

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K20079

研究課題名(和文)三次元酸素濃度勾配培養による骨発生機序の再構築

研究課題名(英文)Reconstruction of a bone development model by a 3-D cell culture system

研究代表者

穴田 貴久(Anada, Takahisa)

九州大学・先端物質化学研究所・准教授

研究者番号：30398466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：内軟骨性骨化は骨形成過程の一つであり、軟骨から骨に置き換わる発生過程である。細胞分化において細胞周囲の動的環境や様々な分子の濃度勾配が重要な役割を果たすと考えられている。本研究では骨発生機序のモデル培養系となる新規三次元細胞培養法を提案し、間葉系幹細胞から軟骨細胞分化と血管侵入という内軟骨性骨化を生体外で再現、再構築することを目的とした。培養デバイスを設計、作製し、三次元培養した幹細胞組織体の周囲の酸素濃度を変化させ、生体を模倣した三次元組織体を作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では三次元培養した幹細胞組織体の周囲に酸素濃度勾配を生じさせることで、軟骨細胞の分化勾配のある三次元組織体を作製することを目的とし、これを実現するための培養デバイスを設計、作製した。この方法により幹細胞から軟骨分化、さらに血管侵入という内軟骨性骨化を生体外で再現、再構築することを目的とした。本研究によって骨発生の分子メカニズムをより詳細に明らかにすることができ、さらに骨再生医療や骨疾患のモデルとしても用いることができるため波及効果が高い。

研究成果の概要(英文)：The formation of bone occurs by intramembranous or endochondral ossification. Endochondral ossification takes place during the transition of soft to hard callus. In this process, various molecules and their concentration gradient around cells play an important role in the cell differentiation of stem cells. We proposed a novel 3D cell culture system as a model of the endochondral ossification. The purpose of this study was reconstruction of a 3D tissue model for the chondrogenesis and invasion by capillaries to cartilaginous callus.

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

発生段階において脊椎動物の大腿骨などの長管骨は内軟骨性骨化と呼ばれる骨形成過程を経て形成される。これは軟骨により骨の雛形が形成され、後に軟骨から骨組織に置き換わる発生過程である。この過程においては軟骨原基への血管侵入が骨置換に先立って起こり、血管からの酸素や栄養によりその後の骨形成が促進されると考えられているが、詳細なメカニズムについては不明な点が多い。申請者はこれまでに独自の三次元細胞培養器を開発し、特許出願および論文投稿を行った（特許5578779号、引用文献1,2）。この培養器の最大の特徴は酸素透過性である。この酸素透過性細胞培養器は、細胞凝集塊に安定的に酸素を供給することができ、従来の三次元培養の問題点を解決し、再生医療を含めた広範な応用が可能な基盤技術であることを見出した。これら一連の研究において、酸素濃度が三次元培養した場合に細胞の生存や分化に極めて大きな影響を与えるという知見を得ている。これまでにこの培養器を使って三次元培養した軟骨の分化には低酸素状態が好ましく、一方、骨芽細胞には低酸素よりも通常酸素濃度で分化促進が起こることを見出している（引用文献3）。生体において関節軟骨は長軸方向に分化度の異なる軟骨細胞が整然と並んだ構造を取っているが、生体における一連の内軟骨性骨化プロセスを模倣できるin vitro実験系はほとんどない。

2. 研究の目的

内軟骨性骨化は骨形成過程の一つであり、軟骨により雛形が形成され骨に置き換わる発生過程である。我々はこれまでに酸素濃度が三次元培養した場合に細胞の生存や分化に極めて大きな影響を与えるという知見を得ている。細胞分化において細胞周囲のマイクロスケール環境や成長因子などの濃度勾配が重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、気体分子である酸素の濃度を制御し、酸素濃度勾配を細胞に与えることは難しく、酸素濃度勾配の軟骨分化に与える影響について検討した研究はほとんどなかった。

そこで本研究では新規三次元細胞培養法を提案し、これまでにない間葉系幹細胞から軟骨細胞分化と血管侵入という内軟骨性骨化を生体外で再現、再構築することを目指し、骨発生機序のモデル培養系を確立することを目的とした。

まずは、三次元培養した幹細胞組織体の周囲に酸素濃度勾配を生じさせることができる培養デバイスを設計、作製し、生体を模倣した長軸方向に軟骨細胞の分化勾配のある三次元組織体を作製した。酸素濃度勾配は、培養デバイス中の培地に大気から供給される酸素量と細胞組織体により消費される酸素量のバランスにより生じるようにデバイスを設計した。作製した三次元組織体の軟骨分化について評価を行った。さらに、作製した三次元組織体を血管内皮細胞含有ハイドロゲル中で培養し、組織体への血管侵入や阻害を観察、評価した。

3. 研究の方法

市販の中空系モジュール（セルローストリアセート製、中空糸内径285 μm 、ポアサイズ200 nm）にマウス軟骨細胞株ATDC5を充填し、軟骨細胞分化誘導培地を使って培養を行った。

培養は中空系中モジュール用培養デバイスを自作し、行った。細胞の酸素消費量などを計算し、軟骨細胞分化に最適な培養条件を設定することを試みた。細胞培養培地はインシュリンやTGF- β 3などの成長因子を含む軟骨細胞分化誘導培地を用い、培養デバイス中で3 から4 週間培養し、軟骨細胞分化を誘導した。中空系モジュールから細胞塊を回収し、組織切片を作製した。トリジンブルー染色、ヘマトキシリン、エオシン染色の他にコラーゲンII、アグリカン、コラーゲンXなどの軟骨細胞分化マーカーについて免疫染色を行った。細胞からmRNAを回収し、PCRにより分化マーカーの発現量を定量した。コントロールとして、酸素濃度勾配をかけない場合や分化誘導培地を用いない場合についても同様の培養を行い、比較を行った。さらに、細胞組織体を取り出し、ハイドロゲル中で血管内皮細胞HUVECと共培養することで血管新生アッセイを行った。

4 . 研究成果

細胞を球状に三次元培養（スフェロイド培養）すると内部は低酸素状態になることが知られているが、このときスフェロイド内部では軟骨細胞分化が促進することが報告されている。また、細胞数が系中に十分多い場合、担体材料中に培養した細胞塊の中の酸素濃度は表面からの深さに依存して徐々に低下し、濃度勾配ができることがわかっている。従って、本研究では細胞培養領域を調節することで培養デバイス上部の大気からによる酸素供給と細胞による酸素消費が平衡状態となり、培地の上部と底部で酸素濃度勾配が生じるように設計した。

中空系モジュールにマウス軟骨細胞株ATDC5を充填し、軟骨細胞分化誘導培地を使って培養した。中空系モジュール内に播種する細胞数を変化させて培養を行った。培養デバイスを用いて3週間培養することによって三次元培養環境下で軟骨細胞へ分化が誘導された。細胞分化は軟骨細胞分化マーカー発現により行った。細胞による酸素消費によって培養デバイス内の酸素濃度の低下が観察され、モジュール内における軟骨細胞の三次元培養に成功した。さらに、この三次元組織体と血管内皮細胞を共培養することで生体内における軟骨組織への血管侵入を模倣するような培養系を検討した。共培養にはスタンフォード大学医学部整形外科との共同研究により開発した光架橋性ゼラチンハイドロゲルを用いた（引用文献4）。本研究の成果によって、軟骨細胞の三次元細胞培養における酸素濃度の影響についてより詳細に検討できるような見通しを得ることができた。

< 引用文献 >

T Anada, J Fukuda, Y Sai, O Suzuki. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials*, 33, 2012, 8430-8441

T Anada, T Masuda, Y Honda, J Fukuda, F Arai, T Fukuda, O Suzuki. Three-dimensional cell culture device utilizing thin membrane deformation by decompression, *Sens Actuators B Chem*, 147, 2010, 376-379

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, 2016, 75-83

T Anada, C Pan, A Stahl, S Mori, J Fukuda, O Suzuki, Y Yang. Vascularized bone-mimetic hydrogel constructs by 3D bioprinting to promote osteogenesis and angiogenesis. *Int J Mol Sci*, 2019, 20, 1096.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Anada Takahisa, Pan Chi-Chun, Stahl Alexander, Mori Satomi, Fukuda Junji, Suzuki Osamu, Yang Yunzhi	4. 巻 20
2. 論文標題 Vascularized Bone-Mimetic Hydrogel Constructs by 3D Bioprinting to Promote Osteogenesis and Angiogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1096 ~ 1096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20051096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sato Tomoya, Anada Takahisa, Hamai Ryo, Shiwaku Yukari, Tsuchiya Kaori, Sakai Susumu, Baba Kazuyoshi, Sasaki Keiichi, Suzuki Osamu	4. 巻 88
2. 論文標題 Culture of hybrid spheroids composed of calcium phosphate materials and mesenchymal stem cells on an oxygen-permeable culture device to predict in vivo bone forming capability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 477 ~ 490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2019.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kurobane Tsuyoshi, Shiwaku Yukari, Anada Takahisa, Hamai Ryo, Tsuchiya Kaori, Baba Kazuyoshi, Iikubo Masahiro, Takahashi Tetsu, Suzuki Osamu	4. 巻 88
2. 論文標題 Angiogenesis involvement by octacalcium phosphate-gelatin composite-driven bone regeneration in rat calvaria critical-sized defect	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 514 ~ 526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2019.02.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shiraishi Naru, Ishiko-Uzuka Risa, Takahashi Kenta, Ogawa Toru, Anada Takahisa, Suzuki Osamu, Goto Takashi, Sasaki Keiichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of Functionally-Graded Calcium Titanate Film, Prepared by Metal-Organic Chemical Vapor Deposition, on Titanium Implant	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 172 ~ 172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app9010172	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 S Tsutsui, T Anada, Y Shiwaku, K Tsuchiya, H Yamazaki, O Suzuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Surface reactivity of octacalcium phosphate-derived fluoride-containing apatite in the presence of polyols and fluoride.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res B Appl Biomater	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 穴田貴久、鈴木治、Yunzhi Yang
2. 発表標題 血管と骨形成を促進するハイドロゲル構造体の作製
3. 学会等名 第40回バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 穴田貴久、佐藤智哉、佐々木啓一、鈴木治
2. 発表標題 リン酸カルシウム - 細胞ハイブリッド三次元複合組織体形成の 骨芽細胞分化への影響
3. 学会等名 粉体粉末冶金学会平成29 年度秋季大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 穴田貴久、鈴木治	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 321
3. 書名 歯科再生医学 第三章-6 「三次元オルガノイド形成」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学先端物質化学研究所ソフトマテリアル学際化学分野
<http://www.soft-material.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 治 (Suzuki Osamu) (60374948)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	