

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19945

研究課題名(和文)大きな骨再生と血管新生を促進する三次元マイクロパターン化足場材料の創出

研究課題名(英文) Development of a three dimensional scaffold with micropatterned structure for vascularized large bone regeneration

研究代表者

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・主席研究員

研究者番号：90314848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：外表面にストライプ状のマイクロパターン溝をもつコラーゲン多孔質足場材料の内部に間葉系幹細胞を、外表面のマイクロ溝に血管内皮細胞をそれぞれ播種し、生体外で3日間共培養した。次に、ヌードマウスの背中皮下に8週間移植した。骨再生について、免疫染色、骨分化関連遺伝子の定量RT-PCR解析を行った。他方、血管新生に関しても、免疫染色、血管新生関連遺伝子の発現レベル解析を行った。骨再生、血管新生ともに、マイクロパターンをもつ足場材料ではパターンをもたない足場材料(コントロール)に比べて、より豊富な新生骨と新生血管が確認された。さらにパターン溝の幅や間隔によって骨再生の効率が異なることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷や骨腫瘍切除によって生じた大きな骨欠損を治療するために、生体組織工学による再生医療が有望と考えられている。骨損傷が治癒する際には、血管新生が重要な役割を果たすことが知られているが、これまで、血管新生因子を導入した足場材料がいくつか報告されている。しかし、血管新生因子は空間的にランダムに導入されたため、血管新生の効果は十分ではなかった。本研究は、足場材料によって血管網の形成を制御し、骨再生への影響を評価した。血管網の形態をパターン化により工学的に制御することを特長としている。本研究で得られた知見は、これまでの方法では治癒しない大きな骨欠損の治療法の開発へとつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis is supposed to play an important role in the reconstruction of large bone defects. Here, we prepared dexamethasone-loaded calcium phosphate nanoparticles/collagen composite scaffolds with different types of concave microgrooves for simultaneous promotion of angiogenesis and osteogenesis. The microgrooves were designed to guide the assembly of HUVECs into well-aligned structures, leading to the rapid formation of new blood vessels. The scaffolds were co-cultured with HUVECs and hMSCs, and then subcutaneously implanted in mice. The result showed that more blood vessels and newly formed bone were observed in the microgrooved composite scaffolds than in the scaffold without microgrooves. The concave width of  $290 \pm 21 \mu\text{m}$  and the convex ridge width of  $352 \pm 23 \mu\text{m}$  had the highest promotive effect on angiogenesis and osteogenesis of all the tested conditions. The microgrooved composite scaffolds will be useful for the repair of large bone defects.

研究分野：生体組織工学

キーワード：骨再生 血管新生 マイクロパターン 足場材料

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自然治癒しない程度にまで大きく欠損してしまった組織の修復は、医療の大きな挑戦課題のひとつである。われわれはこの課題に取り組むため、これまで生体組織工学の手法を用いて、骨組織や軟骨組織を再生するための足場材料を開発してきた。骨組織の再生には血管新生が重要な役割を果たすといわれているが、血管網のパターンが骨再生の効率に与える影響についてはほとんど注目されてこなかった。そこで、血管網のパターンを自在に制御できる足場材料を開発すれば、上記の影響に対する理解が進み、効率よく骨組織を再生するための知見が得られると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、骨組織の再生における血管の重要性に着目し、血管網の新生を促進するマイクロパターン構造を有する骨再生足場材料の開発を目的とする。本足場材料を用いて間葉系幹細胞 (hMSCs) および血管内皮細胞 (HUVECs) を培養し、血管網が骨組織の再生効率に及ぼす影響を評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1) マイクロパターン化多孔質足場材料の設計

上記の目的を達成するため、骨再生のための多孔質層と血管新生のためのマイクロ溝パターン層を積層した多孔質足場材料を設計した。具体的には以下の特徴をもつ。

骨組織を再生するため、連通性が高い空孔構造をもつ多孔質層を作製する。多孔質層の原材料には、すぐれた細胞親和性をもつコラーゲンを用いる。この多孔質層にデキサメタゾン内包リン酸カルシウムナノ粒子を導入する。本ナノ粒子から、骨誘導能をもつデキサメタゾン、カルシウムイオンおよびリン酸イオンを徐放することによって、間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化を誘導する。

血管網の新生を促進するため、ストライプパターン状のマイクロ溝をもつ層を作製する。血管内皮細胞はマイクロ溝に沿って配向・集合し、血管網の新生が促進される。

#### (2) マイクロパターン化多孔質足場材料の作製

(1)の材料設計にもとづき、われわれがこれまでに確立した「氷微粒子を空孔形成剤として用いた多孔質体の作製手法」と「三次元パターン化手法」を組み合わせ、種々のパターンを有する多孔質足場材料を作製した。

具体的にはまず、低温チャンバー内でデキサメタゾン内包リン酸カルシウムナノ粒子を 2.5 (w/v) %I 型コラーゲン水溶液中に均一に分散させた。この分散液に、空孔形成剤として粒径 425 ~ 500  $\mu\text{m}$  の氷微粒子を 1/1 (w/v, 氷微粒子の重量/上記分散液の体積) で混合した後、型枠内に充てんした(骨組織形成層の形成)。他方、マイクロ溝を形成するため、微量液体分注装置を用いて、冷却した撥水性基板の表面に水滴をライン状に滴下することによって、ライン状の氷マイクロパターンを形成させた。上記のデキサメタゾン内包リン酸カルシウムナノ粒子/コラーゲン/氷微粒子混合物の上に 1.0 (w/v) %コラーゲン溶液を重層し、その液面にライン状の氷マイクロパターンが付着した基板を押しつけた(血管パターン形成層の形成)。つづいて、凍結、凍結乾燥、架橋反応、ブロッキング反応を行い、目的の多孔質足場材料を得た。

#### (3) マイクロパターン化多孔質足場材料のキャラクタリゼーション

(2)で得られた多孔質足場材料を走査電子顕微鏡 (SEM) で観察した。SEM 像を画像解析することによって、マイクロパターンの溝幅や溝間隔を計測した。

#### (4) マイクロパターン化多孔質足場材料を用いた in vitro 細胞培養

(2)で得られた多孔質足場材料の内部に hMSCs、マイクロパターン化表面に HUVECs を培養した。培養 1 日後、SEM を用いて間葉系幹細胞の接着を調べた。他方、培養 3 日後、血管内皮細胞の細胞核を蛍光色素 DAPI、表面マーカーを DC31 抗体で免疫染色した。

#### (5) マイクロパターン化多孔質足場材料による in vivo 骨組織・血管同時再生

まず、(2)で得られた多孔質足場材料の内部に hMSCs、マイクロパターン化表面に HUVECs を in vitro 培養した。次に、この培養物を 2 つずつ重ね合わせ、ヌードマウスの背中皮下に埋植した。8 週間後、埋植物から作製した組織切片を抗オステオカルシン (OCN) 抗体で染色した。また、骨関連マーカー骨シアロタンパク質 (IBSP)、骨形成タンパク質 (BMP-2) の各遺伝子発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法で解析した。他方、血管パターン形成層における血管新生についても評価した。埋植物を抗フォン・ヴィレブランド因子 (vWF) 抗体、抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 抗体でそれぞれ染色した。また、血管新生関連マーカー遺伝子 *VEGF*、*KDR* の発現をリアルタイム RT-PCR 法で解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) マイクロパターン化多孔質足場材料の作製とキャラクターゼーション

得られた多孔質足場材料を SEM で観察したところ、内部は連通した空孔が存在し、氷微粒子を反映した空孔、外表面にはストライプ状のマイクロ溝が確認された (図 1)。溝幅 (width) が  $290 \pm 21 \mu\text{m}$ 、溝間隔 (gap) が  $47 \pm 8 \mu\text{m}$  (W1G1),  $153 \pm 15 \mu\text{m}$  (W1G2),  $352 \pm 23 \mu\text{m}$  (W1G3)。W2G3 は溝幅が  $493 \pm 30 \mu\text{m}$ 、溝間隔が  $357 \pm 14 \mu\text{m}$  であった。

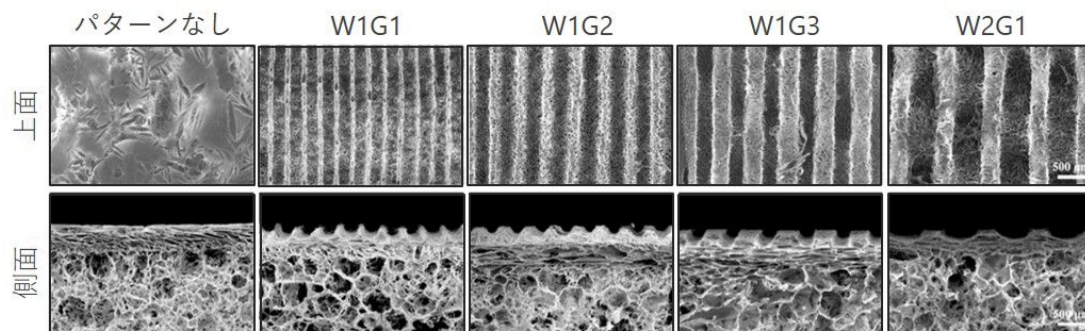


図 1 骨再生層と血管パターン形成層をもつマイクロパターン化多孔質足場材料の SEM 写真。

##### (2) マイクロパターン化多孔質足場材料を用いた in vitro 細胞培養

骨組織再生層に hMSCs、血管パターン形成層に HUVECs を播種し、in vitro で 3 日間培養した。骨組織再生層では hMSCs が空孔壁面に接着し、血管パターン形成層では HUVECs が溝の底面とその付近に集合していた。

##### (3) マイクロパターン化多孔質足場材料による in vivo 骨組織・血管同時再生

この培養物をヌードマウスの背中皮下に埋植した。8 週間後、埋植物の骨組織再生層を抗 OCN 抗体で染色したところ、血管パターン形成層をもつ足場材料では、血管パターン形成層を設けなかった足場材料に比べて濃く染まった。また、IBSP、BMP-2 の発現レベルを解析したところ、血管パターン形成層をもつ足場材料では、血管パターン形成層をもたない場合に比べて高い発現レベルを示した。

さらに、溝幅や溝間隔の違いによって、免疫染色、遺伝子発現レベルとも異なることがわかった。検討した溝幅や溝間隔の中で、溝幅  $290 \pm 21 \mu\text{m}$ 、溝間隔  $352 \pm 23 \mu\text{m}$  の多孔質足場材料が、免疫染色の度合い、遺伝子発現レベルとも最も高くなった (図 2)。

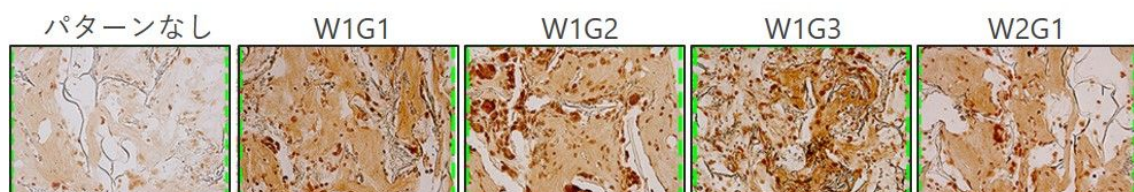


図 2 骨再生層に間葉系幹細胞、血管パターン形成層に血管内皮細胞を生体外で 3 日間培養した後、ヌードマウスの背中皮下に 8 週間埋植した。骨再生層をオステオカルシン抗体で染色した。

他方、血管パターン形成層における血管新生についても評価した。埋植物を抗 vWF 抗体、抗 VEGF 抗体でそれぞれ染色した。その結果、血管パターン形成層をもつ多孔質足場材料は、血管パターン形成層をもたない場合 (コントロール) に比べて、いずれの抗体でも濃く染まった。また、血管新生関連マーカー遺伝子 VEGF、KDR の発現レベルは、血管パターン形成層をもつ足場材料では、血管パターン形成層をもたない場合に比べて高くなった。

さらに、溝幅や溝間隔の違いによって、免疫染色の度合い、遺伝子発現レベルとも異なることがわかった。骨組織再生の結果と同様、溝幅  $290 \pm 21 \mu\text{m}$ 、溝間隔  $352 \pm 23 \mu\text{m}$  をもつ足場材料は、免疫染色の度合い、遺伝子発現レベルとも最も高くなった。以上より、本複合多孔質足場材料のマイクロ溝パターン構造によって血管新生が亢進されていること、それにともなって骨組織再生が促進されていることがわかった。

さらに、上記のストライプ状のマイクロ溝パターン以外にも、格子状のマイクロ溝パターンをもつ多孔質足場材料も作製し、より高い骨組織再生促進効果を確認した。

以上のように、マイクロ溝を導入した複合多孔質足場材料は血管再生を誘導し、同時に骨組織の再生を促進することができた。よって、これらの知見は、大きな骨組織を効率よく再生するための足場材料の設計に役立つと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3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 川添 直輝, 陳 国平	4. 巻 19巻
2. 論文標題 再生医療用多孔質材料の設計・加工, および目指すべき機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharm stage	6. 最初と最後の頁 45-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 陳 国平、川添 直輝	4. 巻 43巻
2. 論文標題 再生医療のための高分子多孔質材料の作製	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 膜	6. 最初と最後の頁 215 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5360/membrane.43.215	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 Ying Chen , Chen Shangwu , Naoki Kawazoe , Guoping Chen	4. 巻 VOL 8
2. 論文標題 Promoted Angiogenesis and Osteogenesis by Dexamethasone-loaded Calcium Phosphate Nanoparticles/Collagen Composite Scaffolds with Microgroove Networks	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14143-1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-32495-y	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 -
1. 著者名 YANGYingjun , Xinlong Wang , Tsung-Chun Huang , Xiaohong Hu , Naoki Kawazoe , Wei-Bor Tsai , Yingnan Yang , Guoping Chen	4. 巻 VOL 6
2. 論文標題 Regulation of mesenchymal stem cell functions by micro?nano hybrid patterned surfaces	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 5424 ~ 5434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8tb01621f	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 該当する

1. 著者名 川添 直輝、陳 国平	4. 巻 15巻
2. 論文標題 多孔質足場材料の設計・開発において考慮すべき要件	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 研究開発リーダー	6. 最初と最後の頁 9~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 川添 直輝, チェン イン, 陳 国平
2. 発表標題 骨誘導と血管新生を促進するマイクロパターン化多孔質足場材料の開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki Kawazoe, Yingjun Yang, Xinlong Wang, Guoping Chen
2. 発表標題 Gene Transfection into Mesenchymal Stem Cells on Micropatterned Surfaces
3. 学会等名 TERMIS-AP (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川添 直輝, ヤン インジュン, 陳 国平
2. 発表標題 幹細胞の機能を制御するマイクロ-ナノ複合パターン化表面の構築
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Guoping Chen, Ying Chen, Naoki Kawazoe
2. 発表標題 Dexamethasone-Loaded Composite Scaffolds for Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells
3. 学会等名 TERMIS-AP 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川添 直輝、王 新龍、陳 国平
2. 発表標題 Cellular nanomechanics of stem cells and cancer cells confined to micropatterned surfaces
3. 学会等名 BIOMEDD ' 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川添 直輝、王 新龍、陳 国平
2. 発表標題 Cellular Mechanics of Tumour Microenvironment Cells on Micropatterned Surfaces
3. 学会等名 2018 TERMIS World Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 川添直輝、陳国平	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 315
3. 書名 「多孔質材料の構造制御や生理活性物質の複合化による細胞機能制御」 配島由二監修 『無機/有機材料の表面処理・改質による生体適合性付与』	

1. 著者名 川添直輝、陳国平	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 254
3. 書名 『関軟骨再生を促進する複合多孔質足場材料の開発』佐藤正人監修 『軟骨再生を促進する複合多孔質足場材料の開発』	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	陳 国平  (Chen Guoping)  (50357505)	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    (82108)	