

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21563

研究課題名(和文) 動的培養と二層構造型足場材による人工軟骨-骨組織の創製

研究課題名(英文) Development of artificial cartilage-bone substitute by dynamic culture and two-layered scaffold

研究代表者

荒平 高章 (Arahira, Takaaki)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：30706958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コラーゲンを基材とし、二重凍結による界面層を考慮した多層足場材の作製方法を確立し、生体内環境に近づけるため力学刺激下で幹細胞培養を行った。コラーゲン足場材とコラーゲン/ β -TCP足場材において、気孔径は、細胞増殖に有用な $100\mu\text{m}$ 以上であり、細胞だけでなく、組織侵入にも十分であると考えられる。細胞培養実験に関しては、静置培養と比較した結果、力学刺激を付与した群が細胞増殖能に優れており、特に骨芽細胞に関してはALP活性値が高く、力学刺激が骨芽細胞分化を活性化することを確認した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, a multi-phase porous composite scaffold consisting of β -tricalcium phosphate (β -TCP) and collagen was developed for bone tissue engineering. Rat bone marrow mesenchymal stem cells (rMSC) were cultured in collagen/ β -TCP or collagen scaffold for up to 7 days in order to assess the effect of the mechanical stimulus on cell proliferation and differentiation. It was demonstrated that the porous collagen/ β -TCP scaffold and collagen scaffold possessed a continuous porous structure with a pore size ranging to $200\mu\text{m}$. In both cases, the cell number increased up to 7 days compared with the static culture. The ALP activity clearly increased in proportion to the period of cell culture compared with the results for static culture. It was concluded that the mechanical stimulus effectively promotes cell growth and osteoblast differentiation.

研究分野：生体工学

キーワード：力学刺激 組織工学 scaffold コラーゲン β -TCP 幹細胞 3次元培養

1. 研究開始当初の背景

研究の背景

現在、医歯学分野では損傷した生体組織を生体外で人工的に構築し、生体内に移植することにより、失われた生体組織の機能を回復する「再生医療」が注目を集めている。再生医療の技術基盤として「組織工学」があり、細胞を起点とし多種多様な組織を生体外で構築する技術開発が進んでいる。しかし、骨-軟骨といった多層にわたる再生は未だ発展途上である。軟骨と骨の界面には、図1に示すように、石灰化軟骨層が存在し多層構造によって構成されている。従って、単純な骨組織と軟骨組織の再生ではなく、それらの界面組織についても考慮することが重要である。界面組織は、界面での物理的破壊の防止や、周囲組織や細胞との親和性が必要であり、組織と組織の仲介役である。このような「界面組織工学」は近年新たに提唱された分野(Lu et al. *Annals of Biomedical Engineering*, 2010)であり、現在活発に研究がなされているが、界面組織を考慮した材料設計や人工組織構築は未だ十分に検討されていない。

上記問題に対して、これまでコラーゲンを基材とした足場材を作製し、*in vitro*において圧縮力学特性におよぼす骨芽細胞分化能、細胞増殖挙動・ECM形成能の影響について評価を行い、幹細胞の骨芽細胞への分化および細胞外基質(ECM)形成が足場材の圧縮力学特性を向上させることを見出した。(Arahira et al. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2014)しかし、培養形態は静置培養であり、生体内環境とは大きく異なる。実際は、運動によって絶えず圧縮や引張といった力学刺激や体液の移動による電気刺激等が起こっている。特に、骨や軟骨部においては、圧縮や引張の力学刺激を受けており、生体外での組織構築においても力学刺激による動的培養を考慮することで早期の組織形成が期待できる。これまで、単層の足場材などに細胞を播種し、力学刺激を加えた研究は存在するが、界面組織を考慮した多層構造3次元足場材と細胞からなる系で力学刺激を考慮した組織構築に関する研究は例がなく、生体外での構築組織の圧縮力学特性変化には着目されていないのが現状である。特に骨や軟骨組織を構築する場合、このような力学特性を考慮することは非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究では、コラーゲンと β -TCP 混合溶液を凍結させ、その上にコラーゲン溶液を凍結させる二重凍結法によって多層足場材を作製し、作製した足場材内でそれぞれ幹細胞から軟骨細胞や骨芽細胞へ分化させ、圧縮や引張刺激を与える動的環境で培養することによって、*in vitro*において早期の多層組織の構築を目指す。

3. 研究の方法

3.1 足場材の作製

足場材は凍結乾燥法を用いて作製した(Arahira et al. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2014)。まず、骨層を想定したタイプ I コラーゲンと生体活性セラミックス β -TCP が重量比 90:10 で攪拌混合したのち、5mm×5mm で高さが 10mm の四角柱のモルドに充填し凍結させた。軟骨層を想定したタイプ II コラーゲン溶液についても同様のモルドに充填し、凍結させた。これらの凍結体について凍結乾燥を行った後、グルタルアルデヒド水溶液による飽和蒸気下で架橋し、グリシン溶液での化学ブロック処理後、洗浄し、再び凍結乾燥を行った。また、それぞれの足場材を二重凍結によって組み合わせた足場材も同様の手法で作製した。

3.2 細胞培養実験

3.2.1 Cell culture

それぞれ作製した scaffold にラット骨髄由来間葉系幹細胞 (rMSC) を 1.0×10^5 cells/scaffold となるように播種し、インキュベータ内 (37℃, 5% CO₂) で 1 時間静置させた後、増殖用培地 (DMEM, 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin) を添加し、1 日間前培養を行った。翌日、培地を骨芽細胞分化サプリメント (TaKaRa 株式会社) を増殖用培地に添加した分化誘導培地、及び軟骨細胞分化培地と交換し、培養を開始し、それぞれ 1 週間培養を行った。また、一週間に 2 回の頻度で培地交換を行った。

3.2.2 動的培養条件

力学刺激は、試験片全長に対して 10% のひずみを付与した。具体的には、1 時間かけて全長の 10% 量引っ張り、その後 1 時間かけてもとに戻るよう設定し、この刺激を 1 日に 1 回与えた。一方、力学刺激を与えない静置培養も行い、コントロールとした。一定期間培養した後、細胞数と ALP 活性について、プレートリーダを用いて測定を行った。

4. 研究成果

4.1 作製した足場材評価

作製した多層足場材は、コラーゲン層とコラーゲン/ β -TCP 層およびそれらの中間層を再現していた。気孔径も、細胞増殖に有用な 100 μ m 以上であり、細胞だけでなく、組織侵入にも十分であると考えられる。

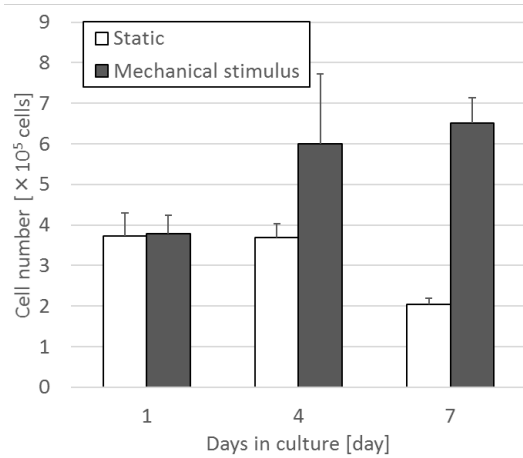
4.2 細胞培養実験結果

細胞培養実験に関して、図1に細胞数を測定した結果を示す。まず、図1(a)のコラーゲン/-TCPの結果に関して、静置培養群では、培養4日目まで一定傾向を示し、その後7日目で減少を呈したが、力学刺激群は、培養4日目で静置培養群の約1.5倍増加し、その後も増加傾向を示した。図1(b)のコラーゲンの結果に関して、力学刺激群の方が静置培養群に比べて高い細胞増殖能を示した。以上より、細胞増殖は、力学刺激を付与することによって骨芽細胞、軟骨細胞ともに向上することが示唆された。

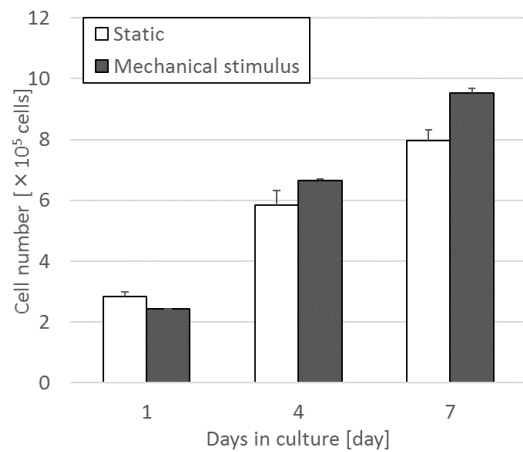
次に、骨芽細胞分化の初期における指標として計測されているALP活性について図2に示す。ALP活性は、培養4日、7日ともに力学刺激群の方が高くなっており、培養7日目では約1.6倍のALP活性値を示した。以上のことから、力学刺激を付与することで、効率的に幹細胞を骨芽細胞に分化させる可能性が示唆された。

さらに、図1の細胞数の結果において、各日数における力学刺激群の細胞数を静置培養群の細胞数で除した値を図3に示す。この結果より、骨芽細胞分化実験であるコラーゲン/-TCP scaffoldの実験結果は、静置培養に比べ力学刺激による細胞増殖が顕著であるという結果に対し、軟骨細胞分化実験であるコラーゲン scaffoldの実験結果は、細胞数では力学刺激群が高い値を示していたが、互いの増殖能で比較すると、力学刺激群と静置培養群でほとんど差がないということが分かる。すなわち、本研究で実施した力学刺激は骨芽細胞と軟骨細胞の双方に有用であるが、骨芽細胞の方がより効果的であるということが示唆された。したがって、軟骨細胞に関する力学刺激パラメータについて最適化を継続する必要がある。

今後は、本研究課題で実施した力学条件を踏まえて、さらに複数の力学条件で同様の実験を行っていき、骨-軟骨組織がともに効率よく構築できる条件を選定していく予定である。また、構築した人工組織の詳細な力学特性や、細胞親和性についても検討していく。



(a) Collagen/ -TCP scaffold (Bone layer)



(b) Collagen scaffold (Cartilage layer)

Fig.1 Variation of cell proliferation.

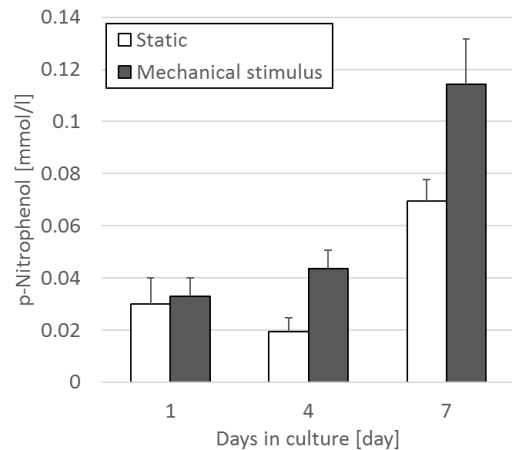


Fig.2 Variation of ALP activity.

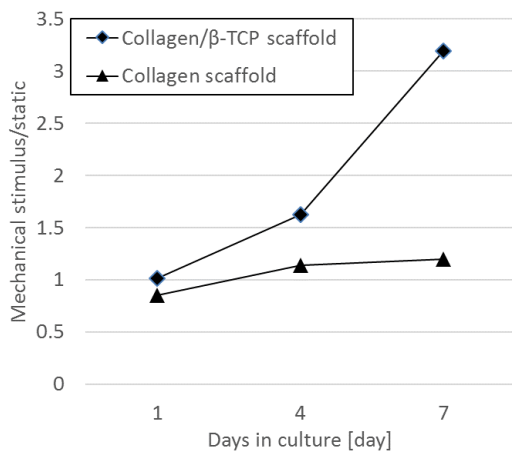


Fig.3 Comparison of cell growth between mechanical stimulus and static culture.

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1件)

荒平高章, 東藤貢, 名井陽, コラーゲン/リン酸三カルシウム複合系足場材の創製と in vitro 評価, 日本臨床バイオメカニクス Vol.37, pp.43-50, 2016.

〔学会発表〕(計1件)

荒平高章(福岡歯科大学), 東藤貢(九州大学応用力学研究所), 間葉系幹細胞と二層構造型足場材を用いた人工骨—軟骨様組織構築に関する基礎的研究, 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会, 愛知, 1月19-20日, 2017年

中牟田 侑昌(九大院), 荒平高章(福岡歯科大学), 東藤貢(九州大学応用力学研究所), 間葉系幹細胞とコラーゲン scaffold による軟骨様組織の作製と評価, 日本機械学会第28回バイオエンジニアリング講演会, 東京, 1月9-10日, 2016年

荒平高章(福岡歯科大学), 東藤貢(九州大学応用力学研究所), コラーゲン/リン酸三カルシウム複合系足場材の創製と in vitro 評価, 第42回日本臨床バイオメカニクス学会, 東京, 11月13-14日, 2015年

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒平 高章 (ARAHIRA, Takaaki)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号: 30706958

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし