

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390443

研究課題名(和文) 生体活性を制御する足場の気孔分布と表面硬度に関する硬組織再生医工学的研究

研究課題名(英文) Developments of scaffolds and processing technology to maximize the osteogenic potential of cultured periosteal sheets

研究代表者

川瀬 知之 (Kawase, Tomoyuki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90191999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織再生用足場の理想的立体構造や硬度を明らかにして、合成高分子素材を用いてそれを具現化することを目標とした。培養骨膜細胞はintegrin $\alpha 1$ とCD44を主たる接着因子としているが、培養条件によって接着様式を変化させた。大気圧プラズマ処理したチタン表面では、接着班を形成する接着様式から細胞全体で接着する様式に変化するとともに、骨芽細胞への分化過程にある細胞に対して相乗的な効果をもたらした。培地に関しては、FBSの代替として、ヒト多血小板フィブリン抽出物が有望であった。足場については、ポリカプロラクトンと水酸アパタイトの複合多孔質を試作し、硬度や立体構造の点から目標に近い形にできた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to demonstrate ideal structure and stiffness of scaffolds for osteogenic cells and to develop ideal scaffolds with biodegradable polymer materials. Under regular culture conditions, human periosteal cells (PC) expressed integrin $\alpha 1$ and CD44 as major adhesion molecules. Atmospheric plasma treatment modified the titanium surface and facilitated their osteoblastic differentiation. We also found that human platelet-rich fibrin (PRF) extract can be substituted for FBS. As for scaffolding materials, we developed a combinational porous membrane made of polycaprolactone and hydroxyapatite and found its stiffness and microstructure appropriate for PCs.

研究分野：再生医工学

キーワード：人工高分子 スキャホールド 組織工学 骨組織再生 生体活性

1. 研究開始当初の背景

組織工学の3要素として、細胞と増殖因子と足場のマッチングの重要性が指摘されるようになってから久しい。また、この10年間に限ってみれば、特に足場を含む生体材料の表面修飾とそれがもつ生物学的意義の解明が著しく進歩した。ごく最近、足場の硬度が細胞活性に及ぼす影響について興味深い知見が報告され(Nature Mater 9:518;2010)、新たな研究の展開が期待される状況になってきた。硬組織再生において合成高分子製基材の使用に関しては賛否両論あるものの、製造法の改良により性能を改良し最適化することが可能であるとする研究者も多い。

2. 研究の目的

骨膜細胞や歯根膜細胞を対象とした再生医療用足場の理想的立体構造や硬度を明らかにするとともに、合成高分子を素材として臨床使用に耐えられる足場を開発する。

3. 研究の方法

研究代表者である川瀬は、研究組織の総括と研究立案とデータの検討において中心的な役割を果たす。そのほか、培養実験と組織学的・生化学的評価を担当する。

足場の開発については、研究分担者である田中と大学院生1名が担当し試作する。また、機械的強度や微細構造の評価も担当する。遺伝子解析は分担者の永田と大学院生2名が、動物実験と病理組織学的評価は分担者の奥田と大学院生1名が担当する。

(1) 平成24年度

基材の開発と機械的・化学的性状解析

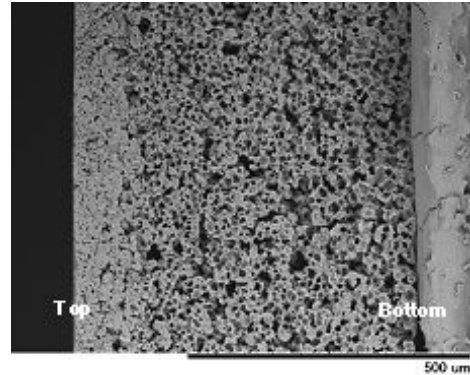
a) 基本的デザイン

基本的に重要なポイントは、細胞がそこに接着し、増殖し、移動することがやりやすい構造であることである。栄養分の供給と細胞代謝物の排泄が効率よく行える連通性の高い構造である必要もある。硬めの材質を使用して、気孔径や気孔分布や気孔率を最適化させた構造が必要となる。

b) ポリマー素材の選択と造形

多孔質材料は主に相分離法を用いて作製する。PLLA, PCLなどの生分解性高分子およびこれらのポリマーブレンドを有機溶媒に溶解し、鋳型に流し込んだ後、乾燥や急冷により、多孔質材料を作製する。溶液中の高分子濃度、冷却速度により、気孔径や気孔分布を制御可能である。

下の写真は現在検討中の多孔質膜試作品の断面を示している。



c) 機械的・化学的試験

機械的・化学的性状は、引っ張り試験、圧縮試験、接触角試験、加水分解加速試験とSEMによる表面形状の観察を中心とせずめる。

in vitroでの培養細胞の応答性の解析を通した試料のスクリーニング

a) 足場に求める基本的要件

まず重要なことは、骨膜の初期付着と細胞遊走である。これらの基準を満たす試料を以下の検討に供する。

b) 骨膜・歯根膜の採取と培養

ヒト骨膜については、歯学部倫理委員会で承認された実験計画に基づいて、書面による説明と同意のもとに健康なドナーから採取した骨膜を細分化してから explant culture により骨膜シートを作製する。さらに、酵素的に細胞を分散させ継代培養する。

分散した細胞はそのままの集団で使用するか、あるいは幹細胞マーカーといわれる CD73, CD90, CD105 のほか、CD34, CD146, STRO-1 などの細胞表面抗原を指標として、磁気ビーズで分画化しフローサイトメーターでの確認のうえ、以下の実験に供する。

in vitroでの評価基準

細胞の初期接着、細胞の深部気孔への移動・侵入と増殖、細胞のアルカリホスファターゼ活性ほか骨芽細胞分化マーカーの発現を指標として評価する。

初期接着に優れた足場は細胞遊走を促す。深部気孔へ細胞を誘導できる足場は細胞外基質の産生活性が高いことが多く、分化誘導によって骨形成活性を亢進させる傾向であ

る。初期の検証を経て、有望なものについて、DNA microarray を用いた mRNA 発現を網羅的に解析する。

播種については、コラーゲンやヒアルロン酸を適量加えて粘性を持たせた細胞懸濁液を作製し、弱減圧下、深部気孔にまで送達し回転培養器により培養する。

(2) 平成 25 年度以降

前年度の基材試作と in vitro スクリーニングの継続

前年度からの基材試作と in vitro のスクリーニングを継続しておこなうとともに、有望な試作品については、以下の in vivo の実験に進む。

in vivo での生物材料と複合化した足場の性能評価

- a) 動物への移植実験をおこなう。培養したヒト骨膜シートを足場とともにヌードマウスの背部皮下に移植する。組織学的に確認することは、短期的には異物反応と炎症反応の有無である。足場に由来した異物巨細胞の出現や類上皮の形成は認められるべきではない。中長期的には、足場の分解と吸収である。
- b) 培養骨膜シートとしての機能向上については、石灰化や類骨の形成を同じく組織学的に評価する。パラフィンあるいは凍結切片による HE 染色、von Kossa 染色、ALP 免疫染色、ヒトミトコンドリア免疫染色(移植細胞の寿命をモニター)とともに、テトラサイクリン・カルセイン投与からピラヌエバ染色を施したサンプルの非脱灰樹脂切片においても検討し、足場の性能評価とする。
- c) μ CT および移植したヌードマウスを生きたまま内部を可視化できる in vivo NIR (near-infrared) imaging 技術によって、非侵襲的に移植した複合体の骨形成活性を可視化・定量化する。

理想的足場の具体化

設計段階でバリエーションを持たせた足場について、細胞の応答性を指標として、最適な物性と構造を明らかにする。また、

その足場を形として試作する。

各年度を通して、研究成果は国内外の学会で発表するとともに査読のある国際誌に論文として投稿する。開発した足場の知的財産権確保のためには、特許出願もおこなう。

4. 研究成果

(1) 基材の開発と機械的・化学的性状解析

生分解性高分子であるポリカプロラクトンおよび骨の無機成分であるヒドロキシアパタイトの複合多孔質基材の作製条件を検討した。ポリカプロラクトン溶液にヒドロキシアパタイト粒子(生体材料研究用, $0.3 \times 1.3 \mu\text{m}$)を懸濁したものをシャーレにキャスト後、溶媒を蒸発させることにより、基材を作製した。溶媒の種類(クロロホルム、アセトン)、ポリマー濃度、ヒドロキシアパタイトの含有率、溶媒の乾燥速度を調節することにより、多孔質の基材を作製することに成功した。引張試験により機械的特性を測定し、走査型電子顕微鏡を用いてヒドロキシアパタイトが複合されていることと基材表面に $10 \mu\text{m}$ 程度の孔を形成し、内部も多孔質であることを確認した。この基材に骨芽細胞様細胞 Saos-2 を播種したところ、基材表面に付着して増殖することが示された。

(2) in vitro での培養細胞の応答性の解析を通した試料のスクリーニング

スクリーニングのための基盤技術の確立に主眼を置いて以下の研究成果を得た。光透過性の乏しい基材における少数の細胞の応答性解析

1cm^2 の培養面積をもつチタン板をサンプルとして、そこにヒト骨芽細胞前駆細胞を培養した。コントロールの未処理チタン板に対して、大気圧プラズマ処理したチタン板の細胞親和性を比較した。プラズマ処理チタン板上では、骨芽細胞はより短時間に、より広い面積で接着する様子が観察されたが、その際に細胞骨格であるアクチン線維の形成はコントロールに比べて顕著に劣っていることが判明した。

細胞接着とそれに伴う細胞骨格と接着班の形成は、細胞の増殖分化に大きな影響を与えられている。細胞増殖については、プラズマ処理したチタン板上での増殖の方が活発であった。一方、細胞分化および成熟化については、コントロールと有意な差は認められなかった。しかし、細胞に骨芽細胞誘導をかけた状態で比較すると、プラズマ処理した

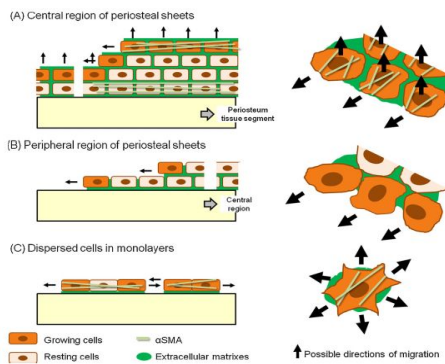
チタン板上で培養した場合、骨芽細胞マーカーである CoI 1A1, RUNX2, ALP などの mRNA 発現が顕著に亢進することを明らかにした。

したがって、 10^4 個程度の少数の細胞を用いて基材のスクリーニングをする場合、蛍光色素による形態的な観察評価と RT-PCR による遺伝子発現の評価が有効であることを明らかにした。

基材の表面硬度と細胞の表面硬度の相関性の解析

実験系は、プラスチック培養皿と重層化した骨膜細胞シートを基材と見立てて比較し、それぞれの培養条件における細胞表面の硬さ(細胞骨格の形成程度)を評価した。その結果、プラスチック培養皿と重層化細胞シートはそれぞれ 1.7GPa と 3.5-5.5kPa であった。対照として用いた単層培養細胞シートの硬さは 10kPa であった。

以上の結果から、骨膜細胞の場合、下の図に示した通り、より硬い基材表面では細胞骨格であるアクチンの重合が促進され、細胞運動が活発になっていることが示唆された。



細胞の運動活性を指標とした細胞応答解析

in vitro で組織再生能を評価する方法として scratch assay という方法がある。time-lapse imaging 技術により細胞の動態をトラッキングすることで、より定量性の高い評価法とすることを目指した。

倒立顕微鏡に CO₂ ステージチャンバーを設置して、恒温恒湿状態でプラスチックディッシュ上に培養したヒト血管内皮細胞を実験系確立のためのモデルとして、多血小板血漿 (PRP) に対する応答性を観察した。なお、光不透過性基材上での培養を想定して、細胞は蛍光色素で標識した。PRP (0.3%) を投与した群の細胞は、有意に運動活性が亢進した。さらに、投与後 3 時間程度までの初期の活性

化とそれに続く不活性化状態から構成されていることを明らかにできた。

基材を用いた培養工程が細胞の品質に及ぼす影響の評価法の開発

骨膜シートの細胞重層化程度によって、接着因子の発現に変化が見られたが、骨膜シートの形態的变化や培養条件にかかわらず、integrin $\alpha 1 \beta 1$ と CD44 が主要な接着因子となっていることを明らかにした。

これらの結果から、細胞接着因子を評価することで、骨膜シートの品質、とくに有効性を評価できる基盤ができた。

(3) in vivoでの生物材料と複合化した足場の性能評価

熱圧延 PRF 膜の有用性の検討

Platelet-rich fibrin (PRF) は、膜として使用する場合、生体内では 1 週間程度で分解されることを念頭に置かなければならない。生分解性を制御するために、加熱圧延 (90 °C, 5-10 秒) という方法で架橋構造を強化する方法を考え、その分解性を in vitro および in vivo で検討した。

in vitro の plasmin を用いた加速試験では、未処理 PRF 膜が 3-4 日で粉々に分解されてしまうのに対して、加熱圧延処理した PRF 膜は 10 日を経ても分解されなかった。in vivo のマウス背部皮下埋植試験では、未処理サンプルが 1 週間程度で活発な細胞浸潤により分解されてしまうのに対して、処理サンプルは分解がゆっくり進行するものの 4 週間にわたって存在が確認された。また、特筆すべきは、処理サンプルに対する組織親和性は良好であり、周辺細胞にコラーゲン産生と創傷治癒を促進すること効果があることであった。

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 24 件)(査読有 24 件)

- 1) Kawase T, Tanaka T, Okuda K, Tsuchimochi M, Oda M, Hara T. Quantitative single-cell motility analysis of platelet-rich plasma-treated endothelial cells in vitro. Cytoskeleton 72(5):246-255; 2015.
- 2) Minbu H, Ochiaki A, Kawase T, Taniguchi M, LLOYD DR, Tanaka T. Preparation of poly(L-lactic acid) microfiltration membranes by

- nonsolvent-induced phase separation method with the aid of surfactants. *J Membr Sci* 479:85-94; 2015.
- 3) Kawase T, Kamiya M, Hayama K, Nagata M, Okuda K, Yoshie H, Burns DM, Tsuchimochi M, Nakata K. X-ray and UVC irradiation-induced -H2AX and p53 formation in normal human periosteal cells in vitro: Markers for quality control in cell therapy. *Cytotherapy* 17(1):112-23; 2015.
 - 4) Kawase T, Kamiya M, Kobayashi M, Tanaka T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. *J Biomed Mater Res B* 103B:825-831; 2015.
 - 5) Kawase T, Uematsu K, Kamiya M, Nagata M, Okuda K, Burns DM, Nakata K, Yoshie H. Real-time quantitative PCR and flow-cytometric analyses of cell adhesion molecules expressed in human cell-multilayered periosteal sheets in vitro. *Cytotherapy* 16:653-661; 2014.
 - 6) Kawase T, Tanaka T, Minbu H, Kamiya M, Oda M, Hara T. An atmospheric-pressure plasma-treated titanium surface potentially supports initial cell adhesion, growth and differentiation of cultured human prenatal-derived osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res B* 102(6):1289-1296; 2014.
 - 7) Uematsu K, Nagata M, Kawase T, Suzuki K, Takagi R. Application of stem cell media to explant culture of human periosteum: an optimal approach for preparing osteogenic cell material. *J Tissue Eng* 4(1):1-12; 2014.
 - 8) Horimizu M, Kawase T, Tanaka T, Okuda K, Nagata M, Burns DM, Yoshie H. Biomechanical evaluation by AFM of cultured human cell-multilayered periosteal sheets. *Micron* 48:1-10; 2013.
 - 9) Kouya T, Tada S, Minbu H, Nakajima Y, Horimizu M, Kawase T, Lloyd DR, Tanaka T. Microporous membranes of PLLA/PCL blends for periosteal tissue scaffold. *Mater Lett* 95:103-106; 2013.
 - 10) Okuda K, Kawase T, Nagata M, Yamamiya K, Nakata K, Wolff, LF, Yoshie H. Tissue engineered cultured periosteum sheet application to treat infrabony defects: case series and 5-year results. *Int J Periodont Rest Dent* 33(3):281-287; 2013. ほか
- 〔学会発表〕(計 63 件)
- 1) Komatsu K, Umemoto S, Minbu H, Kawase T, Tanaka T. Stretching processing of hydroxyapatite/poly(ε-caprolactone) composite scaffolds. 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Hawaii Convention Center, 2015 年 12 月 18 日. Honolulu, Hawaii, USA)
 - 2) Kawase T, Tanaka T, Okuda K, Tsuchimochi M, Oda M, Hara T. Quantitative single-cell motility analysis of platelet-rich plasma-treated endothelial cells in vitro. 7th WACBE World Congress on Bioengineering (National University of Singapore, Singapore, 2015 年 7 月 7 日)
 - 3) Kawase T, Kamiya M, Kobayashi M, Tanaka T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. The platelet-rich fibrin barrier membrane applicable to GTR treatment: Regulation of its biodegradability by heat-compression. 7th World Congress on Preventive and Regenerative Medicine (Chientan Youth Activity Center, Taipei, Taiwan, 2014 年 11 月 7 日)
 - 4) Umemoto S, Komatsu K, Minbu H, Kawase T, Tanaka T. Preparation of hydroxyapatite/poly(ε-caprolactone) composite microporous membranes for scaffolds. The 10th International Congress on Membranes and Membrane Processes (ICOM2014) (Suzhou, China, 2014 年 7 月 25 日)
 - 5) Kawase T, Tanaka T, Minbu H, Kamiya M, Oda M, Hara T. An atmospheric-pressure plasma-treated titanium surface potentially supports initial cell adhesion, growth and differentiation of cultured human prenatal-derived osteoblastic cells. Termis EU 2014 (Genova, Italy, 2014 年 6 月 10 日, Magazzini del Cotone Conference Center)
 - 6) Kawase T, Okuda K, Nagata M, Burns DM, Nakata K, Yoshie H. The unique structure-function relationship found in osteogenic periosteal sheets.

Termis EU 2014 (Genova, Italy, 2014年6月10日, Magazzini del Cotone Conference Center)

- 7) Kawase T, Uematsu K, Nagata M, Okuda K, Burns DM, Yoshie H. Biological and biomechanical characterization of highly self-multilayered human periosteal sheets as an osteogenic grafting material. The 19th Annual International Society of Cell Therapy (ISCT) Meeting (Auckland, New Zealand, 2013年4月24日, SKYICITY Auckland Convention Centre).
- 8) Kawase T, Uematsu K, Nagata M, Okuda K, Yoshie H. CD146-positive cells and the osteogenic potential of cultured periosteal sheets. The 98th Annual Meeting of the AAP (Los Angeles, CA, USA, 2012年9月29日, Los Angeles Convention Center)
- 9) Horimizu M, Kawase T, Kubota T, Nagata M, Tomita T, Morozumi T, Okuda K, Yoshie H. The combinational use of periosteal sheet and platelet-rich fibrin. The 98th Annual Meeting of the AAP (Los Angeles, CA, USA, 2012年9月29日, Los Angeles Convention Center) ほか

〔図書〕(計4件)

- 1) Kawase T, Okuda K, Nagata M, Yoshie H. (2014) (Chapter 2) The cell-multilayered periosteal sheet: a promising osteogenic and osteoinductive grafting material. In: "New Trends in Tissue Engineering and Regenerative Medicine" Ed by Ueda M. InTech Open Access Publisher (Rijeka, Croatia), pp19-35.
- 2) 川瀬知之、中田 光 (2013) [7] 骨膜シートの保存と管理. 「再生医療における臨床研究と製品開発」第2章 細胞の培養・操作・加工技術・管理 (研究室レベルでの培養)と求められる製品. 第2節 細胞培養の基礎. 技術情報協会, pp148-152.
- 3) 奥田一博、川瀬知之、中田 光、吉江弘正 (2013) [5] 培養骨膜シート移植を応用した歯周組織再生法. 「再生医療における臨床研究と製品開発」第6章 非臨床安全性試験・臨床試験における評価. 第3節 細胞シート工学を用いた再生医療の評価. 技術情報協会, pp473-478.
- 4) 川瀬知之、奥田一博、吉江弘正 (2012) 「2.2 培養骨膜」 2. 歯周病の再生医療

再生医療叢書 第8巻 「歯学系」(上田実、朝比奈泉・編)、朝倉書店, pp53-67.

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
なし

取得状況(計0件)
なし

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川瀬 知之 (KAWASE TOMOYUKI)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 9 0 1 9 1 9 9 9

(2) 研究分担者

奥田 一博 (OKUDA KAZUHIRO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 0 0 1 6 9 2 2 8

(3) 研究分担者

永田 昌毅 (NAGATA MASAKI)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 1 0 2 4 2 4 3 9

(4) 研究分担者

田中 孝明 (TANAKA TAKAAKI)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号: 0 0 2 1 7 0 4 3