

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282133

研究課題名(和文)酸素供給型培養デバイスによる骨-血管複合組織体形成と応用

研究課題名(英文) Construction of cell-based composite tissue by using an oxygen permeable culture device

研究代表者

穴田 貴久 (Anada, Takahisa)

東北大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30398466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体外での三次元細胞組織体構築は組織再生工学における最重要課題の一つである。通常細胞を生体外で何層にも積層すると内部酸素不足により壊死が起こることが問題点である。本研究はこの内部壊死を抑制するための酸素透過性三次元細胞培養器を基盤として、血管様構造体を持つ間葉系幹細胞の組織体構築を行うことを目的とした。培養デバイスにより間葉系幹細胞の骨芽細胞分化の促進と血管内皮細胞との複合体構築に成功した。これらの結果から当該培養デバイスは応用性、汎用性が高く、再生医療への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Engineering three-dimensional (3D) cellular constructs outside of the body is one of the most important issues for tissue engineering. Increase in size of cellular aggregates causes a depletion of oxygen in the core of aggregates. We have developed an oxygen-permeable cell culture device to prevent hypoxia in the core of the cellular aggregates. The aim of this study was construction of 3D cellular structure consisted of mesenchymal stem cells (MSCs) and vascular endothelial cells based on the oxygen-permeable device we developed. We found that the device was able to improve osteoblastic differentiation of MSCs and generate cellular aggregates consisted of two types of cells. These results suggest that the device is useful for engineering 3D cellular constructs for tissue engineering.

研究分野：再生医工学

キーワード：細胞・組織工学材料 細胞培養デバイス

1. 研究開始当初の背景

骨は生物の運動機能の要となる組織である。骨の形成と吸収は常に血管を中心に営まれている。複数の細胞種や血管網によって構成される骨は想像以上に複雑な構造を持ち、生体外で血管網を有する骨組織を構築する技術は未だ確立されていない。一方、疾病などにより骨に障害が起き、患者の QOL が損なわれることが社会の高齢化に伴って大きな問題になっている。現在、骨修復のゴールドスタンダードは患者自身の骨を採取し、埋入する自家骨移植である。しかし、自家骨は少量しか取ることができず、採取には健全な部位への外科的侵襲が必要となる。このため、リン酸カルシウムに代表される骨代替材料が開発されているが、自家骨に比べて骨再生能や吸収性が劣るのが欠点である。この欠点を補うためリン酸カルシウムと高分子、細胞、成長因子の複合化が行われているが、自家骨と比較すると再生能が十分とは言えず、新たなブレークスルーが望まれている。そこで、本研究は独自開発した培養装置を基盤とすることで、生体外で厚みのある三次元組織を構築し、骨再生治療へ応用することを目的とする。本研究は医学、生物学的知識に加え、培養器開発のための工学的知識や技術を融合して創出される学際的な領域である。研究代表者はこれまでに生体材料学、再生医学、組織工学を主に研究しており、工学と医歯学の境界領域における研究を通じて、分子から細胞、個体レベルにわたる骨形成機序解明、組織再生材料、細胞培養技術、治療法に関する研究を行ってきた。また、これまでに微細加工技術を駆使した独自開発のスフェロイド培養器の開発に成功し、特許出願および論文投稿を行っている (Anada et al. 2012 Biomaterials 及び Anada et al. 2010 Sens Actuators B)。酸素要求量が高い肝癌細胞株をモデル細胞として実験を行った結果、酸素透過性培養器を用いることで、スフェロイドへの酸素供給が大幅に向上し、細胞増殖が著しく向上することを見出した。また、細胞塊内部の状態を低酸素プローブにより比較したところ、従来法ではスフェロイド直径が 100 μm を超えると内部の大部分が低酸素 (10 mmHg 以下) におちいるのに対して、本培養器では直径 400 μm でも内部まで酸素が供給されることがわかった。この効果により、酸素透過性培養器では酸素不足によるネクrosis が大幅に抑制されることを見出した。また、肝機能マーカーであるアルブミン産生を調べた結果、本培養器は、従来法に比べてより長期間高い活性を維持できることがわかった。以上より、当該培養器は、細胞塊内部まで酸素を供給することが可能であり、細胞生存に優位な代謝環境や分化の促進・維持を可能にすることがわかった。このような細胞組織体の内部壊死を抑制することができる培養デバイスは、様々な応用展開が可能である。この培養装置は、従来の三次

元培養法の課題を解決し、さらに安定に酸素を供給することで細胞組織体の生存率を大幅に向上させることができる画期的なものである。

2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究では独自培養技術により種々の組織へと応用可能な三次元組織培養におけるブレークスルー技術を創出し、生体外で「生きが良く、血の通った細胞組織」を作製し、細胞組織・器官再構築を目標とする。具体的には、独自開発の酸素透過性細胞培養器に間葉系幹細胞と血管内皮細胞を播種する。培養器内で細胞が自己組織的に凝集し、血管様構造体を有する球状塊 (スフェロイド) が形成される。培養器から酸素が安定に供給されるため内部壊死がなく、高機能なスフェロイドを一度に大量調製することができる。これを組織化し、生体へ移植することで宿主血管との迅速な結合、血管網の発達が起こり、自家骨に匹敵する広範囲骨欠損再生が可能になると期待できる。

3. 研究の方法

酸素透過性培養器 (Oxy chip) を酸素透過性高分子であるポリジメチルシロキサン (PDMS) を用いることで独自設計し、作製した (Anada et al. 2012 Biomaterials)。比較として酸素を透過しない従来法のモデル培養器 (non-Oxy chip) も同時に作製し比較実験を行った。これらチップに間葉系幹細胞 (MSC) を播種し、培養器および培養条件の最適化を図った。MSC はマウス間葉系幹細胞株 D1 や C3H10T1/2 を用いた。まずは骨芽細胞分化を培養器を用いて最適化した後、他の技術との複合化を行った。さらに、本研究では、血管内皮前駆細胞 HUVEC を用いて、培養器内で MSC と共培養を行った。両細胞の混合比を変化させて播種し、MSC スフェロイド内での血管様管腔形成の評価を行った。細胞を蛍光標識しておき、共焦点顕微鏡を用いて細胞組織内での管腔形成を経時的に観察した。形成した組織体を固定化し、組織切片を作製することで形態の経時的变化を観察した。また、二つの細胞を共培養することによって骨芽細胞分化にどのような影響があるかについても検証を行った。骨芽細胞分化についてはリアルタイム PCR による検討 (骨分化マーカーであるアルカリホスファターゼ、コラーゲン I、オステオカルシンなど) や切片作製による分化マーカーの免疫染色、アリザリンレッドによる石灰化量、表面抗原マーカーによる血管構造の評価を行った。

4. 研究成果

MSC は、培養条件により骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へと分化する。Oxy chip に D1 細胞を播種し、骨芽細胞分化誘導培地を

用いて細胞塊の骨芽細胞分化を誘導した。リアルタイムPCR及びDNAチップによって骨代謝関連遺伝子の発現を三次元培養(Oxy chip及びnon-Oxy chip)と平面培養で比較した。その結果、平面培養に比べて三次元培養の骨芽細胞分化は大幅に促進された。さらにOxy chipはnon-Oxy chipよりも骨芽細胞分化を促進した。DNAチップの解析により低酸素状態になると骨芽細胞よりも軟骨、脂肪細胞への分化が促進された。この結果から、MSCは、酸素分圧の違いによって分化に影響を受け、本培養システムを用いることで軟骨分化やネクローシスを抑制し、迅速に骨芽細胞への分化が誘導されることを見いだした。この結果について投稿し、受理された〔雑誌論文3〕。また、この培養システムをラット歯原性上皮細胞へ適用した結果、この細胞のエナメル芽細胞への分化が促進されることを見だし、報告している〔雑誌論文1〕。さらに、MSCと血管内皮細胞をデバイス中で共培養することで複合細胞塊を一度に大量に作製することに成功した。二種の細胞を異なる割合で混合し、培養することで細胞塊内部に血管様構造体が形成され、複合組織体の移植への応用可能性を示唆する結果が得られた(投稿準備中)。以上のように当該培養デバイスは応用性、汎用性が非常に高く、再生医療の中核技術としての可能性を有する技術であることが確かめられた。

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)

〔雑誌論文〕(計17件)

1. M Tadaki, T Anada, Y Shiwaku, T Nakamura, M Nakamura, M Kojima, T Arai, S Fukumoto, O Suzuki. (2016) A 3D culture model study monitoring differentiation of dental epithelial cells into ameloblast-like cells RSC Adv 6: 62109-62118. DOI: 10.1039/C6RA04570G (査読有)
2. B Hirayama, T Anada, Y Shiwaku, N Miyatake, K Tsuchiya, M Nakamura, T Takahashi, O Suzuki. (2016) Immune cell response and subsequent bone formation induced by implantation of octacalcium phosphate in a rat tibia defect RSC Adv 6: 57475-57484. DOI: 10.1039/C6RA10834B (査読有)
3. Kamoya T, Anada T, Shiwaku Y, Takano-Yamamoto T, Suzuki O. (2016) An oxygen-permeable spheroid culture chip (Oxy chip) promotes osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells Sensors & Actuators: B. Chemical 232 pp. 75-83. DOI: 10.1016/j.snb.2016.03.107 (査読有)
4. Anada T, Sato T, Kamoya T, Shiwaku Y, Tsuchiya K, Takano-Yamamoto T, Sasaki K, Suzuki O. (2016) Bioactivity of octacalcium phosphate utilizing osteoblastic cell aggregates in a spheroid culture device. Regenerative Therapy 3: 58-62. DOI: 10.1016/j.reth.2016.02.004 (査読有)
5. Ishiko-Uzuka R, Anada T, Kobayashi K, Kawai T, Tanuma Y, Sasaki K, Suzuki O. (2016) Oriented bone regenerative capacity of octacalcium phosphate/gelatin composites obtained through two-step crystal preparation method. J Biomed Mater Res B Appl Biomater in press. DOI: 10.1002/jbm.b.33640 (査読有)
6. A Henmi, H Okata, T Anada, M Yoshinari, Y Mikami, O Suzuki, Y Sasano. (2016) Bone matrix calcification during embryonic and postembryonic rat calvarial development assessed by SEM-EDX, XRD and FTIR, J Bone Miner Metab, 34, 41-50. DOI: 10.1007/s00774-014-0647-x (査読有)
7. N Kanda, T Anada, T Handa, K Kobayashi, Y Ezo, T Takahashi, O Suzuki. (2015) Orthotopic osteogenicity enhanced by a porous gelatin sponge in a critical-sized rat calvaria defect. Macromol Biosci 15:1647-1655 DOI: 10.1002/mabi.201500191 (査読有)
8. M Yamada, T Anada, T Masuda, T Takano-Yamamoto1, O Suzuki. (2015) Effect of mechanical stress on differentiation of mouse mesenchymal stem cells seeded into an octacalcium phosphate-gelatin scaffold. Sens Actuators B Chem, 220: 125-130. DOI: 10.1016/j.snb.2015.05.073 (査読有)
9. T Miyazaki, S Miyauchi, T Anada, A Tawada, O Suzuki. (2015) Chondroitin sulfate-E binds to both osteoactivin and integrin V 3 and inhibits osteoclast differentiation. J Cell Biochem, 116:2247-2257. DOI: 10.1002/jcb.25175 (査読有)
10. K Takahashi, N Shiraishi, R Ishiko-Uzuka, T Anada, O Suzuki, H Masumoto, K Sasaki. (2015) Biomechanical Evaluation of Ti-Nb-Sn Alloy Implants with a Low Young's Modulus. Int J Mol Sci 16:5779-5788. DOI: 10.3390/ijms16035779 (査読有)
11. Itoigawa Y, Suzuki O, Sano H, Anada T, Handa T, Hatta T, Kuwahara Y, Takahashi A, Ezo Y, Kaneko K, Itoi E. (2015) The role of an octacalcium phosphate in the reformation of infraspinatus tendon insertion. J Shoulder Elbow Surg 24: e175-184. DOI: 10.1016/j.jse.2015.01.011 (査読有)
12. Ezo Y, Anada T, Yamazaki H, Handa T, Kobayashi K, Takahashi T, Suzuki O. (2015) Characterization of partially hydrolyzed

OCP crystals deposited in a gelatin matrix as a scaffold for bone tissue engineering. *J Nanopart Res*, 17:127. DOI: 10.1007/s11051-015-2864-1 (査読有)

13. K Kobayashi, T Anada, T Handa, N Kanda, M Yoshinari, T Takahashi, O Suzuki. (2014) Osteoconductive property of a mechanical mixture of octacalcium phosphate and amorphous calcium phosphate. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6 (24): 22602-22611. DOI: 10.1021/am5067139 (査読有)

14. 鈴木 治, 穴田貴久. (2014) ハイドロキシアパタイト前駆体の結晶化が調節する生体反応. *バイオマテリアル 生体材料* 32(3):.180-187. <http://ci.nii.ac.jp/naid/40020179581> (査読無)

15. K Hoshi, H Kawaki, I Takahashi, N Takeshita, M Seiryu, S A Murshid, T Masuda, T Anada, R Kato, H Kitaura, O Suzuki, T Takano-Yamamoto. (2014) Compressive force-produced CCN2 induces osteocyte apoptosis through ERK1/2 pathway. *J Bone Miner Res.*, 29:1244-1257. DOI: 10.1002/jbmr.2115 (査読有)

16. R Nishikawa, T Anada, R Ishiko-Uzuka, O Suzuki. (2014) Osteoblastic differentiation of stromal ST-2 cells from octacalcium phosphate exposure. *Dent Mater J*, 33: 242-251. DOI: 10.4012/dmj.2013-226 (査読有)

17. K Suzuki, T Anada, T Miyazaki, N Miyatake, Y Honda, K N Kishimoto, M Hosaka, H Imaizumi, E Itoi, O Suzuki. (2014) Effect of addition of hyaluronic acids on osteoconductivity and biodegradability of synthetic octacalcium phosphate. *Acta Biomater*, 10(1):531-543. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.09.005 (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

1. 穴田貴久, 鈴木治, 酸素透過性三次元培養デバイスによる間葉系幹細胞培養、第16回日本再生医療学会総会、仙台、2017年3月7-9日

2. Anada T, Kamoya T, Sato T, Shiwaku Y, Takano-Yamamoto T, Sasaki K, and Suzuki O, The application of oxygen-permeable spheroid culture chip (Oxy chip) in bone tissue engineering, IDMC2016, Bali Indonesia, November 4-6, 2016

3. Anada T, Tadaki M, Shiwaku Y, Nakamura T, Nakamura M, Kojima M, Arai T, Fukumoto S, Suzuki O, The Effect of Three-dimensional Culture on The Ameloblastic Differentiation of Dental Epithelial Cells, International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, November 28-30, 2016

4. Anada T, Suzuki O, Oxygen supply to 3D cellular constructs using an oxygen-permeable culture device, 10th World Biomaterials Congress, Montreal Canada, May 17-22, 2016

5. 穴田 貴久, 福田 淳二, 鈴木 治, 酸素透過性三次元細胞培養デバイスの開発と応用、日本動物実験代替法学会第27回大会、2014年12月6日、横浜

6. 穴田貴久, 加茂谷拓央, 山本照子, 鈴木 治, 細胞組織体の低酸素化を抑制する酸素供給型培養デバイスの開発、第64回日本歯科理工学会術講演会、2014年10月4日~5日、広島

〔図書〕(計2件)

1. O Suzuki, T Anada, Y Shiwaku., (2016) Efficacy of calcium phosphate-based scaffold materials on mineralized and non-mineralized tissue regeneration. *Interface Oral Health Science*, pp.113-120, Springer

2. O Suzuki, T Anada. (2015) Bone related cell-stimulating scaffold materials and a 3D cellular construct for hard tissue regeneration. *Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems*, pp.261-274.

〔その他〕

ホームページ等

東北大学大学院

歯学研究科顎口腔機能創建学分野

<http://www.cfe.dent.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

穴田 貴久 (ANADA, Takahisa)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：30398466

(2)研究分担者

鈴木 治 (Suzuki, Osamu)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：60374948