

平成21年 5月18日現在

研究種目：若手研究（B）	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19700399	
研究課題名（和文）	生体擬似ストレス環境下におけるオリジナル3次元担体の骨再生を促す力学刺激量の同定
研究課題名（英文）	Identification of mechanical stimulation to promote osteoanagenesis by a unique three-dimensional scaffold
研究代表者	益田 泰輔 (MASUDA TAISUKE) 東北大学・大学院歯学研究科・助教 研究者番号：30431513

研究成果の概要：本研究は、生体内のストレス環境を模倣した培養システム（メカニカルステイミュレータ）の開発と規則的構造体を有する3次元エラストマー成担体の開発を通して、力学刺激量とそれに対する細胞の増殖・分化誘導条件の最適化を目指した。未分化骨芽細胞を用いた培養の結果、圧縮ひずみ下において Col1 および OPN の遺伝子発現が抑制されることがわかった。このことからメカニカルストレスによる分化調節・分化維持の可能性が示唆される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

研究分野：バイオエンジニアリング，機械工学，生体材料
 科研費の分科・細目：人間医工学，医用生体工学・生体材料学
 キーワード：再生医工学材料，メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

我々のグループは独自の骨再生担体（合成 OCP/Col）開発過程において、メカニカルストレス下における骨再生促進効果が得られる可能性を示唆してきた。しかしメカニカルストレスの役割は不明なところが多く、既存の2次元メカニカルストレス培養システムでは生体内の力学条件を満たせない。そこで *in vitro* において生体内力学条件を模倣した3次元培養システムの開発が求められている。培養システムの開発・研究遂行には、担体を介して細胞に与えるメカニカルストレスの影響を定量評価することが必要であることがこれまでの得られた知見から明らかになった。そこで本研究では、規格化された

構造をもつエラストマー担体を使用したメカニカルストレス培養により、細胞に及ぼす力学刺激（メカニカルストレス）を定量することを目的とし、骨再生メカニズムにおけるメカニカルストレスの役割を明らかにすることを旨とする。

2. 研究の目的

(1) 生体内環境を模倣したメカニカル培養システムの開発

生体内の細胞は運動・血流・拍動などの生命活動の結果、常時メカニカルストレス（圧縮・引張、せん断など）を受けている。これらのメカニカルストレスは細胞の機能維持のためには必要なものと考えられる。ここで

は、3次元担体に生体内を模倣したストレスを負荷するメカニカルスティミュレータを開発する。

(2) エラストマー担体の作成と力学刺激量の定量

従来の細胞培養モデルが2次元であるのに対して、生体組織構造を模倣した3次元担体は、生体組織機能を再現し物理的な支持体の役割を果たすことができる。しかしながら、生理的に複雑な構造体は骨吸収・骨形成を求める *in vivo* 実験には有効であるが、メカニカルストレスの力学的解析ならびに評価のためには規則的な構造体であることが望まれる。そこでPDMS（ポリジメチルシロキサン）エラストマーにて規則的な3次元担体を作成し、メカニカルストレス培養を行う。PDMS担体が規則的な構造体を持てば、有限要素法によりストレス値の定量解析を行う。

3. 研究の方法

(1) エラストマー担体の作成

本研究で使用した担体は以下の設計コンセプトをもとに作成した。

- I 生体親和性・非毒性
- II 規則的な構造体
- III 光学的評価のための透明性
- IV 各種メカニカルストレスに耐えうる弾力性・柔軟性

幅①幅 600mm の溝をもつ鋳型を重ね合わせ、生体親和性に優れた PDMS ゲルを流し込み硬化。②硬化した PDMS レイヤー表面にプラズマエッチング (3min) を行う。③エッチングした表面を重ね合わせ、120°C 恒温にて接着し、3次元構造体を作成する。

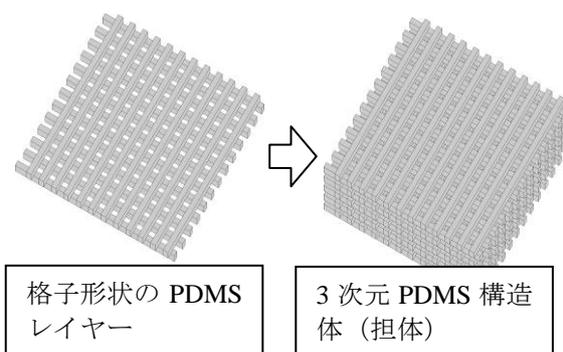


図1 エラストマー担体の設計コンセプト。鋳型により作成した PDMS レイヤーを重ね合わせて、3次元 PDMS 構造体 (担体) を作成する。

(2) メカニカルストレス培養

細胞はマウス由来未分化骨芽細胞 ST-2 を用い、エラストマー担体の親水化処理・フィブロネクチン固定・減圧注入を経て担体内部への細胞接着を誘導した。メカニカルストレ

ス培養は、オリジナルのストレス負荷治具を作製し、定量的なストレス量を与えた。全5日間の培養後、蛍光染色による細胞骨格を調査した。また全 RNA を回収し、各種遺伝子の発現を調べた。

4. 研究成果

(1) 規則的な空隙構造をもつ担体

図2は、作成したエラストマー担体を示す。担体は3方向への規則的な空隙を備え、透明性ならびに弾力性を保持していることが確認された。また、プラズマエッチングによりボンディングされた PDMS レイヤー同士は、大変形にも耐えうる接着性を保持し、PDMS担体がメカニカルストレス培養に使用できることが示された。

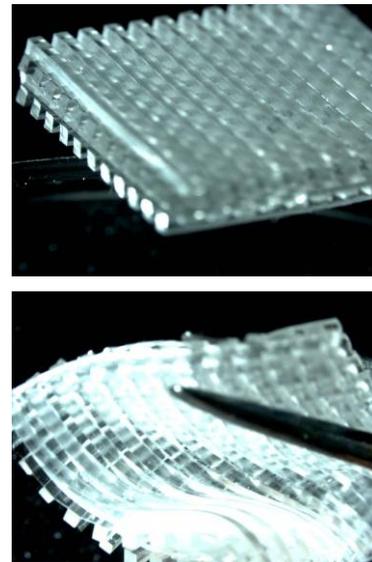


図2 規則的な空隙と柔軟性を備えた PDMS 構造体 (担体)。

(2) ストレス負荷治具および力学刺激量

ストレス負荷治具は、垂直方向の静止加重を負荷する治具 (MSD 1: Mechanical Stress Device 1) または水平方向への引張を負荷する治具 (MSD 2: Mechanical Stress Device 2) の2つの治具を作製した。MSD 1はスライドベアリングを介して PDMS 担体へ直接的に加重を負荷するものとし、最大 10 kg までの耐加重をもつ。MSD 2は、1軸方向への引張とし、ボールネジの回転量より移動距離 (ひずみ量) を見積もった。ともに全ての部品要素は細胞非毒性の材料で構成されている。

ANSYS 5.7により3次元有限要素解析を行った結果を図4に示す。シミュレーションモデルは2枚の PDMS レイヤーを重ね合わせ、便宜上4等分したものを使用した。境界条件はエラストマー材料全体を等方性とし、2つの断面には対称条件を与えた。また、ヤング率は 0.6 MPa、ポアソン比は 0.48 とした。MSD

1, MSD 2 ともに圧縮・引張ひずみ場が混在するものであったが, MSD 1 では圧縮ひずみが MSD 2 では引張ひずみが主体的な要素であることが示された。

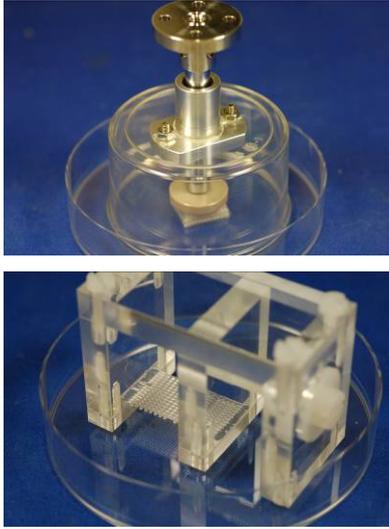


図3 メカニカルストレス負荷具. MSD 1: 垂直方向への圧縮荷重. MSD 2: 水平方向への引張.

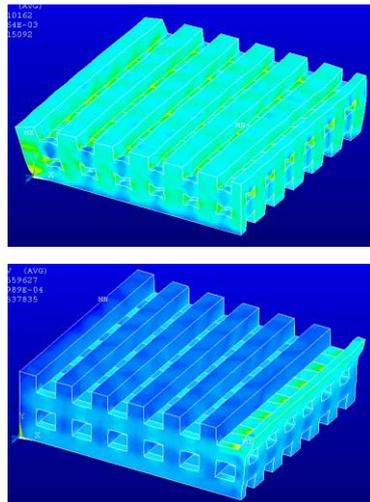


図4 メカニカルストレス環境下における PDMS 担体のひずみ場. MSD 1 および MSD 2 によるひずみ場はそれぞれ異なる主ひずみ (圧縮および引張) によって支配されている。

(3) メカニカルストレス培養 (圧縮ひずみ)

マウス由来未分化骨芽細胞株 ST-2 細胞が PDMS 担体内部へ接着している様子を図5に示す。細胞は担体内部の PDMS 表面にほぼ均一に接着し, 細胞同士による3次元的位置関係を維持していることが観察された。担体内部への培地の供給および老廃物の排出は, 24時間ごとの培地交換で行った。それにより酸欠や栄養不足を免れ, 長期間の培養が可能となった。

MSD 1 を用いた一定期間のメカニカルス

トレス培養後, 培養細胞から全 RNA を回収した。回収した RNA を用いて, 骨芽細胞分化関連遺伝子の mRNA の発現量をリアルタイム定量 PCR 法にて定量した。図1に圧縮ひずみ量 (圧縮力) における I 型コラーゲンおよびオステオポンチン影響を示す。I 型コラーゲンは骨芽細胞が産生する骨基質タンパクの主要成分である。細胞の増殖とともに I 型コラーゲンの合成が行われ, 成熟骨芽細胞への分化とともにオステオポンチンを強く発現するようになる。オステオポンチンはメカニカルストレスの感受機構経路の一部を担うものとも考えられている。I 型コラーゲン・オステオポンチンともに圧縮負荷群の mRNA 発現量は非圧縮負荷群と比較して低下することがわかった。言い換えると, PDMS 担体への圧縮ひずみ負荷において骨芽細胞の分化が抑制することができた。また, その mRNA の発現量は負荷量 (圧縮力) に依存する傾向があり, メカニカルストレスによる分化調節の可能性を示唆する。

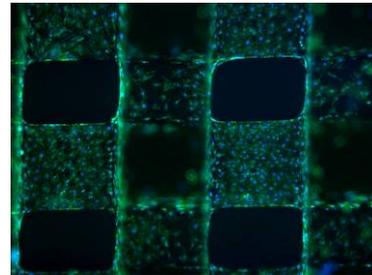


図5 PDMS 担体内部の細胞挙動

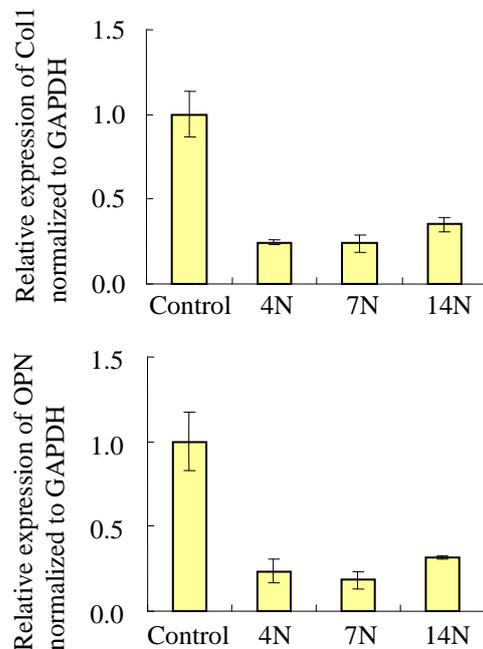


図6 骨芽細胞分化に及ぼすメカニカルストレスの影響。圧縮力による骨芽細胞分化抑制の調節が示唆される

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3件)

- 1) I. Takahashi, T. Masuda, et al., Molecular Mechanisms of mechanical Stress Response during Chondrogenesis, Journal of Biomechanical Science and Engineering, 4 (2009) 印刷中, 査読有.
- 2) 鈴木治, 益田泰輔, 高橋一郎, 局所環境が硬組織形成細胞の分化に及ぼす影響について, 生体医工学, 46 (2008) 414-418, 査読有.
- 3) T. Masuda, I. Takahashi, et al., Development of cell culture system loading cyclic mechanical strain to chondrogenic cells, J. Biotechnol, 133 (2008) 231-238, 査読有.

[学会発表] (計4件)

- 1) A Mastui, et al., Effects of Mechanical Strain on Differentiation of Osteoblastic Cells, 2008 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, (2008.11.8), Nagoya.
- 2) T. Masuda, et al., Characterization of Three-Dimensional Elastomer Scaffolds for Mechanical Stimulation Culture, 8th World Biomaterials Congress, (2008.5.29) Amsterdam.
- 3) T. Masuda, et al., Fabrication of PDMS scaffold with controlled configuration, 2007 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, (2007.11.11), Nagoya.
- 4) 益田泰輔 ほか, 勾配量メカニカルストレス培養システムの開発, 第46回日本生体医工学会大会, (2007.4.26), 仙台.

[図書] (計1件)

- 1) T. Masuda, et al. (分担執筆), Springer, Interface Oral Health Science 2007, Eds. M. Watanabe and O. Okuno, (2007) 161-166.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www-kiso.dent.tohoku.ac.jp/cfe/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

益田 泰輔 (MASUDA TAISUKE)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30431513

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：