

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月9日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650110

研究課題名（和文）再生研究・治療のための生体吸収性ハイドロゲル微粒子を含む機能増強細胞集合体の創製

研究課題名（英文）Creation of functional cell aggregates confaining bioabsorbable hydrogel microspheres for regenerative therapy and research

研究代表者

田畑 泰彦（TABATA YASUHIKO）

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371

研究成果の概要（和文）：細胞親和性の高いゼラチンハイドロゲル微粒子を内部に含むラット骨髄由来間葉系幹細胞からなる細胞集合体を調製した。ゼラチン微粒子を含むことにより、集合体内部の細胞の酸素、栄養状態がよくなり、微粒子を含まない場合に比べて、集合体内の生細胞数が有意に増加し、骨分化も促進された。

研究成果の概要（英文）：When cultured with gelatin hydrogel microspheres, rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells formed aggregates homogeneously incorporating the microspheres. The viability of the cell aggregates and the extent of osteogenic differentiation were significantly higher compared with those of aggregates formed without microspheres.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,600,000	0	1,600,000
23年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野：総合領域

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：ゼラチン・ハイドロゲル微粒子・骨髄由来間葉系幹細胞・細胞集合体・代謝活性・細胞生存率・L-乳酸産生量・グルコース消費量

1. 研究開始当初の背景

増殖分化能力の高い細胞が利用できるようになり、それらの細胞を用いた細胞生物学の発展とそれにともなう細胞移植治療への期待が高まっている。細胞は本来、お互いの相互作用によってその生物機能を維持、制御している。ところが、これまでの生物医学研

究では、細胞を培養基材としてのプラスチック表面に付着させ、その生物機能の研究が進められている。この状況は細胞にとってきわめて非生理学的であり、より生体環境に近い状態での細胞培養法の開発が望まれている。この解決法として、細胞集合体を用いる培養方法がある。細胞集合体では、細胞同志の社

会が形成されていることから、細胞の周辺環境は、より体内環境に近いと考えられる。しかしながら、細胞集合体の成長とともに、そのサイズが大きくなり、しばしば細胞が死滅、生物機能の低下、培養の継続が不可能となることが問題となっている。この問題点を解決しなければ、体内環境に近い細胞研究は進歩しないと考えられる。

2. 研究の目的

細胞は本来、お互いの相互作用によってその生物機能を維持、制御している。ところが、これまでの生物医学研究では、細胞を培養基材としてのプラスチック表面に付着させ、その生物機能の研究が進められている。この状況は細胞にとってきわめて非生理学的であり、より生体環境に近い状態での細胞培養法の開発が望まれている。この目的のために、これまで、2つの方法が試されている。1つは、基材表面に細胞外マトリクス (ECM) 成分をコーティング、固定化し、細胞周辺環境を改良することである。もう1つは、細胞同志の自己集合化を促し、培養時に細胞社会を形成させる方法である。前者の方法では、ECM成分といえ、やはり人工物であり、細胞にとって必ずしもこちよい体内環境とはいえない。これに対して、細胞集合体では、細胞同志の社会が形成されていることから、細胞の周辺環境は、より体内環境に近いと考えられる。しかしながら、この方法論では、細胞集合体の成長とともに、そのサイズが大きくなり、しばしば細胞が死滅、生物機能の低下、培養の継続が不可能となることが問題となっている。

本研究の目的は、この問題を解決することである。そのために考えた斬新なアイデアは、細胞集合体内部への細胞毒性のない、しかも、細胞増殖因子の供給が可能な数~数十マイクロメートルサイズをもつ生体吸収性ハイドロゲル微粒子を用いることである。ハイドロゲルは内部に水を含んでいるため酸素、栄養の透過性に優れ、細胞集合体内部に均一に分散させることができれば、細胞集合体の内部への栄養、酸素供給の不備と老廃物蓄積により細胞の生物機能が低下、さらには細胞が死滅するという問題を解決することができる。その結果、細胞培養の継続が可能となり、細胞研究が進展すると考えられる。さらに、このハイドロゲル微粒子に細胞増殖因子あるいは細胞分化因子を含ませ作用させることができれば、細胞集合体の細胞機能と細胞分化は有意に改善、増強されることは疑いない。体の最小構成単位は「細胞」であるが、最小機能単位は細胞-細胞間相互作用が形成された「細胞集合体」である。そこで、単独細胞の移植に比べて、細胞集合体の移植ができれば、より優れた細胞移植治療効果が得られ

ると考えられる。本研究は、「細胞集合体移植治療」という新しい治療概念を提案する。細胞集合体を用いた細胞生物医学研究、創薬、再生医療に期待が高まっているにもかかわらず、細胞集合体の培養に対する技術、方法論の研究開発が遅れていることはきわめて大きな学術的、社会的問題である。

われわれは、これまでゼラチンハイドロゲル微粒子を用いた細胞増殖因子の徐放化とゼラチンハイドロゲルの細胞培養基材の検討を行ってきた。これらの研究成果から、ゼラチンハイドロゲルが細胞増殖因子の有効な徐放担体であること、加えて、ハイドロゲルが高い細胞親和性を持ち、細胞基材として有効であることを確認してきた。一方、培養基材の工夫により、細胞集合体の形成が認められたが、集合体内部への栄養、酸素供給の点にさらなる技術改良が必要であることを実験的に確認した。このような一連の研究成果より、数~数十マイクロメートルサイズをもつハイドロゲル微粒子を細胞集合体内部に入れることがその解決法になるのではないかという発想が生まれた。この発想を実現するために必要となる幹細胞の取り扱い、ハイドロゲル微粒子の作製、細胞機能の評価などについては、すでに修得している。本研究は、これまでに得られている研究成果と技術を組み合わせることにより、細胞集合体を用いた細胞生物学と細胞集合体移植による再生医療という新しい研究分野の開拓に向けた萌芽的挑戦であると考えられる。

本研究で提案する技術方法論がうまく機能した場合には、幹細胞を用いた発生生物学、再生現象に関連した細胞生物学に対して有効な革新的な細胞培養手技を与えることになる。発生学、細胞分化研究に対して、細胞相互作用、細胞集合体化が必要不可欠なプロセスであることはわかっているにもかかわらず、それを達成するための組織化培養の有効な手法がない。また、発生や細胞分化についての基礎生物医学の研究成果は、薬の毒性、代謝を細胞で調べる創薬研究、細胞移植に対する再生医療の進歩にも大きく貢献する。このような状況の中で、細胞集合体を形成する技術・方法論が、学術的、社会的にきわめて大きな影響を与えることになる。

3. 研究の方法

本研究で行うことは次の4つである。1) ゼラチンからなる数~数十マイクロメートルサイズをもつ生体吸収性ハイドロゲル微粒子を作製する。その生体吸収性とサイズを制御する。2) 細胞非付着性基材上で組織幹細胞をゼラチンハイドロゲル微粒子と培養、微粒子を含む細胞集合体を調製する。その細胞集合体の生物機能と骨、軟骨分化能を評価する。3) 組織欠損モデル動物を用いた細胞集

合体による生体組織の再生誘導治療効果を評価する。4) 細胞増殖因子を含むハイドロゲル微粒子を用いて、2) 3) と同様の評価を行う。いずれの研究項目も、お互いに連携してフィードバックしながら、生体吸収性ハイドロゲル微粒子を利用した高い細胞機能細胞集合体の形成を達成する。

1) ゼラチンをグルタルアルデヒド、あるいは熱脱水処理にて化学架橋を行うことで、数〜数十マイクロメートルサイズをもつゼラチンハイドロゲル微粒子を作製する。微粒子作製とゼラチンの架橋条件を変化させることによってサイズと生体吸収性の異なるゼラチンハイドロゲル微粒子を作製する。

2) ラット骨髄より骨髄由来間葉系幹細胞を単離、増殖させる。この幹細胞を細胞非付着性の、例えば、ポリビニルアルコールコーティング培養基材上で培養することによって、細胞集合体を形成させる。この際、ハイドロゲル微粒子を共培養させ、微粒子が均一に分散、含まれている細胞集合体を作製する。細胞集合体の生物機能および骨、軟骨への分化能を評価する。生物機能としては、細胞の生存率や増殖率、細胞からの細胞外マトリクス（コラーゲン、ムコ多糖など）の分泌能などを調べる。骨、軟骨への分化については以下のように評価する。細胞集合体を通常の分化培地中で培養した後、骨分化では、アルカリホスホターゼ活性、カルシウム沈着、オステオカルシン活性などを、軟骨分化では、硫酸化多糖やコラーゲンタイプIIの分泌と産生などについて、それぞれ生化学的、組織学的に評価する。

3) 用いるゼラチンハイドロゲル微粒子のサイズと生体吸収性を変化させる。得られたハイドロゲル微粒子を用いて、細胞集合体を調製、2) と同じ検討を行う。

4) 異なるゼラチンハイドロゲル微粒子を含む幹細胞集合体を調製する。得られた細胞集合体をラット、ウサギモデルの骨および軟骨欠損部に注入することで、欠損部における骨、軟骨再生修復について評価する。ハイドロゲル微粒子の性質が欠損部再生修復に与える影響について検討する。欠損部での再生修復評価は、再生組織の組織学的観察、および再生組織中における細胞分化マーカーであるアルカリホスホターゼ、オステオカルシン、硫酸化多糖、コラーゲンタイプIIなどを定量することにより行う。

5) ゼラチンハイドロゲル微粒子に塩基性線維芽細胞増殖因子、トランスホーミング増殖因子などを含浸する。得られた細胞増殖因子含浸ハイドロゲル微粒子を含む幹細胞からなる集合体を作製する。それらの細胞集合体の生物機能や分化能について評価する。この際、ハイドロゲル微粒子のサイズおよびその生体吸収性の細胞機能に与える影響につい

ても検討する。

6) 細胞増殖因子含浸ハイドロゲル微粒子からの細胞増殖因子の徐放パターンを調べる。この徐放パターンは微粒子の生体吸収性により制御することができることから、微粒子作製条件を変化させることにより、細胞増殖因子の徐放パターンの異なるゼラチンハイドロゲル微粒子を作製する。これらの微粒子を用いて、5) と同じ検討を行う。細胞増殖因子の徐放パターンが細胞集合体の生物機能や骨軟骨分化に与える効果についても調べる。

4. 研究成果

細胞を利用した創薬研究や再生医療のためには、細胞—細胞間相互作用をもつ細胞集合体の形成とそれを用いた研究が必要不可欠である。しかしながら、細胞集合体の内部への栄養、酸素の供給、老廃物の排泄が悪く、しばしば、細胞が死滅、機能低下し、研究の継続が難しくなることが問題となっている。この解決法として、本研究では、細胞増殖因子の徐放化ができ、しかも細胞親和性の高いゼラチンハイドロゲル微粒子を細胞集合体の内部に組み込むことを行った。ゼラチンを熱脱水架橋することによって、大きさの異なるハイドロゲル微粒子を作製した。これをラット骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) とともにポリビニルアルコールコーティングされた培養皿の上で培養した。その結果、微粒子を含む MSC 集合体が得られた。細胞の好氣的代謝の指標である L-乳酸産生量/グルコース消費量比を測定したところ、微粒子を含む MSC 集合体の値は、微粒子を含まない細胞集合体に比べて、有意に低下した。その値は酸素、栄養状態のよい平面培養した場合の MSC の値と同じレベルであった。このことは、微粒子と含むことにより集合体内部の細胞の酸素、栄養状態のよいことを示している。また、集合体内の生細胞数も微粒子を含ませることにより有意に増加した。加えて、微粒子サイズが集合体内部の細胞状態に影響することもわかった。次に、微粒子を含むあるいは含まない細胞集合体の骨および軟骨分化培養を行った。骨分化をアルカリホスホターゼ活性、軟骨分化を硫酸化多糖分泌で評価した。その結果、微粒子を含む集合体の細胞は、含まない集合体に比べて、アルカリホスホターゼ活性は有意に高く、また逆に硫酸化多糖分泌量は有意に低いことがわかった。この結果は、微粒子を含むことによって、集合体内部の酸素状態がよくなり骨分化が促されたものと考えられた。酸素分化の高い状態は、低い状態に比べて骨分化が高まることが報告されていることから、今回の成果も、これまでの結果が正しいことを示していると考えられた。

微粒子を含む細胞集合体を骨分化させた後に、ラット骨欠損部分に埋入した。コントロールとして同じ数の骨分化させた細胞を集合体を形成させずに用いた。その結果、集合体状態で用いた場合に、有意な骨形成が認められた。

初年度の結果をもとに、2年目は、細胞集合体内に生体吸収性の異なるゼラチン微粒子を含ませ、微粒子の吸収性が集合体内の細胞に与える影響について検討した。細胞としては、ラット骨髄由来の未分化間葉系幹細胞(MSC)を用いた。微粒子の生体吸収性に関係なく、均一に微粒子が分散された細胞集合体が形成された。微粒子を含ませることによって、微粒子のない集合体に比べて、集合体内の細胞の増殖性を有意に高まった。しかしながら、生体吸収性の高い微粒子では、低いものに比較して、微粒子が速く吸収されることから、細胞の増殖性は低くなる傾向があった。細胞の好氣的代謝の指標であるL-乳酸産生量/グルコース消費量比を測定したところ、微粒子を含む細胞集合体の値は、微粒子を含まない細胞集合体に比べて、有意に低下した。その値は酸素、栄養状態のよい平面培養した場合の細胞の値と同じレベルであった。細胞外マトリクスの分泌能や骨分化能を調べたところ、微粒子を含まない細胞集合体に比べて、微粒子を含む細胞集合体では有意に高まることがわかった。

微粒子にbFGFを含浸させた後、リン酸緩衝水溶液(PBS)に投入し、bFGFの徐放性を調べた。微粒子の分解しないPBS中ではbFGFは徐放されず、コラゲナーゼ含浸PBS中では、微粒子の分解とともにbFGFが徐放されることがわかった。bFGF含浸微粒子を含む細胞集合体を形成し、細胞の増殖を調べた。bFGFを含有しない空の微粒子を含む集合体あるいはbFGFを外から細胞集合体に加えた場合に比較して、集合体内部の細胞の増殖性が高まる傾向を示した。微粒子の分解性、すなわちbFGFの徐放性を変えた微粒子を用いて細胞集合体を形成したところ、bFGFの徐放性は細胞の増殖にほとんど影響を与えないことがわかった。

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2件)

- ① Tajima S, Tabata Y. Preparation and functional evaluation of cell aggregates incorporating gelatin microspheres with different degradabilities. J Tissue Eng Regen Med. 査読有 2012 in press 10.1002/term.1469

- ② Hayashi K, Tabata Y. Preparation of stem cell aggregates with gelatin microspheres to enhance biological functions. Acta Biomater. 査読有 7(7) 2011, 2797-2803 10.1016/j.actbio. 2011.04.013

[学会発表] (計7件)

- ① 田島脩平、田畑泰彦. 生体吸収性ゼラチンハイドロゲル粒子を含んだ細胞集合体の作製. 第60回高分子学会. 2011年5月25-27日 大阪
- ② 田島脩平、田畑泰彦. 細胞機能改変を目指した生体吸収性ゼラチン粒子を含む細胞集合体の作製. 第32回日本炎症再生医学会. 2011年6月2-3日 京都
- ③ 田島脩平、田畑泰彦. 生体吸収性ゼラチン粒子を利用した乳腺上皮細胞の培養と集合体形成. 第6回日本バイオマテリアル学会関西若手研究会. 2011年8月12日 大阪
- ④ 田島脩平、田畑泰彦. 生体吸収性ゼラチン粒子を含む乳腺上皮細胞集合体の作製. 第33回日本バイオマテリアル学会. 2011年11月21-22日 京都
- ⑤ 田島脩平、木戸祐一郎、田畑泰彦. 細胞内遺伝子徐放のためのカチオン化ゼラチン/プラスミドDNA複合体の作製. 第26回日本DDS学会. 2010年6月17-18日 大阪
- ⑥ 田島脩平、木戸祐一郎、田畑泰彦. 細胞内遺伝子徐放のためのカチオン化ゼラチン/プラスミドDNA複合体の作製. 第5回日本バイオマテリアル学会関西若手研究会. 2010年8月6日 京都
- ⑦ 田島脩平、田畑泰彦. 生体吸収性ゼラチン粒子を含んだ細胞集合体の作製. 第32回日本バイオマテリアル学会関西若手研究会. 2010年11月29-30日 広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：50211371

(2) 研究分担者

山本 雅哉 (YAMAMOTO MASAYA)
京都大学・再生医科学研究所・准教授
研究者番号：10332735

(3) 連携研究者

()

研究者番号：