

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23604

研究課題名(和文)骨形成再現に向けた旋回培養法による骨オルガノイド大量作製及び新たな活用法構築

研究課題名(英文) Establishment of mass-productive fabrication method and new applications for bone organoids reconstructed by rotatory culture toward bone reconstruction

研究代表者

KIM JEONGHYUN (Kim, Jeonghyun)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定研究員

研究者番号：20844591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウス前駆骨芽細胞(MC3T3-E1)を用い複数の3次元培養モデルを作製した。1)サイズ制御可能スフェロイド 2)旋回培養を用いたスフェロイド大量作製法 3)ディスク型 Scaffold-free tissue。これらの3次元培養モデルは骨分化誘導剤なしの条件においても、従来の2次元培養法に比べて、短時間で骨細胞分化を誘導できた。また、本研究では生体に移植可能なレベルまで3次元培養モデルをスケールアップした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでゲルなどの人工物質を用いた様々な3次元培養法が報告されてきたが、これらの人工物質による移植後の拒否反応のリスクがあるのに対して、本研究では組織工学的手法を用いて細胞のみで構築される3次元培養モデルを作製した。さらに、前駆骨芽細胞の3次元化により骨細胞分化が短時間で誘導されることが明らかになった。本研究で作製された骨芽細胞由来3次元培養モデルは今後骨細胞のin vitroモデルとしての活用が期待され、さらに本研究により移植実験に応用可能なレベルまで3次元細胞組織体をスケールアップできた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we fabricated three types of 3D scaffold-free tissue reconstructed by mouse pre-osteoblast cells (MC3T3-E1); 1) size-controlled spheroid under a stationary culture, 2) mass-produced spheroids under a rotational culture, and 3) cell disc using glass ring. Compared to a conventional 2D monolayer model, the 3D culture models elicited up-regulations of osteocyte markers in a short time even without addition of chemical osteogenesis supplements. The 3D culture models reconstructed by pre-osteoblast cells were scaled-up for further transplantation experiment toward bone regenerative medicine.

研究分野：組織工学

キーワード：3次元培養 旋回培養 骨細胞 分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨は破骨細胞(osteoclast)による骨吸収と、骨芽細胞(osteoblast)による骨形成を繰り返す骨リモデリングを常に行なっている。また、骨中の95%に該当する骨芽細胞由来の骨細胞(osteocyte)は、骨形成時に骨芽細胞が産生した類骨に埋まる。類骨は骨を構成する未石灰化部分でありその主の繊維はコラーゲン1型である。石灰化した骨類に埋まれた骨細胞への接近が困難である為、骨芽細胞を骨細胞の研究モデルとして使っているのが現状であり、生体内に存在している状態の骨組織を再現する実験モデルが必要である。骨芽細胞を分化培地などの科学的刺激を加える2次元的条件で3-4週間の長期培養をすると、ようやく細胞は多重化してコラーゲン繊維に囲まれたような石灰化球という形が部分的に見られる。この結果から、骨形成においては高い細胞密度およびそれによるコラーゲン繊維などの細胞外マトリックスとの融合が重要な要素であると申請者は考えた。さらに、3次元培養技術を用いることにより、細胞が細胞外マトリックスに囲まれ、骨化に有利な環境を与えるのではと着想した。

2. 研究の目的

本研究では *in vitro*・*in vivo* で活用できる3次元培養モデルである骨オルガノイドモデルの構築を目的とする。これまでにゲルなどの人工物質(スキャフォールド; scaffold)を用いた3次元化方法が報告されているが、これらの人工物質による移植後の拒絶反応のリスクがあるのに対して、今回検討する手法では細胞だけで構築された3次元スキャフォールドフリー(scaffold-free)細胞組織体を作製する。この3次元細胞組織体の骨細胞分化能を検証して、骨細胞分化機構を探る。また、従来の一つずつ作られる3次元スフェロイドモデル以外にも、本研究では移植実験に応用可能なレベルの細胞組織体のスケールアップに挑む。

3. 研究の方法

本研究では目的達成のため以下の3つのマウス前駆骨芽細胞(MC3T3-E1)由来3次元培養モデルを作製し、それぞれの骨細胞分化能を調べた。

- 1) サイズ制御可能スフェロイド(size-controlled spheroid)
- 2) 旋回培養を用いたスフェロイド大量作製法
- 3) ディスク型 Scaffold-free tissue

4. 研究成果

1) サイズ制御可能スフェロイド (size-controlled spheroid)
スフェロイドの大きさによる骨細胞分化への影響を探るため、U底細胞非接着培養 Dish を用いて播種細胞数を変えることによりスフェロイドの大きさを調節できる Size-controlled spheroid を作製した。播種細胞を 1000, 2500, 5000, 10000 個に変えて、2日後のスフェロイドの大きさを測定した。直径 100 - 200 μm の大きさのスフェロイドが2日後に形成された。これらスフェロイドの骨細胞分化遺伝子量は、従来の2次元培養モデル(monolayer)に比べ、2日間の短時間

で大きく上昇した。また、7日間長期培養したスフェロイドにおいても、骨細胞分化遺伝子量はさらに上昇した。さらに、スフェロイドのサイズごとに骨細胞分化遺伝子量が異なるのが明らかになった。一方、スフェロイドのサイズが大きくなると、スフェロイド内の酸素及び栄養提供が不足するため死細胞が増える傾向が観察されたため、適切な大きさを維持しつつ、このスフェロイドを活用する必要がある。この研究成果は、Journal of Biomechanical Science and Engineering に公表された。

2) 旋回培養を用いたスフェロイド大量作製法

従来の静置培養法によるスフェロイドは一つずつ作製するが、本実験では骨再生医療に向けて旋回培養法によりスフェロイドを大量作製した。Flat 底細胞非接着培養 Dish 上に 1,040 cells/mm² の細胞を播種し、70 rpm で8時間旋回培養を行なった。8時間後、ヘテロな大きさのスフェロイドが大量に形成され、このスフェロイドをさらに40時間静置培養を行なった。上記の静置培養法のスフェロイドモデルと同様に、従来の2次元モデル比べて、骨細胞分化能が大きく上昇した。また、この研究では、3次元培養の効果により上昇する骨細胞遺伝子量が、骨分化誘導剤による化学刺激による効果よりはるかに大きいことが明らかになった。また、Microarrayの結果から、スフェロイド内では、PCRの結果と同様に、骨細胞分化マーカーの上昇と骨芽細胞分化マーカーの現象が見られた。さらに、スフェロイド内では細胞増殖マーカーは非常に少なく、細胞周期が停止傾向にあることが明らかになった。この研究成果は Frontiers in Bioengineering and Biotechnology に公表された。

3) ディスク型 Scaffold-free tissue

スフェロイドモデルだけでなく、ディスク(Disk)型組織体(Scaffold-free tissue; SFT)の作製法も確立した。従来の細胞シートより分厚く頑丈なディスク型 SFT を初めて作製した。このモデルにおいても、短時間で骨細胞分化遺伝子が大きく上昇し、骨芽細胞分化マーカーは減少した。この細胞ディスクにおいて低酸素刺激(5% O₂)を加えた。2次元培養モデルの細胞は、骨芽細胞・骨細胞分化マーカーは優位に減少することが分かったが、細胞ディスクにおいては成熟骨細胞分化マーカー(Sost)が上昇する結果が得られた。これは、in vitro において3次元培養と2次元培養が異なる応答を示すことであり、3次元培養が生体をより模倣できるモデルとしての重要性を表す結果である。この研究成果は Tissue Engineering Part A に公表された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kim Jeonghyun, Adachi Taiji	4. 巻 7
2. 論文標題 Cell Condensation Triggers the Differentiation of Osteoblast Precursor Cells to Osteocyte-Like Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbioe.2019.00288	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 Kim Jeonghyun, Kigami Hiroyuki, Adachi Taiji	4. 巻 15
2. 論文標題 Characterization of self-organized osteocytic spheroids using mouse osteoblast-like cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 20-00227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1299/jbse.20-00227	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 Kim Jeonghyun, Adachi Taiji	4. 巻 -
2. 論文標題 Modulation of Sost Gene Expression Under Hypoxia in Three-Dimensional Scaffold-Free Osteocytic Tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2020.0228	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 Kim Jeonghyun, Ishikawa Keiichi, Sunaga Junko, Adachi Taiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Uniaxially fixed mechanical boundary condition elicits cellular alignment in collagen matrix with induction of osteogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-88505-z	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

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Facilitated osteogenic differentiation of mouse pre-osteoblast cells in three-dimensional tissue engineered constructs
3. 学会等名 日本機械学会 第30回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Effect of three-dimensional structure for pre-osteoblast cells on osteocyte differentiation
3. 学会等名 4th Africa International Biotechnology and Biomedical Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Enhancement of osteocytogenesis for pre-osteoblast cells in three-dimensional spheroid culture
3. 学会等名 10th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Pre-osteoblast cells in three-dimensional spheroids evoke in vitro osteocytogenesis
3. 学会等名 日本機械学会 第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Promoted osteocyte differentiation of osteoblast-like cells in three-dimensional spheroid culture
3. 学会等名 11th Annual Meeting of the Korean Scientists and Engineers Association in Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 In vitro osteocytogenesis induction by three-dimensional scaffold-free spheroid model
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Cell condensation acquired in three-dimensional culture system triggers osteocyte differentiation of pre-osteoblast cells
3. 学会等名 第47回 日本臨床バイオメカニクス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Kigami, Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Evaluation of three-dimensional osteocytic spheroid using mouse osteoblast-like cells
3. 学会等名 日本機械学会 第31回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Development of cartilage cell sheet using pre-chondrocyte ATDC5 cells
3. 学会等名 12th Annual Meeting of the Korean Scientists and Engineers Association in Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Mesenchymal stem cell commitment to osteocyte differentiation is facilitated in spheroid culture
3. 学会等名 第20回 日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jeonghyun Kim, Taiji Adachi
2. 発表標題 Three-dimensional culture technology: Self-organized spheroid culture drives osteocytogenesis
3. 学会等名 2021 IEEE 3rd Global Conference on Life Sciences and Technologies (LifeTech) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学ウイルス・再生医科学研究所バイオメカニクス分野
<https://www2.infront.kyoto-u.ac.jp/bf05/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------