

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05690

研究課題名(和文) 膝関節再生を志向した間葉系幹細胞の分化制御と移植用組織の構築

研究課題名(英文) Control of differentiation of mesenchymal stem cells and construction of transplantation tissue for knee joint regeneration

研究代表者

飯島 一智 (Iijima, Kazutoshi)

横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：30468508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞足場ハイドロゲルの種々の機能化と工学的手法を組み合わせることにより、間葉系幹細胞の分化を制御し、軟骨-軟骨下骨連続組織や靭帯・腱のような配向性組織など、種々の移植用の運動組織を構築する手法の開発を行なった。ゲル弾性率が間葉系幹細胞の骨、軟骨分化挙動へ与える影響を明らかにするとともに、ヒドロキシアパタイトでの機能化により骨分化が促進されることを見出した。また、生理活性分子の濃度勾配を用いて軟骨-軟骨下骨連続組織を作製した。配向性組織の構築ではマイクロ流体デバイスを用い、共有結合形成とポリオンコンプレックス形成を組み合わせることでゲルファイバーを作製することができ、細胞は流れ方向に配向した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハイドロゲルの物性制御や機能化により間葉系幹細胞の分化を制御可能であることを実証した点、および分化状態の異なる複数成分からなる組織を構築する手法を提案した点において、本研究成果は学術的意義を有する。また、高齢化者の多くが罹患する変形性膝関節症などの根本的治療として再生医療に期待が寄せられており、本研究成果はその実現に不可欠な軟骨および軟骨下骨の連続組織の構築に貢献しているものである。

研究成果の概要(英文)：By combining functionalizations and engineering techniques of cell scaffold hydrogels, methods to control differentiation of mesenchymal stem cells and construct various tissues such as cartilage-subchondral bone continuous tissue and oriented tissue such as ligaments and tendons were developed. The effect of gel elastic modulus on the osteogenic and cartilage differentiation behavior of mesenchymal stem cells were investigated. We found that functionalization of hydrogels with hydroxyapatite promoted osteogenic differentiation. In addition, a cartilage-subchondral bone continuous tissue was prepared using the concentration gradient of bioactive molecules. Gel fibers could be produced by combining covalent bond formation and polyion complex formation in a microfluidic device, and the cells were aligned in the flow direction.

研究分野：生体関連化学

キーワード：細胞足場 間葉系幹細胞 変形性膝関節症 ハイドロゲル マイクロ流体技術

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多分化能と自己複製能を併せもつ幹細胞を用いた再生医療が臨床的に汎用されるためには幹細胞を特定の細胞に高効率に分化させるとともに、組織を形作る技術の開発が不可欠である。体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞は多分化能や無限増殖性の点で ES 細胞や iPS 細胞に劣るものの、骨や軟骨、筋肉など多様な細胞への分化能を有し、患者本人の骨髄や脂肪組織等より比較的低侵襲に採取できることから研究が盛んに行なわれてきた。間葉系幹細胞を各組織に分化誘導するのに適した細胞足場の開発も進められ、我々も間葉系幹細胞の分化を制御するための足場材料の開発を行なってきた (Iijima K, *et al.*, *Colloids Surf. B* 2016, *ACS Omega* 2018 など)。一方、軟骨-軟骨下骨連続組織や靭帯・腱のような配向性組織など、種々の移植用の運動組織を構築する手法は十分に確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞足場ハイドロゲルの種々の機能化と工学的手法を組み合わせることにより、間葉系幹細胞の分化を制御し、軟骨-軟骨下骨連続組織や靭帯・腱のような配向性組織など、種々の移植用の運動組織を構築する手法の開発を目的とした。ゲルの機能化として、力学および化学的特性の制御、生理活性分子の濃度勾配、およびマイクロ流体技術を用いた配向性の付与について検討し、変形性膝関節症への移植に適用可能な軟骨-軟骨下骨連続組織、半月板を構成する線維軟骨組織、および靭帯・腱のような配向性組織の構築を目的とした。これにより、高齢化に伴い急増する変形性膝関節症などの重症関節疾患に対する再生医療の実現を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞の播種および分化特性や組織形態の評価

初代もしくは株化されたヒト骨髄由来細胞を各種多糖細胞足場ハイドロゲル前駆溶液中に懸濁し、ゲル化をさせることで、ハイドロゲル中に間葉系幹細胞を播種した。ハイドロゲル内へ播種した間葉系幹細胞は各細胞系列への分化誘導培地を用いて培養を開始した。所定期間培養後の細胞より total RNA を抽出し、cDNA を合成後、SYBR もしくは Taqman probe を用いたリアルタイム PCR により各種分化マーカー遺伝子の発現を解析した。また、分化培養後のゲルを固定・パラフィン包埋後に薄切片を作製し、ヘマトキシリン & エオジン (H&E) 染色、アルシアンブルー染色および、コラーゲンの免疫染色を行い、光学顕微鏡により観察を行った。

(2) 生理活性分子の濃度勾配を用いた骨-軟骨下骨連続組織の作製

セルカルチャーインサート内に間葉系幹細胞を細胞足場ハイドロゲルとともに播種し、ゲルの上部および下部より軟骨分化誘導培地、骨分化誘導培地をそれぞれ作用させ、所定時間培養を行なった。培養後のゲルは(1)と同様に薄切片を作製し、形態観察を行なった。

(3) 配向組織の構築

先行研究 (Iijima K, *et al.*, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019) を基に同軸二層流を生み出すマイクロ流体デバイスを作製し、内側を流れるコアフローおよび外側を流れるシースフローにそれぞれゲル前駆溶液を所定の流速にて流した。細胞を播種する際は、コアフロー溶液に予め混合させた。作製直後および培養後の細胞担持ゲルファイバーは、蛍光標識細胞もしくはローファミン標識ファロイジン染色後の蛍光顕微鏡観察により評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞足場の力学および化学的特性の制御による間葉系幹細胞の分化制御

まず、力学特性の異なるゲル型細胞足場の作製と足場の弾性率がヒト骨髄由来間葉系幹細胞の分化へ与える影響の解析を行った。力学特性の異なるゲル型細胞足場はゲル前駆溶液の濃度および架橋点密度により制御を行った。高濃度のゲル前駆溶液より得られる高弾性ゲルにおいて培養した間葉系幹細胞では前期および後期の骨分化マーカーいずれの発現も低弾性ゲル中で培養したものと比較して顕著に高くなっており、高弾性率ゲルにおいて間葉系幹細胞からの骨分化が顕著に促進されていることがわかった。架橋密度により力学特性を制御可能な多糖ゲル型細胞足場においても同様の傾向が見られた。ゲルの弾性率により軟骨分化挙動が大きく変化することがわかった。化学的特性による比較では、ヒアルロン酸を酸化開裂させアルデヒドを生じさせたヒアルロン酸ジアルデヒドを用いて形成したハイドロゲルは合成高分子であるポリエチレングリコールを用いたゲル足場よりも高い軟骨マーカー遺伝子の発現が見られた。本手法を利用して弾性率に勾配を有するゲルを作製することで、骨-軟骨下骨連続組織の構築が可能になると見込まれる。

また、ヒアルロン酸ジアルデヒドとカルボキシメチルキトサンからなるハイドロゲルが自己修復性を有することを見出した。本ハイドロゲルの自己修復性を利用することで、本ゲルを足場として間葉系幹細胞から骨組織、軟骨組織をそれぞれ構築した後、自己修復能を用いて一体組織

へと成形することも可能となる。

(2) 生理活性分子の濃度勾配を用いた軟骨-軟骨下骨連続組織の作製

セルカルチャーインサートを用いてゲルの上部と下部より異なる培地を適用することで、生理活性分子の濃度勾配を生じさせ、連続的に細胞の分化状態が異なる組織を作製する手法を開発した。具体的には、セルカルチャーインサート内に間葉系幹細胞を細胞足場ハイドロゲルとともに播種し、ゲルの上部および下部より軟骨分化誘導培地、骨分化誘導培地をそれぞれ作用させた(図1A)。結果、軟骨分化誘導培地側では軟骨分化が促進され(図1B)、骨分化誘導培地側でもわずかではあるが骨分化が見られ、軟骨-軟骨下骨連続組織様の組織を作製できるとが示された。また、十分ではなかったハイドロゲル中での間葉系幹細胞の骨分化を促進するため、ハイドロゲルのヒドロキシアパタイトによる機能化について検討した。骨分化マーカー遺伝子の発現解析より、ハイドロゲルをヒドロキシアパタイト、特にナノ径を有するヒドロキシアパタイトによる機能化により間葉系幹細胞の骨分化が促進されることが示された(図2)。

(1)での細胞足場の力学および化学的特性の制御による間葉系幹細胞の分化制御と(2)での生理活性分子の濃度勾配を組み合わせることで、より優れた軟骨-軟骨下骨連続組織の構築が可能になると見込まれる。

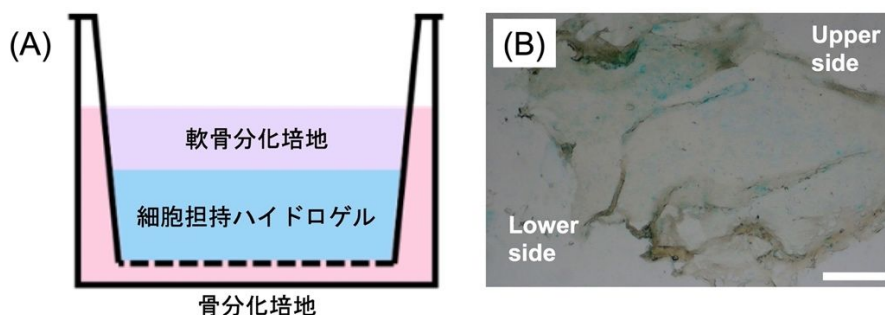


図1. 生理活性分子の濃度勾配を用いた骨-軟骨下骨連続組織の作製.
(A) 模式図, (B) 培養後の組織切片のあるシアンブルー染色.
スケールバー: 200 μm

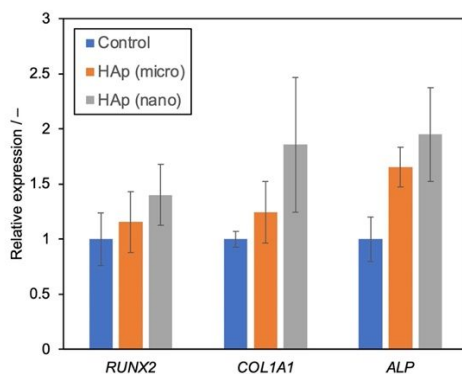


図2. ヒドロキシアパタイト (HAp) 含有ゲルにおける骨分化挙動.
各骨分化マーカー遺伝子の発現

(3) 配向性組織の構築

靭帯・腱のような配向性組織の構築を目指し、マイクロ流体デバイスを用いたゲルファイバーの作製を行った。まず、共有結合形成を駆動力とするハイドロゲルの系においてゲルファイバーの作製を試みたが、ゲルファイバーは形成されなかった。同軸二層流間の界面でのゲル化反応を利用した本手法では速やかなゲル化が必須であり、共有結合形成を駆動力とするゲルの適用は困難であると考えられた。そこで、高い安定性を有する共有結合形成と即時反応性を有するポリイオンコンプレックス形成を組み合わせたとこ、ゲルファイバーを作製することに成功した。この手法により作製されたゲルファイバーはポリイオンコンプレックス形成のみからなるゲルファイバーと比較して安定性が高かったことから、共有結合形成とポリイオンコンプレックス形成の2つの機構により形成されていることが確認された。また、ゲルファイバー中に間葉系幹細胞を高い細胞率生存率を維持して担持できること、一定期間の培養後に細胞が流れ方向に配向を示すことが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 山内一輝、飯島 一智
2. 発表標題 キトサン・ヒアルロン酸ハイドロゲルを用いた間葉系幹細胞の培養
3. 学会等名 第71回コロナおよび界面化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内一輝、飯島 一智
2. 発表標題 キトサン / ヒアルロン酸ハイドロゲルの特性評価と細胞足場への応用
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	山内 一輝 (Yamauchi Kazuki)		
研究協力者	小野寺 晃大 (Onodera Kodai)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------