

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03027

研究課題名(和文) 骨組織と脂肪組織の発生を同時に模倣するマトリックス材料の開発

研究課題名(英文) Development of Matrix Materials Mimicking Simultaneous Osteogenesis and Adipogenesis

研究代表者

陳 国平 (Chen, Guoping)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・グループリーダー

研究者番号：50357505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外マトリックス(ECM)は、組織発生過程で動的にリモデリングし、細胞機能を制御している。本研究では、間葉系幹細胞(MSCs)の骨・脂肪分化過程のECMを模倣したマトリックスを作製し、細胞機能に対するECMの影響を調べた。骨分化後期・脂肪分化初期、骨分化後期・脂肪分化後期マトリックスは、MSCの骨分化を促進したが、脂肪分化は促進しなかった。骨分化初期・脂肪分化初期マトリックスは脂肪分化を促進したが、骨分化は促進しなかった。骨分化初期・脂肪分化後期マトリックスは骨分化、脂肪分化ともに促進しなかった。さらに、本マトリックスは、スケールアップ調製が可能でバイオマテリアルとしての有用性も示された。

研究成果の概要(英文)：The extracellular matrix (ECM) is dynamically remodeled to regulate stem cell functions during tissue development. Here, we have prepared novel types of matrices that mimic the dynamic variation of ECMs by using simultaneous osteogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells (MSCs). The matrices had different effects on differentiation of MSCs due to the different compositions depending on the differentiation stage. Late osteogenesis and early adipogenesis (LOEA) and late osteogenesis and late adipogenesis (LOLA) matrices promoted osteogenesis but not adipogenesis. Early osteogenesis and early adipogenesis (EOEA) matrices promoted adipogenesis but not osteogenesis. Early osteogenesis and late adipogenesis (EOLA) did not promote either osteogenic or adipogenesis. The tissue development mimicking matrices can be prepared at large scale and thus should be useful as versatile biomaterials.

研究分野：再生医工学

キーワード：マトリックス材料 生体模倣材料 足場材料 再生医療 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

生体組織中の細胞は、細胞外マトリックスを介して周囲の細胞と情報交換しながら生体恒常性を維持している。細胞外マトリックスは、幹細胞の分化および組織発生の段階に応じて変化し、細胞の機能を調節している。このようなダイナミックな変化を生体外で模倣した細胞外マトリックスを再構築することは、幹細胞研究および再生医療研究に対してきわめて意義深い。組織発生を模倣したマトリックスを用いて幹細胞の機能について調べることは、幹細胞の組織分化における細胞外マトリックスの役割解明につながるとともに、再生医療のための新しい足場材料の開発への貢献が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、骨髄由来間葉系幹細胞が骨芽細胞と脂肪細胞に分化する際、段階的に変化する細胞外マトリックスを模倣した「組織発生模倣マトリックス」(図1)を作製し、その幹細胞の機能への影響を明らかにする。

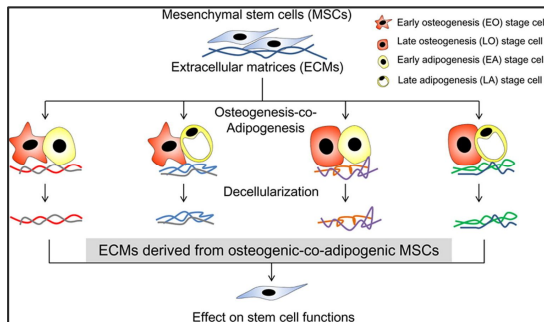


図1 骨・脂肪への同時分化段階を模倣した組織発生模倣マトリックスの概念図。

3. 研究の方法

本研究では、下記4種類の二次元的な組織発生模倣マトリックス(およびコントロール)及び三次元的な骨組織と脂肪組織模倣型マトリックス多孔質材料を調製し、間葉系幹細胞(MSCs)の機能への影響を比較した。

骨分化初期・脂肪分化初期(EOEA: Early stage of Osteogenesis, Early stage of Adipogenesis)

骨分化初期・脂肪分化後期(EOLA: Early stage of Osteogenesis, Late stage of Adipogenesis)

骨分化後期・脂肪分化初期(LOEA: Late stage of Osteogenesis, Early stage of Adipogenesis)

骨分化後期・脂肪分化後期(LOLA: Late stage of Osteogenesis, Late stage of Adipogenesis)

(1) MSCs の骨芽細胞・脂肪細胞への同時分化誘導

まず、MSC の同時分化誘導を行うため、骨・脂肪各分化誘導培地を種々の割合

(100/0-0/100)で混合した。また、分化誘導因子未添加の増殖培地を幹細胞培地とした。次に、MSC を細胞培養皿に播種し、上記の混合培地で7-21日間培養することによって骨・脂肪同時分化誘導を行った。

骨分化の段階は、アルカリホスファターゼ(ALP)染色、アリザリンレッド染色(ARS)および骨分化マーカーALP、骨シアロタンパク質(ISBP)の遺伝子発現をリアルタイム PCR法で解析することによって確認した。他方、脂肪分化の段階は、オイルレッド-O(ORO)による脂肪滴の染色、脂肪分化初期マーカーであるリポタンパクリパーゼ(LPL)の遺伝子発現レベルによって確認した。

(2) 脱細胞化による組織発生模倣マトリックスの調製

(1)で調製したサンプルを脱細胞化するため、分化誘導培養後の培養皿をPBSで2回洗浄後、0.5% Triton X-100、20 mM NH₄OHを含むPBS中で、37℃、5分間インキュベートし、続いて100 µg/ml DNase I、RNase A、37℃で1時間処理した。細胞成分の除去は細胞核および細胞骨格アクチンの蛍光染色像より確認した。

(3) MSCs の接着・増殖に対する組織発生模倣マトリックスの影響

各組織発生模倣マトリックス表面におけるMSCを観察するため、増殖培地で1日間培養した後、アクチンフィラメントと細胞核を染色した。また、細胞増殖性を評価するため、1、2、4日間培養した細胞の代謝活性をWST-1法により測定した。

(4) MSCs の骨・脂肪分化に対する組織発生模倣マトリックスの影響

上記の各組織発生模倣マトリックスに、MSCを播種し、骨分化誘導培地、および脂肪分化誘導培地でそれぞれ培養した。骨芽細胞への分化は、ALP染色、ARS染色によるカルシウム沈着の検出、およびリアルタイムPCR法によるALP、IBSP、オステオポンチン、RUNX2、SP7遺伝子の発現解析により評価した。他方、脂肪細胞への分化は、脂肪滴のORO染色、LPL、FABP4、FANS、PPARG、CEBPA遺伝子の発現レベルにより評価した。

(5) 三次元的な骨組織と脂肪組織模倣型マトリックス多孔質材料の調製と評価

ポリ(乳酸-グリコール酸)/コラーゲン複合メッシュにMSCsを播種し、脂肪分化誘導培地と骨分化誘導培地を用いて、分化段階に応じて3日~3週間培養を行った。分化誘導後、脱細胞化処理により多孔質構造をもつ脂肪及び骨組織発生模倣型マトリックスを調製した。また、マトリックスの成分を調べるために、得られた多孔質マトリックスをタイプIコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、パーシカン、ビグリカンとデコリンの各

抗体で免疫染色した。さらに、脂肪及び骨組織発生模倣型多孔質マトリックス中で MSCs を三次元的に培養し、細胞接着、増殖及び分化を調べた。

4. 研究成果

(1) MSCs の骨芽細胞・脂肪細胞への同時分化誘導 (図2)

幹細胞培地で7日間培養した MSC は ALP、ARS、ORO 染色ともに陰性で、骨、脂肪分化の遺伝子は検出されず、未分化段階の細胞と定めた。骨/脂肪 85/15 混合培地で7日間培養した MSC は ALP 染色陽性、ARS、ORO 染色が陰性のため、EOEA 細胞と定めた。50/50 混合培地で14日間培養した MSC を EOLA 細胞、95/5 混合培地で21日間培養した MSC を LOEA 細胞、70/30 混合培地で21日間培養した MSC を LOLA 細胞と定めた。

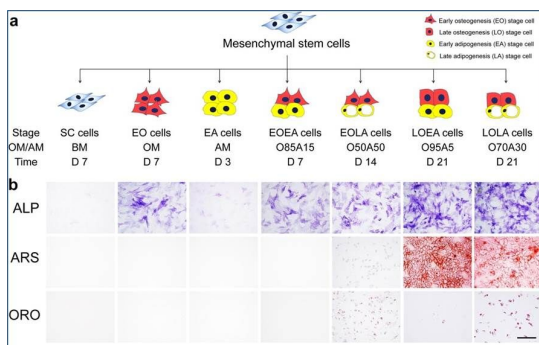


図2 段階的な MSCs の骨・脂肪同時分化誘導スキームと培養条件 (a)、ALP: アルカリホスファターゼ染色、ARS: アリザリンレッド染色、ORO: オイルレッド-O 染色による分化段階の確認。

(2) 脱細胞化による組織発生模倣マトリックスの調製

脱細胞化処理によって、細胞核、アクチンの蛍光像が消失したことから、細胞成分が除去されたことが確認された。また、脱細胞化処理後のサンプルをクマシーブリリアントブルーで染色したところ、青色を呈したことから、タンパク質成分が残存していることが確かめられた。

次に、脱細胞化後のマトリックスをタイプ I コラーゲン、フィブロネクチン、ビグリカン等の抗体で免疫染色した (図3)。その結果、各分化段階でマトリックスの組成パターンが異なることが分かった。

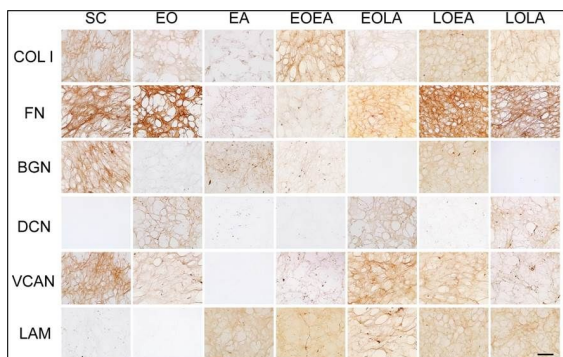


図3 分化段階が異なる組織発生模倣マトリックスの免疫染色像。COL I: タイプ I コラーゲン、FN: フィブロネクチン、BGN: ビグリカン、DCN: デコリン、VCAN: パーシカン、LAM: ラミニンの各抗体で脱細胞化マトリックスを染色した。

(3) MSCs の接着・増殖に対する組織発生模倣マトリックスの影響

各組織発生模倣マトリックス表面で培養した MSCs の形態と増殖を調べた結果を図4に示す。

MSC はいずれのマトリックス表面にも接着した (図4a)。培養1日後の細胞の代謝活性 (図4b) の比較より、接着した細胞数は同程度であることがわかった。そして、培養時間の経過にともない増殖することが示された。

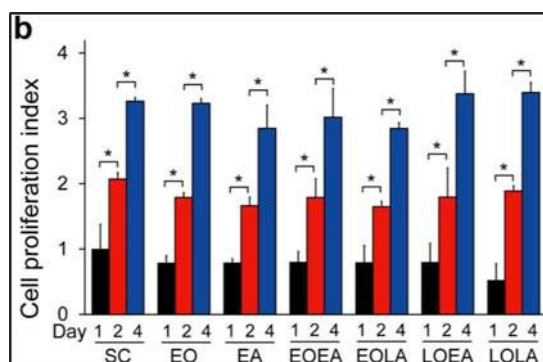
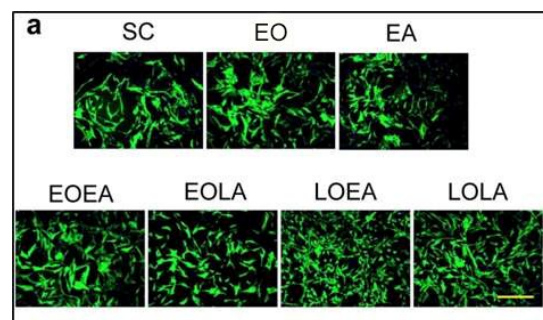


図4 各組織発生模倣マトリックス表面で培養した MSCs の形態 (a) と増殖 (b)。

(4) MSCs の骨・脂肪分化に対する組織発生模倣マトリックスの影響

MSC の分化に対して、組織発生模倣マトリックスの種類に応じて異なる効果が現れた。カルシウム沈着 (骨分化) への影響を図5に、脂肪滴の形成 (脂肪分化) への影響を図6に示す。

その結果、LOEA と LOLA マトリックス材料で培養した MSC におけるカルシウム沈着量は EOEA と EOLA マトリックス材料で培養した MSCs より高かった。EOEA マトリックス材料で培養した MSCs からはほかのマトリックス材料で培養した MSCs より多くの脂肪滴を分泌した。

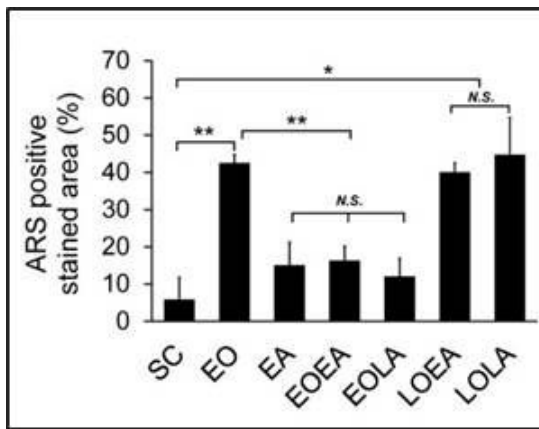


図5 MSCsの骨分化に対する組織発生模倣マトリックスの影響。沈着したカルシウムをARSで染色し、定量化した。

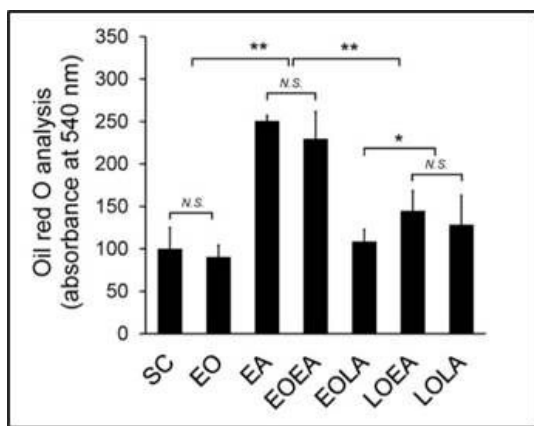


図6 MSCsの脂肪分化に対する組織発生模倣マトリックスの影響。脂肪滴をOROで染色して定量した。

また、リアルタイムPCR法により解析した骨分化関連遺伝子では、ALPの発現レベルはEOEA≧EOLA>LOLA>LOEAであった。SPP1とRUNX2の発現レベルはEOEA≧EOLA>LOEA≧LOLAであった。LOEAとLOLAマトリックス材料で培養したMSCsのIBSPとSP7の発現レベルはEOEAとEOLAマトリックス材料で培養したMSCより有意に高かった。

他方、脂肪細胞分化マーカー遺伝子FABP4、FASN、PPARG、およびCEBPA遺伝子は、骨分化・脂肪分化ともに初期のマトリックス(EOEA)の場合に高い発現レベルを示した。LPLの発現は4種類のマトリックス材料において同レベルであった。

以上の結果より、各組織発生模倣型マトリックスはMSCsの骨分化と脂肪分化に対して異なる効果を示すことが分かった。LOEAとLOLAマトリックス材料はMSCsの骨分化を促進したが、脂肪分化を促進しなかった。これに対して、EOEAマトリックス材料はMSCsの脂肪分化を促進したが、骨分化を促進する効果がなかった。EOLAマトリックス材料は骨分化、脂肪分化のいずれも促進しなかった。

(5) 三次元的な骨組織と脂肪組織模倣型マトリックス多孔質材料の調製と評価

ポリ(乳酸-グリコール酸)/コラーゲン複合メッシュでMSCsを三次元的に培養し、骨分化及び脂肪分化を制御することにより、三次元的な幹細胞多孔質マトリックス、脂肪分化初期多孔質マトリックス、脂肪分化後期多孔質マトリックス、骨分化初期多孔質マトリックスと骨分化後期多孔質マトリックスを作製した。これらの三次元的な多孔質マトリックス材料はそれぞれ異なる成分を有した。MSCsはこれらの多孔質マトリックス材料に接着し、増殖した。脂肪滴のOil Red O染色及びリアルタイムPCR法による脂肪細胞分化マーカー遺伝子解析の結果、脂肪分化初期多孔質マトリックスは幹細胞多孔質マトリックス及び脂肪分化後期多孔質マトリックスより、間葉系幹細胞の脂肪分化を促進した。幹細胞多孔質マトリックス、骨分化初期多孔質マトリックス及び骨分化後期多孔質マトリックスも間葉系幹細胞の骨分化に対して異なる効果を示した。

以上より、本研究で得られた骨・脂肪への発生段階を模倣したマトリックス材料は、細胞-ECM間相互作用やECMの影響を調べるのに役立つと考えられる。さらに、細胞の増殖及び幹細胞の分化を制御できるため、培養基材や再生医療のための足場材料の開発に貢献することが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計9件)

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Biomimetic Extracellular Matrices and Scaffolds Prepared from Cultured Cells, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 査読有, 2018, 印刷中

Takashi Hoshiba, Naoki Kawazoe, Guoping Chen, Preparation of Cell-Derived Decellularized Matrices Mimicking Native ECM During the Osteogenesis and Adipogenesis of Mesenchymal Stem Cells, *Methods in Molecular Biology*, 査読有, Vol. 2017, 2017, 1-16
DOI: 10.1007/7651_2017_62

Chen Shangwu, Kawazoe Naoki, Chen Guoping, Biomimetic Assembly of Vascular Endothelial Cells and Muscle Cells in Microgrooved Collagen Porous Scaffolds, *Tissue Engineering Part C-Methods*, 査読有, Vol. 23, 2017, 367-376

DOI: 10.1089/ten.tec.2017.0088

Jingchao Li, Xiaomeng Li, Jing Zhang, Naoki Kawazoe, Guoping Chen, Induction of Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Biomimetic Gold Nanoparticles with Tunable RGD Density, *Advanced Healthcare Materials*, 査読有り, Vol. 6, 2017, 1700317-1 ~ -12
DOI: 10.1002/adhm.201700317

Rong Cai, Tomoko Nakamoto, Naoki Kawazoe, Takashi Hoshiba, Guoping Chen, Matrices Secreted during Simultaneous Osteogenesis and Adipogenesis of Mesenchymal Stem Cells Affect Stem Cells Differentiation, *Acta Biomaterialia*, 査読有り, Vol. 35, 2016, 185-193
DOI: 10.1016/j.actbio.2016.02.009

Takashi Hoshiba, Guoping Chen, Chiho Endo, Hiroka Maruyama, Miyuki Wakui, Eri Nemoto, Naoki Kawazoe, Masaru Tanaka, Decellularized Extracellular Matrix as an In Vitro Model to Study the Comprehensive Roles of the ECM in Stem Cell Differentiation, *Stem Cells International*, 査読有り, Vol. 2016, 2015, 6397820-1-6397820-10
DOI: 10.1155/2016/6397820

その他 3件

[学会発表](計 24件)

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Tissue Development-Mimicking Extracellular Matrices and Scaffolds for Stem Cells Culture, TERMIS-AM Meeting 2017, 2017

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Preparation of Biomimetic ECM Scaffolds and Application for Tissue Engineering, TERMIS-AP 2017, 2017

Guoping Chen, Putri Nur Rofiqoh Eviana, Naoki Kawazoe, Hybrid Scaffolds of Biodegradable Polymers and Biomimetic Matrices for Tissue Engineering Applications, 12th Joint Conference on Chemistry, 2017

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Biodegradable and Biomimetic Scaffolds for Tissue Engineering, 2017 International Symposium of Materials on Regenerative Med, 2017

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Preparation of Extracellular Matrix-Derived Scaffolds for Tissue Engineering, Asia Pacific Society for Materials Research 2017 Annual Meeting, 2017

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Preparation of Biomimetic Matrices for Controlling Stem Cell Functions, 12th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, 2017

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Preparation of tissue development-mimicking ECM scaffolds for stem cell culture, TERMIS European Chapter Meeting 2017, 2017

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Preparation of Polymeric Scaffolds and Biomimetic Matrices for Tissue Engineering, 3rd International Conference on Biomaterials in Tokyo, 2016

Guoping Chen, Biomimetic Matrices and Scaffolds from Cultured Cells, 2016 China-Korea Symposium on Biomimetic and Regenerative Medical Materials, 2016

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, PREPARATION OF BIOMIMETIC ECM SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING, Biomaterials International 2016, 2016

Guoping Chen, Biodegradable Polymer Scaffolds and Biomimetic Matrices for Tissue Engineering Applications, HKU International Symposium for 3D Bio-printing and Biomaterials, 2016

Guoping Chen, Rong Cai, Shangwu Chen, Naoki Kawazoe, Design and Preparation of Hybrid and Biomimetic Porous Scaffolds for Tissue Engineering, TERMIS-AP Meeting 2016, 2016

Guoping Chen, Rong Cai, Naoki Kawazoe, Preparation of Cultured Cell-Derived Biomimetic Scaffolds for Tissue Engineering, International Forum of Biomedical Materials – Biomaterials Interfaces and Nanobiomaterials., 2016

Guoping Chen, Rong Cai, Naoki Kawazoe, Development of Biomimetic Scaffolds

for Tissue Engineering, 2016 Asia University Symposium on Biomedical Engineering, 2016

Guoping Chen, Rong Cai, Naoki Kawazoe, Extracellular matrices simultaneously mimicking stepwise osteogenesis-co-adipogenesis of mesenchymal stem cells, TERMIS-EU 2016, 2016

Guoping Chen, Rong Cai, Takashi Hoshiba, Naoki Kawazoe, Tissue development-mimicking extracellular matrices from cultured cells, 10th World Biomaterials Congress, 2016

陳 国平, Cai Rong, 干場 隆志, 川添 直輝, 再生医療のための組織発生模倣型マトリックス材料の作製、第 64 回高分子討論会、2015

Cai Rong, 中本 智子, 川添 直輝, 陳 国平, Influence of Stepwise Chondrogenesis-Mimicking 3D Extracellular Matrix on Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells、第 44 回医用高分子シンポジウム、2015

Guoping Chen, Rong Cai, Naoki Kawazoe, Preparation of Stepwise Chondrogenesis-Mimicking ECM Scaffolds for Tissue Engineering, 2nd International Conference on Regenerative Biomedical Materials, 2015

Guoping Chen, Rong Cai, Tomoko Nakamoto, Naoki Kawazoe, Stepwise Tissue Development-Mimicking ECM Scaffolds from Cultured Cells, 5th China-Europe Symposium on Biomaterials in Regenerative Medicine, 2015

その他 4 件

〔図書〕(計 5 件)

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Yoshihiro Ito, Spring, Photochemistry for Biomedical Applications (Chapter 10), 2018, 印刷中

陳 国平、川添 直輝、技術情報協会、動物細胞培養・自動化におけるトラブル発生原因と対策(第 10 章 6 節)、2017、526(486-495)

Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Springer、

Polymeric Biomaterials for Tissue Regeneration-From Surface/Interface Design to 3D Constructs, 2016, 16 (41-56)

その他 2 件

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

陳 国平 (CHEN, Guoping)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・グループリーダー
研究者番号：5 0 3 5 7 5 0 5

(2) 連携研究者

川添 直輝 (KAWAZOE, Naoki)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・主幹研究員
研究者番号：9 0 3 1 4 8 4 8