繊維軟骨 - 硝子軟骨からなる層構造を再建することが難しいため、その治療効果は満足できるものではない。本研究の結果、間葉系幹細胞から繊維軟骨および硝子軟骨の作り分けのための条件が見出され、さらに、それらの組織を合一させることで、繊維軟骨 - 硝子軟骨の二層構造をもつ組織体の形成が可能になった。

研究成果の概要(英文)：The temporomandibular joint cartilage is made of two distinct tissues including hyaline cartilage in the basal layer and fibrous cartilage in the surface layer. There are various tissues in which such heterotypic tissue structure plays an essential role in their functions. Recently mesenchymal stem cells have been received much attention due to their potentials to regenerate cartilage tissues in patients with a temporomandibular disorder. However, therapeutic outcome does not meet clinical needs because of a difficulty in creating layered structure with hyaline and fibrous cartilages. Our study demonstrated that hyaline and fibrous cartilage-like tissues can be separately induced from mesenchymal stem cells under appropriate culture conditions and that these tissues can be combined by culturing them in an extracellular cage to produce a hyaline-fibrous composite tissue.

研究分野：生体材料学

キーワード：繊維軟骨 硝子軟骨 間葉系幹細胞 組織工学 再生医療

1. 研究開始当初の背景

これまで約 20 年の間、組織工学に関する研究が国内外において盛んに行われてきた。その結果、皮膚や骨など複数の組織でその治療効果が認められるようになった。一方、幹細胞生物学の発展に伴い、脊髄損傷、パーキンソン病、網膜変性症など、細胞移植によって治療可能な怪我や疾病の治療に大きな期待が寄せられるようになった。このような再生医療技術の究極の姿は、生体の臓器・器官と類似の構造体を再生することであると考えられる。心臓や肝臓のように、複雑かつ秩序だった細胞配置と階層的な組織構造が機能発現の要となる大きな臓器を構築するための方法を開発しなければならない。しかし、そのような技術と現在の技術の間には大きなギャップのあるのが現状である。

このような大臓器の構築に至る前にも、例えば異なる二種類の組織からなる単純な構造体さえも容易には創り出せないのが現状である。このような課題に対して、細胞シートの積層、異種細胞の交互積層、細胞のバイオプリンティングによる三次元造形、屍体等から採取した臓器の脱細胞化処理と再細胞播種などが検討されているが、いずれも技術開発段階であり、組織の種類によっては必ずしも成功していないのが現状である。

本研究では、上述のような組織構造の再建が重要な例として、顎関節軟骨の再生を治療ターゲットとして取り上げた。日本人の二人に一人は何らかの顎関節部の異常があると言われているが、その治療は対症療法が中心である。しかしながら、重度の関節軟骨変性を伴う場合には、軟骨の再生治療が効果的であると考えられている。そのような治療に関して、これまでにも多くの試みがあるが、主に摺動面の潤滑に問題があり、決して満足できる状況ではない。その原因の一つに、顎関節軟骨の特徴である繊維性軟骨(表層部)と硝子軟骨(深層部)の二層構造が再現できないことにある。本研究ではこの問題の解決に挑戦した。

関節軟骨の再建は、とくに整形外科領域において古くから試みられてきた。1997 年にはすでに自家軟骨細胞移植による関節軟骨再生が米国 FDA の認可を受けたが、高度に分化した軟骨細胞は自己増殖能に乏しく、二次元培養系では脱分化を起こし易いため、十分満足できる治療法とはなっていない。さらに重要な点は、多くの場合繊維軟骨しか新生せず、硝子軟骨を得るのが難しかったことである。しかし最近の報告によれば、繊維芽細胞であっても Sox9 を発現させて I 型コラーゲンの産生を抑制すれば硝子軟骨が形成させることが可能である(Hiramatsu K, et al., J. Clin. Invest. 2011, 121:640)。これらを考慮すると、増殖性のある間葉系幹細胞をもとに、適切な因子を作用させることによって繊維軟骨と硝子軟骨の作り分けが可能であり、また、そのような方法は臨床応用を考える上

で大きな意義があるものと思われる。

2. 研究の目的

本研究は、組織工学の技術を活用した損傷組織の再生治療に関するものであるが、中でもとくに、顎関節軟骨の再生治療をターゲットとして研究を進めた。

顎関節軟骨は基底部の硝子軟骨層および関節摺動面の繊維軟骨からなる複合組織である。この例に代表されるように、異なる組織構造が機能発現の鍵を握る組織は少ない。顎関節症に伴う損傷軟骨の再建には間葉系幹細胞を用いた再生治療が有効であると期待されているが、硝子軟骨-繊維軟骨からなる層構造を再建することが難しいため、その治療効果は満足できるものではない。

本研究では、患者自身から採取される間葉系幹細胞と人工足場材料を組み合わせ、体外にて適切な組織構造を人工的に構築した後、患者の顎関節に移植する治療法を想定した。体外での培養によって、間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化させるとともに、上述のような繊維軟骨と硝子軟骨が二層構造をもつ移植辺を作製することを試みた。具体的には、以下の研究に取り組んだ。

(1) 線維軟骨・硝子軟骨誘導条件の探索：間葉系幹細胞の *in vitro* 培養によって、繊維軟骨組織と硝子軟骨組織を作り分ける条件を見出す。そのため、(i) 適切な分化誘導因子カクテルを同定するとともに、(ii) それらの軟骨組織の形成に適した培養条件を見出す。

(2) 線維軟骨-硝子軟骨複合化組織片の作成：上記の検討をもとに、線維軟骨及び硝子軟骨組織片を作製し、それらを *in vitro* で合体させて、線維軟骨-硝子軟骨複合化組織片を作製するために適した培養条件を見出す。

3. 研究の方法

(1) 線維軟骨・硝子軟骨誘導条件の探索
ヒト間葉系幹細胞(hMSC)から軟骨に分化させる際に用いる成長因子について、これまで使用頻度の高かった TGF- β 3, IGF-1, BMP-2 に着目し、軟骨への分化効率のよい培養条件、また線維軟骨及び硝子軟骨への分化に適した培養条件について検討した。

細胞培養：細胞には不死化 hMSC 及び正常 hMSC (Lonza, Basel, Schweiz) を用いた。細胞増殖培地には、DMEM に 10% ウシ胎児血清, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 1 ng/ml FGF-2 を添加した培地を用いた。実験には 2~3 回継代した細胞を用いた。

軟骨分化誘導： α MEM に 0.1 μ M dexamethasone, 50 μ g/ml L-ascorbic acid 2-phosphate, 4.5 g/l D-glucose, 100 μ g/ml

sodium pyruvate , 1% ITS+ (BD Biosciences) , 2 mM L-glutamine , 100 U/ml penicillin , 100 µg/ml streptomycin を添加した培地を用い hMSC のペレット培養を行った。hMSC を 90%コンフルエントにまで細胞増殖培地にて増殖させた後、リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄し、0.25%トリプシン EDTA を用いて細胞を回収した。そして 15 ml 遠沈管 1 本あたり 25 万個ずつ細胞を分け、200 g で遠心してペレット化した後、0.5 ml の軟骨分化培地を添加し、細胞を分散させることなく培養した。培地に、10 ng/ml TGF-β3 , 100 ng/ml IGF-1 , 50 ng/ml BMP-2 を単独あるいは 2 因子の組合せとして添加した。これらの濃度は、過去の多くの研究で採用された濃度を参考にして決定した。分化開始後 2 日目に軟骨分化培地量を 0.5 ml から 1.0 ml とし、それ以降は 2 , 3 日毎に培地交換を行った。培養期間は 28 日とした。また、Ⅱ型コラーゲンの追加効果についても調べた。

軟骨分化の判定：培養後のペレットが軟骨分化を起こしたことの判定は、主に分化マーカー (Ⅰ型及びⅡ型コラーゲン、アグリカン) の発現を定量 PCR 法にて分析することにより行った。判定の補助としてトルイジンブルー染色、グリコサミノグリカン定量、Ⅰ型及びⅡ型コラーゲンの免疫染色を行った。

リアルタイム PCR において、軟骨特有の細胞外基質であるⅡ型コラーゲン及びアグリカンの発現が、対照群と比較して、有意に高値であった場合に、軟骨に分化したものと判定した。軟骨と判定された群の内、それらが硝子軟骨、線維軟骨どちらに分化するかの判定については、溝口らの報告を参考にした。すなわち、下顎頭軟骨各層はⅡ型及びⅢ型コラーゲンの分布に違いがみられ、表層の線維軟骨はⅡ型コラーゲンが多く分布し、深層の硝子軟骨にはⅢ型コラーゲンが多く分布すると述べている。よって、Ⅱ型コラーゲン/Ⅲ型コラーゲン比 (col2/col1 比) が高値であれば硝子軟骨に分化したものと判定し、低値であれば線維軟骨に分化したものと判定した。

(2) 線維軟骨-硝子軟骨複合化組織片の作成

hMSC を用いて、線維軟骨と硝子軟骨の 2 層構造から成る顎関節軟骨様複合組織の構築を試みた。すなわち、(1) で得られた知見をもとに、hMSC から線維軟骨様組織及び硝子軟骨様組織をそれぞれ独立に作製し、その後、それら 2 種類のペレットを密着させて培養し、融合させることによって複合組織の形成が可能であるかについて検討した。ペレットの密着培養には、それらの相対位置を固定するため 3 次元プリンターを用いて作製した鋳型を利用することを考案した。

細胞培養：前述の方法と同様の方法で行っ

た。

鋳型の作製：ペレット同士を密着させて結合させる際に、3 次元プリンターで作製された箱状の鋳型を用いることにした。プリンターには、熱融解型 3 次元プリンター (Leap frog, Netherlands) を使用し、ポリスチレン製の鋳型を作製した。鋳型は、12 穴プレートの各ウェル内に収まるよう縦横 15 mm の正方形、高さ 5 mm のブロック状とした。その中心に縦 1.0 mm 横 2.5 mm 高さ 1.0 mm のくぼみを形成し、そのくぼみに 2 つの細胞ペレットを並べられるようにした。また、鋳型の内部を培地が循環できるように、空隙率設定を 50% として、多孔質性の鋳型をプリンティングした。

軟骨分化誘導：前節で得た情報をもとに、hMSC の軟骨分化培養を行った。その際、線維軟骨分化誘導には TGF-β3 及び BMP-2 を添加し、硝子軟骨分化誘導には TGF-β3 , IGF-1 , Ⅱ型コラーゲンを添加した。培養開始 14 日後、線維軟骨様ペレット及び硝子軟骨様ペレットの 1 個ずつを 3D プリンターで作製した鋳型内に密着させて配置し、軟骨分化培地 (TGF-β3 を含むが、IGF-1 , BMP-2 , Ⅱ型コラーゲンは含まない) 中、12 穴プレート内でさらに 14 日間 (全培養期間 28 日) 培養した。その後、組織切片を作成し、H-E 染色、トルイジンブルー染色、およびⅡ型およびⅢ型コラーゲンの免疫染色を行い、複合組織中の線維及び硝子軟骨様組織の分布について調べた。

4 . 研究成果

(1) 線維軟骨・硝子軟骨誘導条件の探索

Ⅱ型コラーゲンおよびアグリカンは、軟骨組織に高発現するの細胞外マトリックスである。そこで、培養後のペレット内におけるそれらの発現量を調べた結果、TGF-β3 を単独、および、TGF-β3 と BMP-2 あるいは TGF-β3 と IGF-1 を同時に作用させた場合にⅡ型コラーゲンおよびアグリカンの発現がもっとも高値であった。すなわち、hMSC の軟骨分化には、とくに TGF-β3 が有効であると考えられた。この結果は、以前の報告とよく一致する。

種々の条件下で培養したペレットにおける col2 / col1 比は、TGF-β3 を単独で添加した場合と比較し、TGF-β3 と BMP-2 を同時に作用させた場合に小さく、TGF-β3 と IGF-1 の組合せた場合に大きかった。この結果から、TGF-β3 に加えて BMP-2 を添加すると線維軟骨様組織が、一方、IGF-1 を添加すると硝子軟骨様組織が形成される傾向にあることがわかった。

TGFβと BMP はいずれも、TGFβシグナル伝達経路を介して hMSC の軟骨形成を促進することが知られている。また、過剰な TGFβシグナルが組織の線維化を引き起こすとの

報告がある。従って、TGF- β 3 と BMP-2 の同時添加でみられた繊維軟骨様組織の形成は、過剰な TGF β シグナルに起因すると考えられる。他方 IGF-1 は、TGF β シグナルとは異なる経路を介して軟骨成熟に関与することが知られている。この効果が、TGF- β 3 と IGF-1 の同時添加による硝子軟骨様組織の形成に寄与したと思われる。さらに、ペレットにおける col2/col1 比は、II 型コラーゲンの添加によって上昇した。すなわち、II 型コラーゲンの添加が硝子軟骨分化に有効であることが示された。以上の細胞成長因子および II 型コラーゲンの効果は、正常 hMSC でも同様にみられた。

(2) 線維軟骨-硝子軟骨複合化組織片の作成

線維軟骨様組織および硝子軟骨様組織をもつペレットを別々に作成した後、両者を密着させて 14 日間培養した。その結果、両ペレットの細胞が界面において増殖し、ペレット同士が合一した。免疫染色により、密着培養の開始初期に繊維軟骨様組織であった部位では硝子軟骨様組織であった部位に比べ I 型コラーゲンの産生量が多く、逆に II 型コラーゲンの産生量は少ないことがわかった。この結果は、繊維軟骨/硝子軟骨の二層構造をもつ組織体の形成されたことを示している。

以上のように、hMSC の軟骨分化培養において、TGF- β 3 および BMP-2 を培地に添加すると繊維軟骨の形成が促進され、一方、TGF- β 3、IGF-1、II 型コラーゲンを添加すると硝子軟骨の形成が促進されることが分かった。また、繊維軟骨様ペレットと硝子軟骨様ペレットを密着させて培養することによって、繊維軟骨/硝子軟骨の二層構造をもつ組織体の形成が可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 5 件)

(1) Koichi Kato: Genetically engineered proteins as functional building blocks of tissue engineering scaffolds, Seminar at Department of Functional Materials in Medicine and Dentistry, Würzburg University, May 13, 2015, Würzburg, Germany

(2) 杉野浩孝, 金輪真佐美, 谷本幸太郎, 加藤功一: 間葉系幹細胞の硝子/線維軟骨への分化制御, 第 3 回日本バイオマテリアル学会中四国シンポジウム, 2015 年 1 月 28 日, 岡山

(3) 杉野浩孝, 金輪真佐美, 谷本幸太郎, 加藤功一: 間葉系幹細胞の硝子/線維軟骨への分化に及ぼす細胞成長因子及びコラーゲンの影響, 第 65 回日本歯科理工学会術講演会, 2015 年 4 月 11 日~4 月 12 日, 仙台

(4) 西尾文子, 平田伊佐雄, 加藤功一: 生体分解性ポリエステル結合性増殖因子の分子設計, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, 2014 年 11 月 17 日~11 月 18 日, 東京

(5) Koichi Kato: Perspective of future dental materials. Seminar & Workshop of CPD in Dental Materials, April 25-27, 2014, Surabaya, Indonesia

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 功一 (KATO, Koichi)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号: 5 0 2 8 3 8 7 5

(2) 研究分担者

中路 正 (NAKAJI, Tadashi)

富山大学・大学院理工学研究部・准教授
研究者番号: 1 0 5 4 3 2 1 7

(3) 研究分担者

谷本 幸太郎 (TANIMOTO, Kotaro)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号: 2 0 3 2 2 2 4 0

(3) 研究分担者

平田 伊佐雄 (HIRATA, Isao)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号: 4 0 3 4 6 5 0 7