

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462969

研究課題名(和文)細胞集合体システムと凍結乾燥技術を融合した新規骨移植材の開発

研究課題名(英文) Development of novel bone graft materials by combining scaffold-free cell construct and freeze dry technique

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が独自に開発したスキャフォールドフリーの細胞集合体構築システムを用いて作製した骨様組織体に凍結乾燥処理を施し、操作性や有用性の高い骨移植材料を開発することを目的とした。本研究の結果、適切な前処理を用いれば、内部に含まれる細胞外基質や石灰化基質を維持した状態で骨様組織体を凍結乾燥できることが分かった。本研究で得られた知見に基づき、骨髄間葉系幹細胞から作製した骨様組織体に凍結乾燥処理を施すことで、より有用性の高い骨移植材として加工できることが示された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to develop the bone graft materials by combining scaffold-free cell construct fabrication system and freeze dry technique. With the usage of appropriate pretreatments, bone-like constructs, fabricated through osteoinduction of aggregate of bone marrow stromal cells, were able to maintain extracellular matrix and mineralized matrices even after being freeze-dried. The freeze-dried bone like constructs achieved in this study are expected to be used as a useful biomaterial for bone regenerative medicine.

研究分野：組織工学

キーワード：生体材料学 再生歯学 骨補填材 細胞集合体

1. 研究開始当初の背景

骨再生技術の開発を目的とした研究において、これまで様々なアプローチが試みられており、細胞と生体材料を組み合わせることで *in vitro* あるいは *in vivo* で骨様の生体材料を構築したという研究報告は数多く存在する。しかし、いずれの骨再生技術も未だ臨床応用には至っていない。

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) ゲルを応用することで骨髄間葉系幹細胞のみで構成される三次元細胞集合体を作製するシステム (細胞集合体システム) を構築した (Sasaki J, *et al.* Tissue Engineering Part A. 2010)。さらに、この細胞集合体の培養法、および集合体を構成する細胞の骨芽細胞分化誘導法を考案し、細胞由来の骨関連基質やハイドロキシアパタイトが中心部に集積した骨様組織体を創製することに成功している (Sasaki J, *et al.* Integrative Biology. 2012)。しかしながら、骨様組織体の臨床応用を考えた場合、その内部に多くの水分が存在することから、生体材料としての保存性や術中における操作性が著しく低下してしまう可能性がある。そこで我々は、医薬品加工などにも利用されている凍結乾燥処理を施すことによって、この骨様組織体をより有用性の高い骨移植材に加工することが可能ではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、細胞集合体から誘導した骨様組織体に凍結乾燥処理を施し、その特性を *in vitro* において解析することにより、骨再生を可能にする操作性や有用性の高い骨移植材として応用可能であるかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 骨様組織体の作製と凍結乾燥処理

半球状の凹みを有する pNIPAAm ゲルにマウス骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) を播種することで得られた細胞集合体を、20% FBS 含有 DMEM に β グリセロフォスフェイト、デキサメタゾン、アスコルビン酸を添加した骨芽細胞分化誘導培地を用いて最大 50 日間培養した。得られた骨様組織体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、タンパク質保護液としてスクロース (Su) を加えた PBS、あるいはクエン酸ナトリウム緩衝液 (CA) に 4 で 1 時間浸漬した (PBS/Su+, CA/Su+)。また、比較対照群として、それぞれの緩衝液にスクロースを添加しなかった試料 (PBS/Su-, CA/Su-) を用意した。次に、これらの試料に対して -80 の予備凍結処理を 24 時間行い、その後、48 時間の凍結乾燥処理を行った。

2) 凍結乾燥処理による組織体の組成変化

凍結乾燥処理および、その前処理に用いるタンパク質保護液が集合体内に産生された細胞外基質 (ECM) に与える影響を検討するため、各保護液で処理した後に凍結乾燥処理した骨様組織体 (乾燥骨様組織体) 内部のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の定量評価を行った。また、凍結乾燥処理の時間が骨様組織体内部の ECM 活性に与える影響を検討することを目的として、タンパク質保護液に最大 6 時間浸漬した試料の ALP 活性を定量評価した。

次に、凍結乾燥処理が骨様組織体内に形成された石灰化基質に与える影響を検討するために、乾燥骨様組織体に含まれるカルシウム量を測定した。さらに、これら石灰化基質や ECM の組成に与える影響を検討することを目的として、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) による定性解析を行った。対照群として、凍結乾燥処理を施していない骨様組織体を用いた。

3) 凍結乾燥処理による組織体の構造変化

凍結乾燥処理が骨様組織体の構造に与える影響を検討することを目的として、凍結乾燥前後の骨様組織体の大きさを評価した。すなわち、培養 50 日目までの骨様組織体、および乾燥骨様組織体の大きさを実体顕微鏡像から計測し、凍結乾燥処理前の骨様組織体の体積に対する乾燥骨様組織体の体積を相対値として算出した。また、培養 20 日目の乾燥骨様組織体を PBS に浸漬した場合の大きさ変化についても検討した。さらに、切断した乾燥骨様組織体に対して金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて内部構造と表層の細胞の形態を観察した。

次に、各培養期間で作製した乾燥骨様組織体から、厚さ 5 μ m のパラフィン包埋薄切片を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン染色、および抗オステオポンチン抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、光学顕微鏡、あるいは蛍光顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

1) 凍結乾燥処理による組織体の組成変化

異なるタンパク質保護液で処理した乾燥骨様組織体に含まれる ALP 活性を測定した結果、培養 20 日目と 50 日目のいずれの試料においても、PSB/Su+ は CA/Su+ と比較して有意に ALP 活性量が多いことが分かった。また、PSB/Su- の ALP 活性量は PSB/Su+ と比較して有意に少なかった。さらに、培養 50 日目の試料においては、PSB/Su+ は対照群と ALP 活性量で有意差を示さないことが分かった。以上の結果から、CA と比較して PBS を用いることで、さらに、スクロースを添加した PBS で処理することで、骨様組織体内の ALP 活性

量をより維持できることが明らかとなった。また、タンパク質保護液による処理時間が1時間と6時間のサンプル間においてALP活性量に有意な差は認められなかった。

次に、スクロースを添加したタンパク質保護液が骨様組織体内部に沈着した石灰化基質に与える影響を検討した結果、PSB/Su+のカルシウム量は対照群と比較して有意差を示さなかったが、CA/Su+では有意に少なくなった。

さらに、FT-IRによる定性解析の結果、いずれの試料も培養20日目においては生体骨様のスペクトルを示さなかったが、培養50日目のPSB/Su+は、対照群と同様、生体骨に近似した組成であることが分かった。一方、培養50日目のCA/Su+は、リン酸基や炭酸基などの石灰化基質に由来するスペクトルに加えて、細胞が産生するECMのスペクトルも消失していることが分かった(図1)。以上の結果から、スクロースを添加したPBSを用いることで、骨様組織体内部に含まれる石灰化基質などの骨関連基質を保持した状態で凍結乾燥処理ができることが分かった。

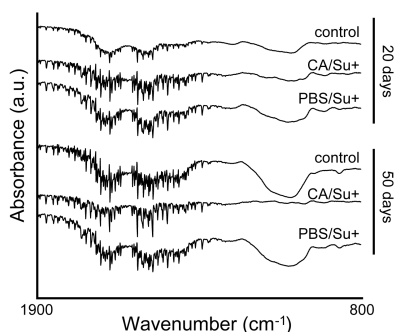


図1．乾燥骨様組織体のFT-IR定性解析

2) 凍結乾燥処理による組織体の構造変化

乾燥骨様組織体を実体顕微鏡で観察したところ、骨様組織体と同様の球状の形態を維持していた。さらに、培養50日までの経時的な試料を用いて、凍結乾燥処理が骨様組織体の形態に与える影響を検討した結果、骨様組織体の培養期間が長くなるにしたがって、凍結乾燥処理による体積の収縮が抑制されることが分かった(図2)。このことは、骨様組織体を長期培養することで組織体内部に石灰化基質やECMがより多く沈着し、その形状を維持しやすくなったためと考えられた。

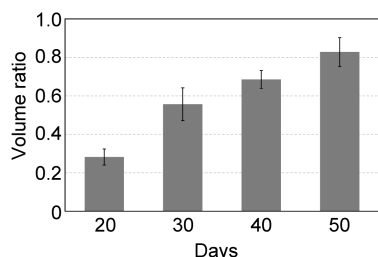


図2．凍結乾燥処理による骨様組織体の大きさ変化

乾燥骨様組織体を骨移植材として使用した場合、血液への暴露により大きさや内部構造が変化する可能性が考えられる。そこで、培養20日の乾燥骨様組織体をPBSに浸漬し、大きさ変化を評価したところ、浸漬後1時間以内に骨様組織体の体積は約1.5倍に増加することが分かった。一方、PBS浸漬1時間後から24時間後までにおいては、骨様組織体の大きさに変化はみられなかった。また、乾燥骨様組織体のSEM観察の結果から、凍結乾燥処理前後において、集合体の内部構造や集合体を構成する細胞の形態に明らかな変化は観察されなかった(図3)。

さらに、薄切切片を用いたヘマトキシリン・エオジン染色の結果においても、凍結乾燥前後で骨様組織体の内部構造に明らかな変化は観察されなかった。また、オステオポンチンの免疫蛍光染色を行ったところ、乾燥骨様組織体内部が全体的に染色されることが分かった。

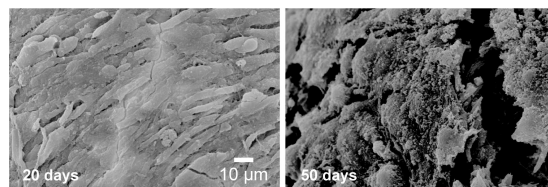


図3．乾燥骨様組織体のSEM観察

本研究の結果、骨様組織体に対してスクロース含有のPBSを用いて前処理を行うことで、骨様組織体の構造やECMの活性に影響を与えずに凍結乾燥処理を施すことが可能であることが示された。本研究によって作製法を確立することに成功した乾燥骨様組織体を応用することで、細胞療法とサイトカイン療法の両者の特徴を合わせ持つ新規骨移植材を作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5件)

1) Okawa H, Kayashima H, Sasaki JI, Miura J, Kamano Y, Imazato S, Yatani H, Matsumoto T, Egusa H. Scaffold-free fabrication of osteoinductive cellular constructs using mouse gingiva-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells International*, 2016, 1-11, 2016. 査読有 .
doi: 10.1155/2016/6240794.

2) Sasaki JI, Hashimoto M, Yamaguchi S, Itoh Y, Yoshimoto I, Matsumoto T, Imazato S. Fabrication of biomimetic bone tissue using mesenchymal stem cell-derived three-dimensional constructs incorporating endothelial cells. *PLoS ONE*, 10, e0129266, 2015. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0129266.

3) 佐々木淳一, 今里 聡 . 三次元細胞集合体を応用した骨様組織の *in vitro* 創製 . *バイオマテリアル - 生体材料 -* , 33 , 41-44 , 2015 . 査読なし .

4) Sasaki JI, Matsumoto T, Imazato S. Oriented bone formation using biomimetic fibrin hydrogels with three-dimensional patterned bone matrices. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103, 622-627, 2015. 査読有 .
doi: 10.1002/jbm.a.35212.

5) Egusa H, Kayashima H, Miura J, Uruguchi 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*, 23, 2156-2169, 2014. 査読有 .
doi: 10.1089/scd.2013.0344.

〔学会発表〕(計6件)

1) 伊藤善博, 佐々木淳一, 林 美加子, 松本卓也, 今里 聡 . 歯髄幹細胞を用いた棒状三次元細胞集合体の作製 . 第 65 回日本歯科理工学会学術講演会 . 仙台市情報・産業プラザ (宮城県・仙台市), 2015 年 4 月 11 日 .

2) Sasaki JI, Matsumoto T, Imazato S. Fabrication of biomimetic bone-like tissue by using 3D cell constructs. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 . タワーホール船堀 (東京都), 2014 年 11 月 18 日 .

3) Sasaki JI, Matsumoto T, Imazato S. Fabrication of biomimetic bone-like tissue by using 3D cell constructs. The 22nd Annual Meeting of the Korean Society for Biomaterials. Seoul (Korea) , 2014 年 11 月 06 日 .

4) 松田真悠, 濱本大貴, 吉崎文彦, 佐々木淳一, 今里 聡 . 血管内皮細胞の導入による三次元細胞集合体内の生細胞維持の試み . 大阪大学歯学会第 118 回例会 . 大阪大学(大阪府・吹田市) , 2014 年 7 月 24 日 .

5) Sasaki JI, Imazato S. Fabrication of scaffold-free 3D cell constructs for bone regeneration. *Kyungpook-Osaka University International Symposium, 2014 "New Horizon of Basic and Clinical Research in Dentistry"*. Daegu (Korea) , 2014 年 5 月 16 日 .

6) 吉本いつみ, 佐々木淳一, 松本卓也, 今里 聡 . 細胞集合体の凍結乾燥処理による幹細胞由来新規骨補填材の作製 . 第 63 回日本歯科理工学会学術講演会 . タワーホール船堀 (東京都) , 2014 年 4 月 13 日 .

〔その他〕

大阪大学大学院歯学研究科 顎口腔機能再建学講座 (歯科理工学教室) ホームページ
<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~techno/Welcome.html>

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 : 5 0 5 3 0 4 9 0

(2) 研究分担者

今里 聡 (IMAZATO, Satoshi)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号 : 8 0 2 4 3 2 4 4

(3) 研究協力者

吉本 いつみ (YOSHIMOTO, Itsumi)