様　式　C－19、F－19、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 26 年　 6 月　 4 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2013
課題番号：23792273
研究課題名（和文）生体材料と成長因子の相互作用を応用した軟骨細胞無血清培地の開発

研究課題名（英文）The development of a serum-free medium utilizing the interaction between growth factors and biomaterials.

研究代表者
倉林　くみ子（Kurabayashi, Kumiko）

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：40586757

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円、（間接経費）　　960,000円

研究成果の概要（和文）：添加する成長因子の最適化の検討に加えて、本研究のもっとも特徴的な点は、そのアプローチに加えて、血清中や細胞外基質に含まれる、生体内の物質として安全性の高い生体材料を添加し、成長因子と相互作用させる事により、実用的な無血清培地を確立した。
本研究で検討対象となる因子・材料は、血清に含まれる物質であり、これらはすべて上市薬剤として既に臨床導入されているものである。再生医療の臨床応用で要請されることは安全性である。培地添加因子としてこれらの因子・材料を利用することは、安全性を確保する上で非常に有利な選択であり、臨床軟骨再生医療を通じ、国民の健康と福祉に直結する成果をもたらすものと期待される。

研究成果の概要（英文）：To promote clinical application of cartilage tissue engineering, we should establish a serum-free chondrocyte growth medium. We examined the combinations of growth factors and the methods to enhance their effects by making use of the interaction with biomaterials. From various growth factors that are contained within the serum, we made the cocktail of FGF-2 , insulin, EGF, PDGF and TGF-b, Moreover, we used the biomaterials including albumin and hyaluronan as the carrier of those factors. By direct mixing of those factors with biomaterials before the administration to the medium, the medium containing those mixture showed the chondrocyte growth of approximately a 25-fold increase by day 10.
Due to the optimal usage of biomaterials, this serum-free medium will realize a constant harvest of chondrocytes and could contribute to the safety and quality in regenerative medicine.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：無血清培地　軟骨細胞　成長因子　ヒアルロン酸　生体材料

１．研究開始当初の背景

再生軟骨の移植は、関節軟骨の修復など、近年、欧米を中心に最も臨床応用が進んでいる再生医療の１つである。申請者が所属する研究室では、唇裂鼻変形に使用する目的で世界に先駆けて鼻用インプラント型再生軟骨の開発を進めており、臨床応用も間近である。力学的強度を有し、三次元形態を付与可能なインプラント型の再生軟骨が実現すれば、その適応は顎顔面領域ばかりでなく、四肢骨の軟骨再建にまで大きく広がる。再生軟骨作製においては、品質や効果が安定している培養液を用いて大量の軟骨細胞を確実に増殖させることが、まず第１に要求される。現在、申請者が所属している研究室では、5%ヒト血清及び FGF-2 100 ng/mL、insulin 5 μg/mL の組み合わせで増殖培地（HFI 培地）を開発して使用しており､7 日間で 10 倍の顕著な相乗効果を認めている（Takahashi et al Cell Transplant. 2005)。しかし、自己血清を添加する培養方法では、血清採取量の限界から、培養できる枚数や日数が限られ、再生軟骨の組織量に限界がある。また、自己血清は、その活性や細胞培養特性に、製品間・ロット間での差が大きく、薬事承認における規格化や品質保証の点で大きな障害となる。こうした問題を克服するため、自己血清に頼らない安全で安定した増殖促進を実現する増殖培地の確立が、喫緊の課題である。
近年、細胞増殖培養に関しては、無血清培地を確立するため、添加生理活性物質の研究が進んでいる。軟骨細胞に関しては、insulin/FGF-2 添加培地 (Mandl et al Matrix Biol 2004)や、耳介軟骨細胞を insulin/FGF-2/EGF/PDGF 添加培地 (Giannoni et al Osteoarthritis Cartilage 2005）などが報告されているが、1 週間で 2 倍前後の増殖しか示さず、実用的な増殖培地に必要な条件を満たすことが難しいのが現状であった。

２．研究の目的

申請者らは、唇裂鼻変形に使用する鼻用インプラント型再生軟骨の開発を進めており、臨床応用も間近である。しかし、現段階では自己血清を用いて培養しているため、血清採取量の限界のために再生できる軟骨組織の量に限界がある。また、自己血清は活性や細胞培養特性において製品間・ロット間での差が大きく、品質管理の点で問題がある。そのため、自己血清を用いない安全で安定した増殖促進を実現する増殖培地の確立が、解決すべき喫緊の課題である。
本研究では、軟骨細胞増殖培地への添加する成長因子や生体材料、ならびにその添加方法などを詳細に検討することにより、十分な増殖効果を示す軟骨細胞無血清培地システムを構築することを目的とする。

３．研究の方法

成長因子に関しては、ヒト血清中には EGF(200 pg/mL)、PDGF(12.5 ng/mL)、VEGF(400 pg/mL)、TGFβ(100 pg/mL)などが含まれていることが報告されている［Tanaka et al Cell Biolo Int 2008］。これらの成長因子を単独あるいは組み合わせで培地中に添加して、血清の代替としてヒト耳介軟骨細胞の細胞増殖を促進するか否かを検討する。ヒト耳介軟骨細胞を血清存在下で 2 日間培養して細胞を接着させた後、血清飢餓状態にして細胞周期の同調化し、各種成長因子の組み合わせを添加した培地にて 7 日間培養し細胞数測定する。EGF (10 pg/mL)、PDGF (625 pg/mL)、VEGF (20 pg/mL)、TGFβ (5 pg/mL)のカクテルを標準として、その希釈濃度系列、さらにその組み合わせで細胞増殖を検討し、最適化を図る。次いで、成長因子以外の血清に含まれる脂質あるいはタンパクなどの有機成分を検討する。血清中には、L-グルタミン 、レチノイン酸、トランスフェリンなどが含まれており、これらは細胞増殖に対して促進的に作用することが知られている。成長因子に加えて、これらの因子を各種濃度で添加し、ヒト耳介軟骨細胞の細胞増殖を検討する。さらに、血清や細胞外基質に含まれる蛋白、糖で、成長因子を安定化又は活性化させる役割を有する各種生体材料の併用を検討する。具体的には、ヒアルロン酸、コラーゲン、ヘパリン、アルブミンの生体材料を培養液に添加することにより、生体材料-タンパクの相互作用を介した増殖因子の安定化・活性化と、それによる増殖効果の増強に期待できるのではないかと考える。これらの生体材料を単独、あるいは組み合わせを上記に添加し、ヒト耳介軟骨細胞の細胞増殖を促進することを試みる。先行文献を参考にそれぞれの生体材料の血中濃度を再現する濃度を中心に設定し、至的濃度を検証する。１項で検討した成長因子と生体材料は、生体内で相互作用をすることが知られている（Silva et al Biochim Biophys Acta 2009)。したがって申請者も、細胞培養の培地において成長因子と生体材

料とが相互作用をおこすことにより、成長因子が安定化し、成長因子の増殖能を促進すると考える。そのため、成長因子と生体材料の相互作用を促進するため、1 項にて検討した添加因子の混和方法をより詳細に検討する。添加するタイミングや混和方法による細胞増殖効果への影響の有無について評価し、より効率的な細胞増殖を目指す。

また 2 項の結果にもとづき、各因子と材料の細胞増殖効果への相互作用の分子メカニズムを解析する。増殖因子と生体材料と直接混和せず十分に相互作用をさせない方法および、十分に混和し相互作用させる方法での細胞増殖効果を比較する。具体的には上記両群において、各成長因子の半減期の ELISA 等を用いて測定するとともに、Western blotting を用いて細胞増殖シグナル（ERK, AKT, P38, SMADs など）の活性化について、経時的に測定する。

さらに耳介軟骨細胞の他に、鼻中核軟骨細胞、アストロノーマ、気管上皮細胞、ケラチノサイト、iPS 細胞、などについて、無血清培地にて培養した際の経時時的な細胞増殖曲線を作成する。各種細胞を無血清培地にて 7 日間培養後、ヌクレオカウンターを用いて細胞数を評価する。

無血清培地にてヒト耳介由来軟骨細胞を第 3 継代まで培養後、高密度(10^8 cells/ml)で 1%アテロペプチドコラーゲンに包埋し、ペレット型軟骨細胞の遺伝子発現および蛋白蓄積量を評価する。Insulin、T3 と BMP-2 を含む再分化誘導培地により、1 週間培養後、I 型コラーゲンおよび II 型コラーゲンの発現を real time RT-PCR にて測定する。また 3 週間培養後、I 型コラーゲン、II 型コラーゲン、GAG 蓄積量を ELISA や比色定量法を用いて測定する。さらに、無血清培地で増殖培養した軟骨細胞を PLLA 足場素材に播種し、再生軟骨組織の作製し、ヌードマウスへ移植する。移植後 2 週、2 ヶ月、6 ヶ月で再生軟骨を回収し、再生組織内の形状評価、組織学的・生化学的解析を行う。

４．研究成果

従来の無血清培地の開発は、添加する成長因子の最適化を検討するものであったが、本研究のもっとも特徴的な点は、そのアプローチに加えて、血清中や細胞外基質に含まれる、生体内の物質として安全性の高い有機成分や生体材料を添加し、成長因子と相互作用させる事により、その増殖効果の最大限に引き出し、実用的な無血清培地を確立することである。

元来、血液中の成長因子は、一般にアルブミンなどのタンパク担体と結合しているのに対し、培養液中の成長因子は遊離状態で存在していることが多く、培養ディッシュなどの壁面に容易に吸着されてしまう他、細胞表面にリガンドした後にも容易に脱離しやすく、増殖シグナル伝達を持続できない。したがって申請者は、増殖シグナルを増強し、その効果を維持することが細胞増殖用培地では重要であると考え、成長因子を生体材料に結合させ徐放化させることにより、持続的な作用を促すことが可能となった。生体材料を導入し、また、成長因子が高濃度のうちに十分に混和し、相互作用させることにより、成長因子を安定化させ、かつ効果を増強し、細胞増殖を効率的に促進した。

本研究で検討対象となる因子・材料は、血清に含まれる物質であり、幸いこれらはすべて上市薬剤として既に臨床導入されているものである。再生医療の臨床応用で要請されることは安全性である。培地添加因子としてこれらの因子・材料を利用することは、安全性を確保する上で非常に有利な選択であり、臨床軟骨再生医療を通じ、国民の健康と福祉に直結する成果をもたらすものと期待される。

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.Iwata K, Asawa Y, Nishizawa S, Mori Y, Nagata S, Takato T, Hoshi K.
The development of a serum-free medium utilizing the interaction between growth factors and biomaterials.
Biomaterials. 33(2):444-54 2012

2. Liu G, Iwata K, Asawara T, Watanabe J, Fukazawa K, Ishihara K, Asawa Y, Fujihara Y, Chung UL, Moro T, Takatori Y, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Hoshi K.
Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coated plates. J Biomed Mater Res A. 15;92(4):1273-82 2010

3. Iwata K, Asawa Y, Fujihara Y, Tanaka Y, Nishizawa S, Nakagawa T, Nagata S, Takato T, Hoshi K.The effects of rapid- or intermediate-acting insulin on the proliferation and differentiation of cultured chondrocytes. Curr Aging Sci.3,26-33 2010
*Iwata K は倉林くみ子の旧姓。

〔学会発表〕（計 7 件）
1．倉林くみ子、浅輪幸世、宇波和美、松川紗耶、星和人、高戸毅「軟骨細胞無血清増殖培地の開発と各種細胞への有用性の検討」
第 12 回日本再生医療学会総会 2013 年 3 月

2．末永英之、杉山円、倉林くみ子、阿部雅修、安部貴大、瀬戸一郎、西條英人、小笠原徹、森良之、高戸毅「インテグラルビデオグラフィを用いた歯の三次元拡張現実感表示」
第 65 回日本口腔科学会総会 2011 年 4 月

3．岩田くみ子、星和人、藤原夕子、森良之、高戸毅「成長因子と生体材料の相互作用を活用した軟骨細胞無血清培地の開発」
第 64 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2010 年 6 月

4．高鍋雄亮、古賀陽子、西條英人、菅野勇樹、倉林くみ子、齋藤健太郎、近津大地、米原啓之、森 良之、高戸毅「再発およびリンパ節転移を繰り返した腺房細胞癌の長期経過観察の一例」
第 189 回日本口腔外科学会関東地方会 2010 年 6 月

5．藤原夕子、岩田くみ子、小笠原徹、高戸毅、星和人、小笠原徹、高戸毅、星和人「軟骨再生過程で軟骨細胞に発現する Fas ligand の機能解析」
第 9 回日本再生医療学会総会　2010 年 3 月

6．岩田くみ子、浅輪幸世、藤原夕子、西澤悟、高戸毅、星和人「軟骨再生医療の細胞培養におけるインスリン製剤導入の検討」
第 28 回日本運動器移植・再生医学研究会 2009 年 11 月

7．藤原夕子、西澤悟、岩田くみ子、柯政全、藤川由美子、高戸毅、星和人　「再生軟骨組織における免疫特権因子の発現検討」
第 8 回日本再生医療学会総会 2009 年 3 月

8. Kazuto Hoshi, Yuko Fujihara, Satoru Nishizawa, Yukiyo Asawa, Sanshiro Kanazawa, Makoto Watanabe, Tomoaki Sakamoto, Ryoko Inaki, Misaki Takei, Mariko Matsuyama, Sakura Uto, Kumiko Kurabayashi, Toru Ogasawara,* Satoru Nagata, Tsuyoshi Takato: "Development of implant-type tissue-engineered cartilage applied for the nasal correction of the cleft lip and palate patients" 9th European Craniofacial Congress. (20110914-17). Salzburg, Austria

9. K. Hoshi, Y. Fujihara, S. Nishizawa, Y. Asawa, S. Kanazawa, M. Watanabe, T. Sakamoto, R. Inaki, M. Takei, M. Matsuyama, S. Uto, K. Kurabayashi, M, Harai, T. Ogasawara, S. Nagata, T. Takato: "DEVELOPMENT OF IMPLANT-TYPE TISSUE-ENGINEERED CARTILAGE APPLIED FOR THE CORRECTION OF THE CLEFT LIP-NOSE PATIENTS" TERMIS-AP 2011. (20110803-05). Singapore

〔図書〕（計 0 件）

〔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

６．研究組織
(1)研究代表者
倉林 くみ子（KURABAYASHI KUMIKO）
東京大学・医学部・附属病院・特任臨床医
研究者番号：40586757

(2)研究分担者
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：