

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 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22760073

研究課題名（和文）

異方性力学環境培養技術を利用した間葉系幹細胞による軟骨組織大規模高次構造の再生

研究課題名（英文）

Regeneration of a large-scale and higher-order structural tissue using mesenchymal stem cells under culturing technique of heterogeneous mechanical circumstance

研究代表者

森田 康之 (MORITA YASUYUKI)

名古屋大学・工学研究科・講師

研究者番号：90380534

研究成果の概要（和文）：本研究により、次に示す成果が得られた。一様伸縮の機械的刺激に対して、間葉系幹細胞は、細胞外マトリックスとなるタンパク質の合成量および組織構造化に関して、異なるひずみ依存性を示した。また、ひずみ勾配を有する伸縮刺激に対して、間葉系幹細胞が配向挙動を示す許容限界軸ひずみを簡便かつ高精度で求め、その値は5.1%であった。さらにそれぞれの合成タンパク質の発現量曲線は、伸展率に対し異なる特性を示し、I型コラーゲンの発現は伸展率に対して幅広い応答性を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The following conclusions were obtained in this study. When mesenchymal stem cells (hBMSCs) were subjected to uniform stretching as mechanical stimulation, there was different strain relativity between amounts of protein synthesis, based on the extracellular matrix, and the tissue structuralization. In addition, an allowable limit axial strain of hBMSCs which directly related to the cell alignment behavior, was elucidated simply and precisely using heterogeneous strain stimulation technique. The axial strain value was 5.1% in the tensile stimulation. Furthermore, synthesis curve of respective proteins was strongly dependent upon the stretch ratio. Type I collagen synthesis indicated broadband responsiveness in terms of the stretch ratio.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：バイオメカニクス

科研費の分科・細目：機械工学，機械材料・材料力学

キーワード：間葉系幹細胞，腱細胞・腱組織，細胞外マトリックス，コラーゲンネットワーク，機械的伸縮刺激，細胞配列・配向，ひずみ勾配，許容限界軸ひずみ

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療技術を用いた組織の再生に関して、いくつかの成功例が報告されている（例えば軟骨組織では、Wakitani, S., et al., Osteoarthr Cartilage, 2002, Ochi, M., et al., J Bone Joint Surg Br, 2002）。しかしながら、次に示す点おいての発展が望まれている。

- (1) 大規模高次構造化…今後、組織欠損が大きい領域への移植を実現するためには、大規模な高次構造を有した組織の再生が必要である。
- (2) 機械的性質の向上…in vitro での培養の段階で十分な剛性・強度を有するような能動的培養技術の確立が必要である。

上記の問題点克服のためにこれまでの組織再生は、細胞ソースとして主に分化細胞を使用していた。分化細胞は一般的に増殖能力が低く、*in vitro* の培養下では高度な組織構造化および機械的性質の飛躍的な向上には限界があることが指摘される。

2. 研究の目的

本研究では、次のような特徴により、上記の問題の解決を試みる。

- (1) 間葉系幹細胞の利用 増殖能力の高いこの細胞を細胞ソースとして使用し、目的とする細胞へ分化させた後、機械的伸縮刺激とともに培養を行う。そして、再生組織の基盤となる細胞外マトリックス (ECM) の産生量および構造化に関して検討する。
- (2) 異方性を有した力学的環境培養 実際の生体内と同様の力学的環境に近づけるため、細胞が接着する基盤にひずみ勾配を付与し培養を行う。そして、その不均一力学場に対する、細胞の基本的な挙動 (配向、分化) について検討する。

再生組織のターゲットとしては、研究課題名に記した軟骨組織から、まだ再生が実現されていない腱組織とした。そして、間葉系幹細胞の腱細胞への分化、腱組織に関する ECM の創製・構造化機序の解明のため、以下の二つのことを重点的に行った。

- (1) 一様伸縮の力学的刺激に対する間葉系幹細胞の腱細胞への分化効率、および ECM の産生と構造化に関する研究
- (2) ひずみ勾配を有した伸縮刺激に対する間葉系幹細胞の配向挙動、および腱細胞分化への最適ひずみ値の決定に関する研究

3. 研究の方法

- (1) 一様伸縮の力学的刺激に関する実験

① 伸縮実験

実験にはヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBMSCs) を用いた。フィブロネクチンをコーティングしたシリコンチャンバー (20 × 20 mm²) を伸縮装置で一軸方向に引張ることで幹細胞に繰返し伸縮刺激を付与した。伸縮条件を Table 1 に示す。各条件とも n = 3 である。

Table 1 一様伸縮刺激の実験条件

	Sample1	Sample2	Sample3	Sample4
Frequency	1 Hz			
Elongation	8 %		10 %	
Duration	24 h	48 h	24 h	48 h

- (2) 合成タンパク質の定量評価

マイクロプレートリーダーの吸光度測定により、伸縮後に合成した ECM の発現量を定量化し、各伸縮条件における発現量の違いを比較した。測定は ELISA 法で、

測定対象タンパク質である I 型コラーゲン (Col I) およびテネシシン (Tnc) に対して抗体標識をした。マイクロプレートリーダーの波長は 450 nm である。測定では、ECM として基盤に沈着したタンパク質と、発現したが培地中に溶解したタンパク質と二つに分けて測定を行った。

- (3) 蛍光抗体染色法による構造観察

伸縮後の細胞に対して、合成した Col I および Tnc の構造観察を行った。蛍光抗体を標識することによって Col I, Tnc, 細胞骨格および細胞核を染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察を行った。

- (2) ひずみ勾配を有した伸縮刺激の実験

① 伸縮実験

フィブロネクチンをコーティングしたシリコンチャンバー (32 × 32 mm²) に hBMSCs を播種し、コンフルエント直前になるまで 2 日間培養した。その後、伸縮装置を用いてチャンバーを引張り、細胞に繰返し伸縮刺激を付与した。伸縮装置は、温度 37°C、CO₂ 濃度 5% に設定したインキュベーター内で作動させた。このとき、シリコンチャンバーの上端を固定せず、下端のみに引張り変形を付与させ、ひずみ勾配を有した変形を実現した。伸縮条件を Table 2 に示す。各条件とも n = 5 である。

Table 2 ひずみ勾配伸縮刺激の実験条件

Frequency [Hz]	1						
Elongation [%]	2.0-15.8						
Duration [h]	0	3	6	12	18	24	48

- (2) ひずみ勾配の定量評価

ひずみ勾配を有する伸縮では、チャンバーの各位置におけるひずみ量を把握することが重要である。その定量評価には、デジタル画像相関法を使用した。その解析結果を図 1 に示す。伸展率が滑らかに変換するチャンバー中央部を測定対象領域とした (図 1 の破線部)。その伸展率は 2.0 ~ 15.8% であった。

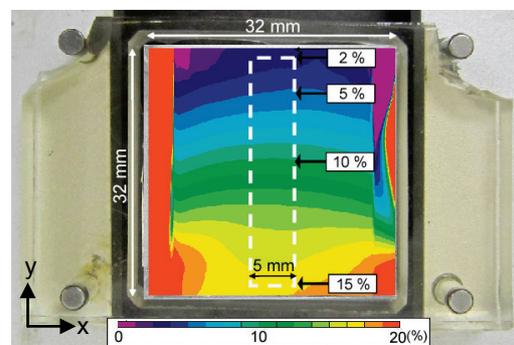


図 1 x 方向の垂直ひずみ ϵ_{xx} 分布

- (3) 細胞の配列角解析

伸縮後の測定対象領域内の細胞を、光学

顕微鏡により観察し、細胞の配列を画像処理により解析した。ここで伸縮方向と細胞を楕円近似した際の長軸のなす角度を配列角 θ と定義した。そして、図1で求めたひずみ分布と合成し、基盤の伸展率と細胞の配列角を対応させた。その際、伸展率2.0~15.8%において、0.5%ごとに細胞分布を正規化し、そのヒストグラムを評価した。

④ 間葉系幹細胞の分化評価

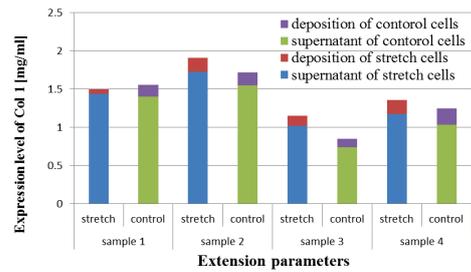
腱細胞が合成する特徴的タンパク質であるCol IとTncを分化マーカーとし、これらの発現を免疫蛍光染色法により確認した。撮影した染色画像において、輝度値は、染色強度すなわちタンパク質の合成量が高いことを意味する。したがって、この輝度値と図1で求めたひずみ分布を合成し、基盤の進展率と細胞の分化能を対応させた。

4. 研究成果

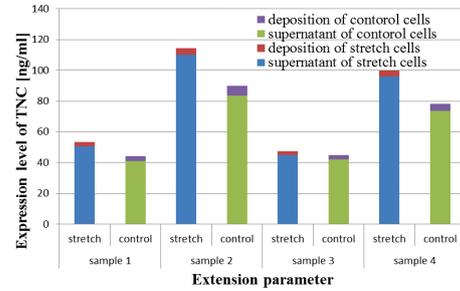
(1) 一様伸縮の力学的刺激に関する実験

各伸縮条件における吸光度測定の結果を図2に示す。(a),(b)はそれぞれ、Col IとTncである。伸縮時間に対して、24hよりも48hにおいて両タンパク質の発現量が高くなった。さらに、8%の伸展率では、10%に比べて、両タンパク質の発現量の増加率が高くなっていた。ここで幹細胞に対して一軸伸縮刺激を付与した場合、細胞の配列角が $60^{\circ}\sim 80^{\circ}$ に配向することが知られている。したがって、同じ伸展率で伸縮を与え続けたとしても、細胞の受ける刺激はその配列角に大きく依存する。すなわち、配列角が大きくなるにつれ、細胞の受ける刺激は小さくなる。本実験における細胞の配列角挙動を図3に示す。(a),(b)はそれぞれ、伸展率8%と10%である。伸展率10%においては、24hの時点で細胞は $60^{\circ}\sim 80^{\circ}$ の方向にほぼ配向しており、それ以降の顕著な変化は見られない。一方、伸展率8%においては、24hの時点での配列角分布は10%のそれより変化が小さく、48hまで緩やかに変化した。このことは、伸展率8%においては、24h後も細胞が相対的に強い刺激を受けるとを意味しており、10%に比べて両タンパク質の合成、すなわちECM発現の増加率が高い結果を示したと考えられる。

図4は、各伸縮条件における蛍光染色の結果である。青、緑、赤、紫色はそれぞれ、細胞核、細胞骨格、Col I、Tncを示す。各条件ともにCol Iの明確な発現が確認できたが、Tncはほとんど確認できなかった。そして図5に、Col Iの蛍光のみを二値化した画像を示す。伸展率8%においてはCol Iの発現量が高いが、二値化画像からそのほとんどが粒状であり、組織化の確認はできなかった。一方、

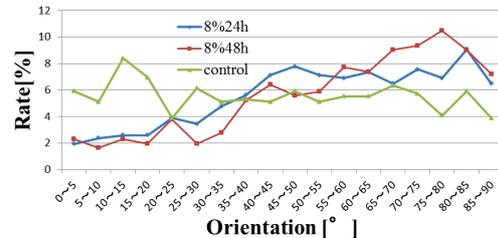


(a) Col I

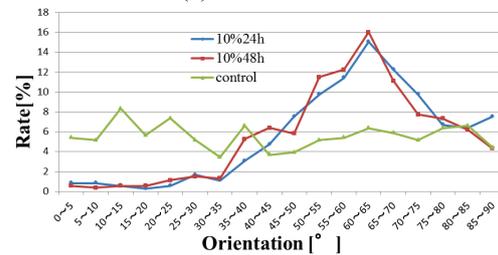


(b) Tnc

図2 各伸縮条件でのタンパク質の合成量



(a) 伸展率 8%



(b) 伸展率 10%

図3 各伸縮条件での細胞の配列角分布

伸展率10%では、発現したCol Iが画像全域に膜状として繋がっており、組織化の一端が観察できる。Table 3は、Col Iの発現量における沈着の占める割合を、各伸縮条件に対して求めた結果である。沈着の占める割合は、10%-48hの条件において最大であった。8%-48hの条件では、総発現量は最大であったが、沈着として存在する割合は10%-48hの半分以下であった。これらの結果から、Col Iの発現量と組織化の間には、異なるひずみ依存性が存在することが示唆される。

本実験結果により得られた成果を以下に示す。

- ① Col Iの発現量と組織構築の間には、異なるひずみ依存性が存在する。

- ② 一様伸縮刺激では、8%-48h の実験条件において ECM の発現量が最大となった。
- ③ 発現した ECM は、基盤に沈着した量に比べて培地中に溶解した量が非常に多く、その傾向は Tnc で特に顕著であった。

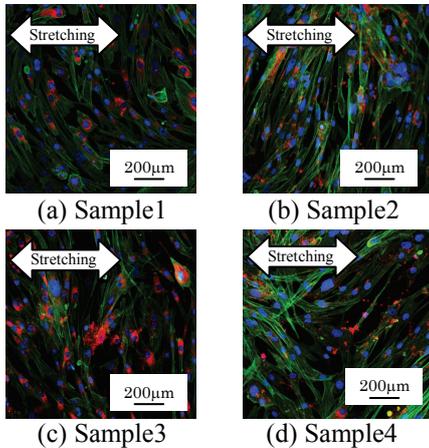


図 4 各伸縮条件での蛍光染色画像

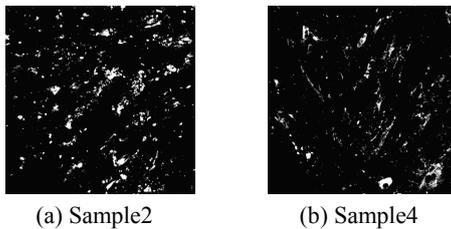


図 5 Sample 2, 4 における Col I の二値化画像

Table 3 各条件での Col I の総発現量に対する沈着量の割合

Extension parameters	8% 24h	8% 48h	10% 24h	10% 48h
Rate [%]	6.6	8.5	7.3	16.3

(2) ひずみ勾配を有した伸縮刺激の実験

一例として、伸縮時間 0, 24, 48h における細胞頻度と伸展率および配列角の関係を図 6 に示す。ここで、縦軸は基盤の伸展率、横軸は配列角である。色相変化が、その伸展率において、その配列角を示した細胞の頻度を意味する。伸縮を加えていない 0h では、伸展率と配列角における細胞の分布に傾向は現れなかった。このとき、理論的な細胞の分布は 5.56% で均等となる。しかし細胞のばらつきにより多少の差が見られた。このばらつきは、標準偏差で 2.10% であった。すなわち細胞頻度の $\pm 2.10\%$ までは誤差と考えることができる。24h, 48h と伸縮時間が増加するにつれ、細胞の分布に傾向が現れ、配列が生じたことを示している。しかし、伸展率が約 5% 以下では、伸縮時間にかかわらず配列挙動を示さず、それ以上の伸展率では伸縮時間に依存して配列が生じた。この結果と Wang ら (J Biomech, 1995) の理論的考察を融合することにより、間葉系幹細胞の許容限界軸ひずみを

求めることが可能となる。その結果、許容限界軸ひずみ $\epsilon_{a \text{ limit}}$ は 5.1% であった。Neidlinger-Wilke ら (J Orthop Res, 2001) も、許容限界軸ひずみについて検討している。実験および細胞種は異なるが、彼らの得た結果は 6.4% (骨芽細胞), 4.2% (線維芽細胞) である。本実験で得られた値は、上記の値と非常に近い値となっており、実験および考察の妥当性を示している。ただし、Neidlinger-Wilke らの行った実験に比べて、本実験手法は簡便で、かつ得られる許容限界軸ひずみ量は高精度で信頼性が高いことは特記に値する。さらに本実験により、Wang らが提唱した細胞の配列挙動に対する仮説を強く支持する結果となった。その仮説を以下に示す。

- ① 細胞配向の原因となるメカニカルシグナルは、細胞の軸ひずみである。
- ② 各種細胞は軸ひずみの閾値 (許容限界軸ひずみ) をもち、その閾値は細胞集団の中で正常に分布する。
- ③ 細胞は軸ひずみが、その閾値を超えるような配列角を避ける。
- ④ 細胞はその閾値以下の軸ひずみを受けると、ランダムな配向性を示す。

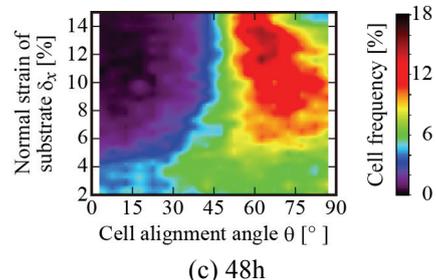
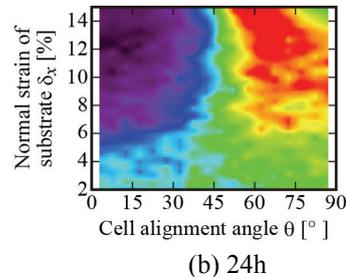
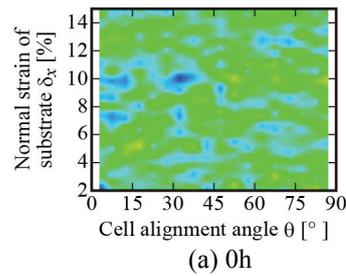


図 6 伸展率と配列角のヒストグラム

次に、伸展率に対するタンパク質の発現量を図 7 に示す。(a), (b) はそれぞれ、Col I と Tnc である。この輝度値が高いほど、腱細胞分化因子を多く合成していることになるため、腱

細胞への分化が進んでいると判断できる。図に示すように、Col I, Tncともに発現量は、伸展率に大きく依存する傾向を示した。発現量曲線がガウス分布と仮定し、各タンパク質の発現量がピークとなる伸展率を求めた。その結果、Col I, Tncでそれぞれ、8.04%と8.16%と近い値を示した。しかし、発現量曲線の半値全幅を比較すると、Col IはTncと比べて、非常に広い伸展率を示していることが観察される。これは、細胞分化因子が伸展率に大きく依存し、伸展率により異なった発現傾向を示すことを意味している。そして、半値全幅の考察より、Col Iのようなほとんどの生体組織に含まれるようなタンパク質に関しては、生体の幅広い力学的環境に適応するため、半値全幅の広い発現傾向を示したことが新に明らかとなった。

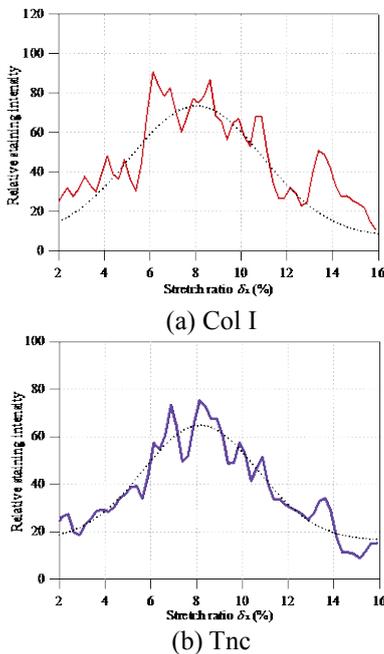


図7 伸展率と合成タンパク質の発現量

本実験結果により得られた成果を以下に示す。

- ① 細胞の伸展率と配列角の関係を定量的かつ高精度で明らかにすることに成功した。
- ② 間葉系幹細胞の許容限界軸ひずみは、引張りひずみに対して5.1%であった。
- ③ Col IとTncの発現量は伸展率に大きく依存し、それぞれ8.04%と8.16%と近い値を示した。
- ④ しかし発現量曲線の半値全幅の評価により、あらゆる生体組織に含まれるCol Iは幅広い伸展率で合成されており、生体の多様な力学的環境に適応した結果であることが示された。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計23件)

- ① Y. Morita, Y. Matsushita, M. Todo, and K. Koyano, Experimental study on displacement and strain distributions of bone model with dental implant, Applied Mechanics and Materials, 査読有, 83, 2011, 73-77, DOI:10.4028/www.scientific.net/AMM.83.73.
- ② 森田康之, デジタル画像相関法による骨セメント型人工股関節を模擬したステム/骨セメント/皮質骨界面周辺の微視的変形挙動計測, 実験力学, 査読有, 11(2), 2011, 107-11, https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjsem/11/2/11_2_107/_pdf.
- ③ Y. Morita, M. Todo, Y. Matsushita, and K. Koyano, Experimental evaluation of strain distribution in alveolar bone model around dental implant determined via DIC, Proc. of KSME 2012 Bio Engineering Division Spring Conference, 査読無, 2011.
- ④ K. Arakawa, T. Furukawa, Y. Morita, M. Uchino, and H. Kaida, Shrinkage analysis of a light-cured composite resin in cavity by X-ray CT images, Journal of JSEM, 査読有, 10(Special Issue), 2010, 229-233.
- ⑤ Y. Morita, Y. Matsushita, M. Todo, and K. Koyano, Deformation measurement of bone model with a dental implant by DIC, Proc. International Workshop on Nano, Bio and Amorphous Materials, 査読無, 2010.

〔学会発表〕(計21件)

- ① Y. Morita, M. Todo, Y. Matsushita, and K. Koyano, Experimental evaluation of strain distribution in alveolar bone model around dental implant determined via DIC, KSME 2012 Bio Engineering Division Spring Conference, 29 Mar 2012, Chonnam National University, Gwangju, Korea.
- ② 渡邊早智, 森田康之, 巨陽, ひずみ勾配を有する伸縮刺激下での幹細胞の培養に関する研究, 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング講演会, 2012年1月7日, 大阪大学.
- ③ Y. Morita, Y. Matsushita, M. Todo, and K. Koyano, Experimental study on displacement and strain distributions of bone model with dental implant, The International Conference on Experimental Mechanics 2010 (ICEM2010), 1 Dec 2010, Kuala Lumpur, Malaysia.
- ④ 森田康之, 鈴木敏, 渡邊早智, 巨陽, 骨髄幹細胞の腱細胞分化および細胞外マトリックス生成に対する伸展刺激の伸展率の影響, 日本実験力学会2011年度年次講演会, 2011年8月31日, 奈良県文化会館.
- ⑤ Y. Morita, Y. Matsushita, M. Todo, and K. Koyano, Deformation measurement of bone

model with a dental implant by DIC,
International Workshop on Nano, Bio and
Amorphous Materials, 10 Aug 2010, Zao,
Miyagi.

[図書] (計 1 件)

- ① Y. Morita, M. Todo, Y. Matsushita, and K.
Koyano, Springer, Interface Oral Health
Science 2011 (ed. by K. Sasaki, O. Suzuki, N.
Takahashi), 2012, 137-139.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 康之 (MORITA YASUYUKI)
名古屋大学・工学研究科・講師
研究者番号：90380534

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし