

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630423

研究課題名（和文）骨様組織のin vitro構築法を用いた再生医療技術

研究課題名（英文）In vitro fabrication of bone-like structures for tissue engineering applications

研究代表者

福田 淳二（Fukuda, Junji）

横浜国立大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80431675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）を懸濁したコラーゲン溶液を滴下することで、ビーズ形状の構造体を大量に作製した。ゲル内に包埋したMSCの牽引力により、作製した構造体は24時間で直径が半分以下にまで収縮し、コラーゲンとMSCを密に含む構造体を形成した。このビーズにヒト臍帯静脈内皮細胞を播種し、これを骨再生評価モデルマウスに移植した。骨再生能の評価モデルとして、頭蓋冠に自然治癒不可能なφ4 mmの欠損部を作製したヌードマウスを作製した。骨治癒過程をマイクロCT解析により評価した結果、既存の人工骨材料と同等、もしくはそれ以上の骨再生誘導能を有することが示された。

研究成果の概要（英文）：Fabrication of three-dimensional vascularized bone graft is a major challenge in bone tissue engineering. A collagen gel solution containing bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) was dropped on a hydrophobic plate, which then spontaneously contracted and formed spherical shape during culture by contraction forces of MSCs. The surface of MSC-embedded microgel was covered with human umbilical vein endothelial cells. Transplantation of the microgels with endothelial cells into a bone-defected model mouse revealed acceleration of bone regeneration with improved blood supply, compared to microgels without endothelial cells, clinically proven biomaterial (beta-TCP), and non-transplantation control. This approach may be a fundamental technique for engineering osteon-like tissues to bone regenerative medicine.

研究分野：生物工学

キーワード：再生医療 骨 血管 コラーゲン 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

骨は、中心に微小血管をもつオステオンと呼ばれる最小構造単位(直径:0.2 mm)が複数集まって構成されている。骨には血管が必要ないように思われがちであるが、実はオステオンの中心には微小血管があり、血管を中心としてオステオンは形成されていると言っても過言ではない。骨の形成、維持には、骨芽細胞や破骨細胞が大きな役割を果たすが、その運搬を担っているのは血管であり、cm以上の骨欠損において骨充填物のリモデリングを誘導するには血管構造が必要である。しかし、このような血管網を有するオステオン様構造を *in vitro* で構築する技術は未だに確立されていない。

2. 研究の目的

研究代表者は、細胞を電気化学的に培養表面から脱離させる独自技術の確立に取り組んできた。本研究では、この技術を血管構造の高速モールドイングへと応用し、生体外でオステオン様構造体の三次元的な骨様組織の誘導に取り組み、より生体に類似した骨置換材を開発することを作製技術の確立に取り組むことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞包埋石灰化ビーズの作製

ヒト間葉系幹細胞(LONZA社製) 3×10^5 cells/mL をコラーゲン Type I-A (新田ゼラチン社製) 1 mL に懸濁し、2 μ L の細胞懸濁コラーゲンを撥水性表面にドロップレットした(図1)。30 分のインキュベートによりゲル化させた後、表面をピペッティングすることで、細胞包埋ビーズを回収した。さらに、この細胞包埋ビーズは骨芽細胞分化培地(DMEM(Sigma社製)+デキサメタゾン(Sigma社製)+ β -グリセロホスフェート(Sigma社製)+アスコルビン酸(WAKO社製))で14日間浮遊培養を行うことで、細胞石灰化ビーズを作製した。

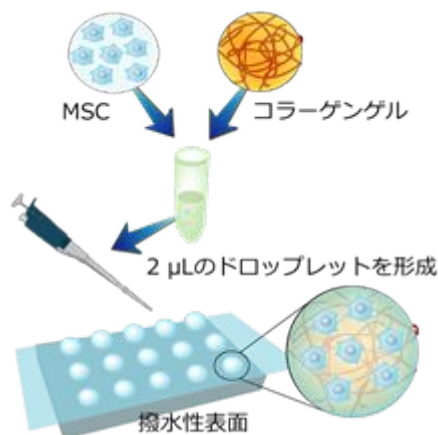


図1 細胞包埋石灰化ビーズの作製

(2) 間葉系幹細胞のアルカリホスファターゼ(ALP)活性

培養3、7、14日目のALP(初期の骨分化マーカー)活性はベッシー・ローリー法によって測定した。比較として、コラーゲンゲルを含まない細胞凝集塊であるスフェロイドを用いた。具体的には、細胞包埋ゲルビーズをPBS(-)で2回洗浄し、1 mL バッファ(50 mmol/L Tris/HCl, pH 7.6, 0.1%(v/v) TritonX-100)を加え、-80 で凍結保存した。これを凍結と融解を3回繰り返し、ディスポーザブルホモジナイザーを用いて、ホモジナイズした。超音波処理を30秒間、ボルテックス10秒を2回繰り返すことにより、細胞膜を破壊した。その後、1300 rpm、10分間遠心し、上澄みを回収しサンプルとした。標準液(0.5 mmol/L p-ニトロフェノール溶液)を順次倍々希釈し、0.5、0.25、0.125、0.0625、0 mmol/Lの2倍希釈系列を調整した。この希釈標準液とサンプルを96wellプレートに20 μ Lずつセットした。各wellに基質緩衝液(p-ニトロフェニルりん酸2ナトリウム 6.7 mmol/L+2.0 mmol/L 塩化マグネシウム)100 μ Lをそれぞれ加えた。ウェルプレートを遮光し、1分間攪拌させた後、15分間37 でインキュベートした。その後、各wellに反応停止液(0.2 mol/L 水酸化ナトリウム)80 μ Lを加えることで反応を停止させた。マイクロプレートリーダー(TECAN)で1分間攪拌した後、マイクロプレートリーダーにより、吸光度405 nmを測定し、サンプル中のALP活性を算出した。

(3) 細胞包埋石灰化ビーズの組織染色

培養14日目の細胞包埋ゲルビーズの切片を作製し、HE染色、Alizarin red染色(カルシウム沈着のマーカー)、HIF1- α 染色(低酸素マーカー)を行った。具体的には、細胞包埋ゲルビーズを4%パラホルムアルデヒド溶液で30分固定し、70%エタノール、90%エタノール、100%エタノール、2-ブタノールに1時間ずつ浸漬させた後、パラフィン包埋を行った。ミクロトーム(Laica)を用いて、切片を作製したのち、HE染色及びアリザリンレッド染色を行った。

HE染色は、以下の手順で行った。

キシレンによる脱パラフィン(1時間)→エタノール置換(100% 5分×2、90% 5分、70% 5分)→蒸留水(3分)→マイヤー・ヘマトキシリン溶液(WAKO)(4分)→流水(13分)→エオジン溶液(武藤化学社製)(4分)→蒸留水(1分)→エタノール置換(70% 5分、90% 5分、100% 5分×2)→キシレン(5分×2)→封入。

アリザリンレッド染色は以下の手順で行った。

キシレンによる脱パラフィン(30分)→エタノール置換(100% 5分)→アリザリンレッドS溶液(5分)→エタノール(100% 1分)→封入。

同様に、細胞包埋ゲルビーズを4%パラホル

ムアルデヒド溶液で 30 分固定し、10%スクロース、20%スクロース、30%スクロースに 1 時間ずつ浸漬させた後、OCT コンパウンド包埋を行った。クライオミクロトームを用いて、凍結切片を作製したのち、HIF1- α 染色を行った。

HIF1- α 染色は以下の手順で行った。

PBS (-) (5 分 $\times$ 2) $\rightarrow$ 5%BSA/DPBS (30 分) $\rightarrow$ anti-HIF1- α antibody (Sigma 社製) (overnight) $\rightarrow$ PBS-T (0.1% Tween20) (10 分 $\times$ 3) $\rightarrow$ anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen 社製) (60 分) $\rightarrow$ PBS-T (10 分 $\times$ 3) $\rightarrow$ DAPI 溶液 (9 分) $\rightarrow$ PBS (5 分 $\times$ 2) $\rightarrow$ 封入。

(4) 細胞包埋石灰化ビーズのマウス頭蓋骨欠損部への移植

作製した細胞包埋石灰化ビーズの有用性を示すために、動物実験による骨再生能を評価した。実験動物の世話および使用について、横浜国立大学動物実験委員会の指針を順守した。ヌードマウスの頭蓋骨に自然治癒不可能な ϕ 4 mm の骨欠損を作製し、この欠損に細胞包埋石灰化ビーズを大量に埋入した。具体的には、ヌードマウス (8 週齢) の頭皮をメスで切開し、骨膜を除去した後、歯科用ドリルとトレフィンバー 3.8 内部注水 (Technika 社製) を用いて、側頭骨のドリリングを行うことで ϕ 4 mm 程度の欠損部を作製した。この欠損部を埋めるように細胞包埋石灰化ビーズを大量に埋入し、頭皮を縫合した。また、コントロール群として何も移植しない「埋入なし」と「 β -TCP パウダー (Sigma 社製)」を用いた。骨治癒過程は、X 線 CT 装置 (ヤマト科学) を用いて評価し、マウスの吸引麻酔 (イソフルラン) 下で、X 線管電圧 [KV] : 70.000、X 線管電流 [mA] : 0.060 の測定条件で取得した。

(5) 血管内皮細胞被包細胞包埋石灰化ビーズの集積化

細胞非接着コートデッシュに細胞包埋石灰化ビーズ 100 個を加え、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Angioprotemie 社製) 5×10^5 cells/mL を血管内皮細胞増殖培地 (EGM-2: LONZA 社製) に懸濁した細胞懸濁液を 2 mL 加え、2 日間静置培養を行うことで、ビーズ周囲をヒト臍帯静脈血管内皮細胞で完全に覆わせた。この細胞包埋石灰化ビーズ 100 個を約 100 μ L のコラーゲン Type I-A に懸濁した。これを、セルカルチャーインサートに流し込み、30 分インキュベートすることでゲル化させた。これを 6 well プレートにセットし、EGM-2 をインサート内に 2 mL、well 内に 1 mL 加え 2 日間培養を行った。

(6) 送液可能な血管構造を有する血管内皮細胞被包細胞包埋石灰化ビーズ集積化組織の構築

金ニードルをオリゴペプチド (CGGGKEKEKEKGRGDSP: スクラム社製) 溶液に 1 晩浸すことで、オリゴペプチドを表面上に修飾した金ニードルを作製した。この金ニードルを細胞非接着性 4 cm デッシュに入れ、血管内皮細胞 5×10^5 cells/mL を播種した。細胞が表面を覆うまで 2 日間培養したのち、アクリルで作製した送液培養チャンバーに金ニードルを装着した。その後、血管内皮細胞被包細胞包埋石灰化ビーズ 100 個をコラーゲンゲル 100 μ L に懸濁した溶液でチャンバー内を満たし、30 分間 37 $^{\circ}$ C でインキュベートすることでゲル化させた。さらにペプチドと金の結合を電位印加により切断することで、ペプチドの脱離に伴い細胞をハイドロゲルに素早く転写した (図 2)。

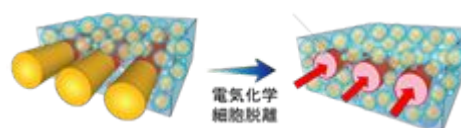


図 2 管内皮細胞被包細胞包埋石灰化ビーズ集積化組織への送液可能な血管構造付与

4. 研究成果

(1) 細胞包埋石灰化ビーズの作製

タイムラプス顕微鏡 (BZ-X700: KEYENCE 社製) を用いて、培養開始から 18 時間の細胞包埋ゲルビーズを観察した。6 時間ごとの位相差顕微鏡像を図 3 に示す。細胞包埋ゲルビーズは、18 時間の培養の間に、細胞の牽引力により、平均直径 2 mm から 0.5 mm まで凝集した。培養 0、7、14 日目の細胞包埋ゲルビーズの位相差顕微鏡写真を図 4 に示す。形成した凝集体は培養を重ねるとともにビーズの光透過性が減少した。これは、ゲル内部にカルシウム基質が産生されたためと考えられる。

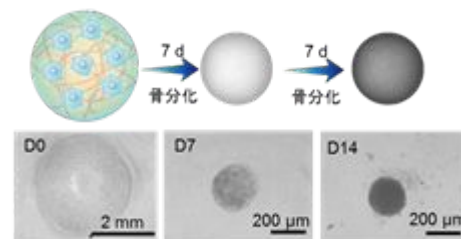


図 3 培養 0、7、14 日目の細胞包埋ゲルビーズの位相差顕微鏡像

(2) 間葉系幹細胞のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性

ALP 活性の結果を図 4 に示す。包埋した間葉系幹細胞の ALP 活性は培養日数に伴って上昇した。また、間葉系幹細胞は、スフェロイド

培養を行うことで、一般的な平面培養と比較して優位な ALP 活性を示すことが報告されている。スフェロイド培養の ALP 活性値と比較しても、同等もしくはそれ以上の ALP 値を示したことから、細胞包埋ゲルビーズを形成することで MSC は骨分化が促進されることが示唆された。

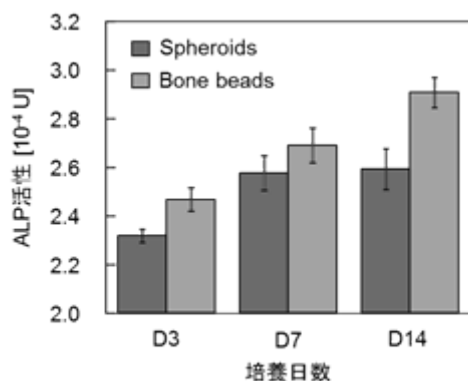


図 4 培養 3、7、14 日目の間葉系幹細胞

(3) 細胞包埋石灰化ビーズの組織染色

細胞組織切片を染色したものを図 5 に示す。HE 染色より、培養 14 日目の細胞包埋ゲルビーズは、細胞とマトリックスからなる構造体が形成されていることが確認された。また、Alizarin red 染色により、細胞包埋ゲルビーズ内部へのカルシウムの産生・沈着が認められた。これは間葉系幹細胞が分化した骨芽細胞がコラーゲンゲル内にカルシウムを産生したと考えられる。さらに、HIF 1 α 染色により、ビーズ内の細胞は低酸素状態に陥っており、良好な酸素・栄養供給が行えていることが示された。スフェロイドのような細胞凝集塊では、数百 μ m の大きさでは、組織内部の細胞が酸素枯渇に陥り、細胞死（ネクrosis、アポトーシス）を引き起こすことが知られているが、本手法では、コラーゲンが細胞間のスペーサーとして機能しており、細胞が細胞死に陥ることを防いだと考えられる。



図 5 培養 14 日目の細胞組織切片染色

(4) 細胞包埋石灰化ビーズのマウス頭蓋骨欠損部への移植

移植 1 ヶ月後の頭蓋骨の写真と取得した CT 画像を図 6 に示す。肉眼初見の結果、何も埋入しないものでは欠損部が修復されなかったのに対し、既存の人工骨材料として用いられている β -TCP と細胞包埋石灰化ビーズでは頭蓋骨欠損部が修復されていた。また、 μ

CT 画像の結果、細胞包埋石灰化ビーズでは、欠損周囲の骨密度と同等のカルシウム基質が産生されており、欠損のほぼ半分の面積がこれで満たされていた。一方、 β -TCP では、頭蓋骨欠損部が修復されていたものの、骨密度が低いため、CT 画像には反映されない程度のものであった。以上より、細胞包埋石灰化ビーズは既存の人工骨材料（ β -TCP）以上の骨再生能を有することが確認された。

(5) 血管内皮細胞被包細胞包埋石灰化ビーズの集積化

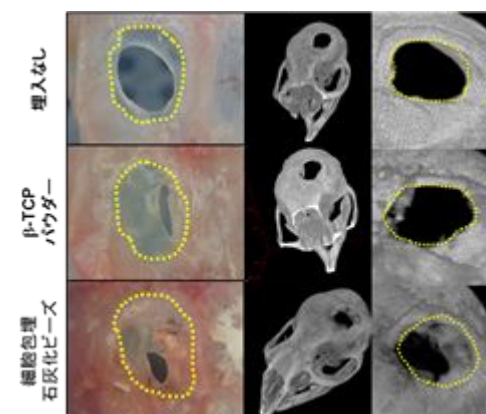


図 6 移植 1 ヶ月後の骨欠損部

インサートで培養後の血管構造を図 7 に示す。ビーズ表面を覆っていた血管内皮細胞はビーズ同士の間で血管網を形成し、作製した血管網は管腔構造を有していた。

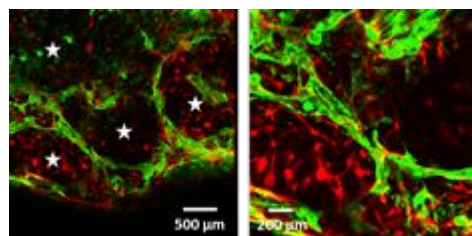


図 7 集積化した血管内皮細胞被包細胞包埋石灰化ビーズ（緑：GFP 遺伝子導入 HUVEC、赤：cell labeling した MSC、：細胞包埋石灰化ビーズ）

(6) 送液可能な血管構造を有する血管内皮細胞被包細胞包埋石灰化ビーズ集積化組織の構築

電位印加後に金ニードルを引き抜いた内表面は、血管内皮細胞で覆われており、送液可能な血管様構造を作製することに成功した。この血管構造に培養液を 3 日間送液し培養を行ったところ、送液血管の周囲に配置されたビーズ間に血管網が張り巡らされた組織体を構築した（図 8、9）。これにより、すべてのビーズ組織に血管を通して酸素や栄養分を供給することが可能となった。

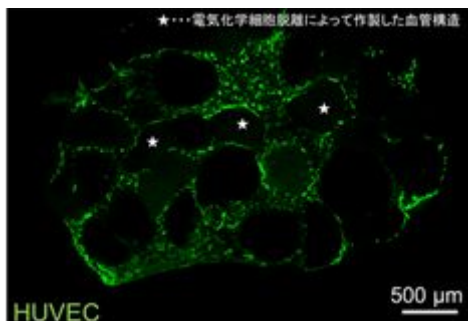


図 8 送液培養 3 日目の組織切片

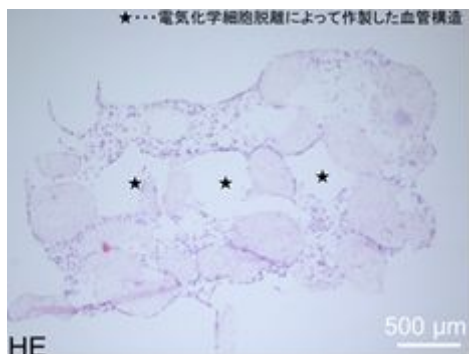


図 9 送液培養 3 日目の組織切片の HE 染色

以上より、オステオンと同様に血管構造を有する骨移植体を生体外で作製するための基盤技術を確立することができた。さらに、送液培養時の培養液に薬剤を混合することで、薬剤の骨組織に与える効果を容易に観察することができ、骨粗鬆症の治療薬開発の創薬スクリーニングモデルとして期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件) すべて査読あり

1. T. Kageyama, T. Osaki, J. Enomoto, D. Myasnikova, T. Nittami, T. Hozumi, T. Ito, and J. Fukuda, In situ cross-linkable gelatin-CMC hydrogels designed for rapid engineering of perfusable vasculatures, ACS Biomaterials Science & Engineering, in press (2016)
2. C. Arrigoni, M. Bongio, G. Talo, S. Bersini, J. Enomoto, J. Fukuda, M. Moretti, Rational design of prevascularized large 3D tissue constructs using computational simulations and geometric control of self-assembled monolayers, Advanced healthcare materials, in press (2016)
3. Suzuki A, Niimi Y, Shinmyozu K, Zhou Z, Kiso M, Saga Y. Dead end1 is an essential partner of NANOS2 for selective binding of target RNAs in male germ cell development. EMBO Rep , 17(1) pp37-46 (2016) doi: 10.15252/embr.201540828
4. Kamoya T, Anada T, Shiwaku Y, Takano-Yamamoto T, Suzuki O, An oxygen-permeable spheroid culture chip (Oxy chip) promotes osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells, Sensors & Actuators: B. Chemical, 232, pp. 75-83 (2016)
5. Anada T, Sato T, Kamoya T, Shiwaku Y, Tsuchiya K, Takano-Yamamoto T, Sasaki K, Suzuki O, Bioactivity of octacalcium phosphate utilizing osteoblastic cell aggregates in a spheroid culture device, Regenerative Therapy, in press (2016)
6. Ishiko-Uzuka R, Anada T, Kobayashi K, Kawai T, Tanuma Y, Sasaki K, Suzuki O, 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 (2016)
7. S Sakai, T Anada, K Tsuchiya, H Yamazaki, HC Margolis, O Suzuki., Comparative study on the resorbability and dissolution behavior of octacalcium phosphate, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite under physiological conditions, Dent Mater, 35(2) pp216-224, (2016)
8. K Endo, T Anada, M Yamada, M Seki, K Sasaki, O Suzuki, Enhancement of osteoblastic differentiation in alginate gel beads with bioactive octacalcium phosphate particles, Biomed Mater, in press, (2015)
9. N Kanda, T Anada, T Handa, K Kobayashi, Y Ezoe, T Takahashi, O Suzuki, Orthotopic osteogenicity enhanced by a porous gelatin sponge in a critical-sized rat calvaria defect. Macromol Biosci, in press (2015)
10. Y. Kang, N. Mochizuki, A. Khademhosseini, J. Fukuda, Y. Yang, Engineering a vascularized collagen- β -tricalcium phosphate graft using an electrochemical approach, Acta Biomaterialia, 11, pp. 449-458 (2015)
11. M Yamada, T Anada, T Masuda, T Takano-Yamamoto, O Suzuki, Effect of mechanical stress on differentiation of mouse mesenchymal stem cells seeded into an octacalcium phosphate-gelatin scaffold, Sens Actuators B Chem, in press (2015)
12. T Miyazaki, S Miyauchi, T Anada, A Tawada, O Suzuki, Chondroitin

sulfate-E binds to both osteoactivin and integrin α V β 3 and inhibits osteoclast differentiation, J Cell Biochem, in press (2015)

13. K Takahashi, N Shiraishi, R Ishiko-Uzuka, T Anada, O Suzuki, H Masumoto, K Sasaki, Biomechanical Evaluation of Ti-Nb-Sn Alloy Implants with a Low Young's Modulus, Int J Mol Sci, 16 pp. 5779-5788 (2015)
14. Itoigawa Y, Suzuki O, Sano H, Anada T, Handa T, Hatta T, Kuwahara Y, Takahashi A, Ezoe Y, Kaneko K, Itoi E. The role of an octacalcium phosphate in the reformation of infraspinatus tendon insertion, J Shoulder Elbow Surg, in press (2015)
15. Ezoe Y, Anada T, Yamazaki H, Handa T, Kobayashi K, Takahashi T, Suzuki O, Characterization of partially hydrolyzed OCP crystals deposited in a gelatin matrix as a scaffold for bone tissue engineering, J Nanopart Res, 17 pp. 127 (2015)
16. Suzuki A, Niimi Y, Saga Y. Interaction of NANOS2 and NANOS3 with different components of the CNOT complex may contribute to the functional differences in mouse male germ cells. Biology Open 2014 Nov 21;3(12):1207-16

〔学会発表〕(計 6 件うち招待講演計 3 件)

1. 福田淳二 電気化学を用いた再生医療のための立体臓器の作製, 第 2 回理論応用力学シンポジウム(招待講演)2016 年 03 月 08 日 日本学術会議講堂
2. 福田淳二 細胞組織構築のための細胞接着性の制御, 第 25 回日本 MRS 年次大会 2015 年 12 月 08 日~10 日 横浜市開港記念会館
3. 福田淳二 材料表面の細胞接着制御による細胞の操作, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)(招待講演)2015 年 12 月 01 日~04 日 神戸ポートアイランド
4. 園山由希江、景山達斗、福田淳二, 細胞包埋石灰化ビーズ(Bone beads)を用いた血管導入骨組織の 3 次元構築, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会 2015 年 11 月 09 日~10 日 京都テルサ
5. 園山由希江、景山達斗、福田淳二 細胞包埋石灰化ビーズ(Bone beads)を用いた血管導入骨組織の構築, 第 67 回日本生物工学会 2015 年 10 月 26 日~28 日 城山観光ホテル
6. J. Fukuda Electrochemical cell detachment for engineering

vascularized 3D tissues, E-MRS 2015 (European Materials Research Society) (招待講演)2015 年 05 月 11 日~15 日 Lille, France

〔図書〕(計 1 件)

1. 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, エヌ・ティ・エス 7 ページ (2015)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

1. 名称: 記血管網被包細胞包埋ビーズを用いた集積体及びその製造方法
発明者: 福田淳二、景山達斗、園山由希江、荒木拓人
権利者: 横浜国立大学
種類: 特許
番号: 2015-215034
出願年月日: 2015 年 10 月 30 日
国内外の別: 国内

2. 名称: 細胞包埋ビーズ及びその製造方法
発明者: 福田淳二、景山達斗、園山由希江、荒木拓人
権利者: 横浜国立大学
種類: 特許
番号: 2015-179750
出願年月日: 2015 年 09 月 11 日
国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fukulab.ynu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

福田 淳二 (FUKUDA JUNJI)

横浜国立大学 工学研究院 准教授

研究者番号: 80431675

(2)研究分担者

穴田 貴久 (ANADA TAKAHISA)

東北大学 歯学研究科 准教授

研究者番号: 30398466

(3)研究分担者

鈴木 敦 (SUZUKI ATSUSHI)

横浜国立大学 工学研究院 准教授

研究者番号: 60467058