

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670846

研究課題名(和文) 厚みのある細胞 - リン酸カルシウム複合組織体作製と骨再生治療への応用

研究課題名(英文) Construction of mesenchymal stem cells-calcium phosphate hybrid spheroids using an oxygen-permeable cell culture device

研究代表者

穴田 貴久 (Anada, Takahisa)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：30398466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体外での三次元細胞組織体において、酸素供給は細胞の生存や機能を維持するための重要な因子である。酸素供給が不足すると組織体内部で壊死が起こることが問題点である。本研究はこの内部壊死を抑制するための酸素透過性三次元細胞培養器とリン酸カルシウム担体材料を基盤として、材料と間葉系幹細胞の複合組織体構築と骨再生治療応用を目的とした。培養デバイスにより幹細胞の骨芽細胞分化の促進と材料との複合組織体構築に成功した。また、複合化により幹細胞の骨芽細胞分化が大幅に促進されることを見いだした。以上より、当該培養デバイスは応用性、汎用性が高く、骨再生医療への貢献が期待できる結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Three-dimensional (3D) cellular constructs have been paid attention in the field of tissue engineering. Increase in size of cellular aggregates causes a depletion of oxygen in the core of aggregates. We have developed an oxygen-permeable cell culture device to prevent hypoxia in the core of the cellular aggregates. The aim of this study was construction of 3D cellular structure consisted of mesenchymal stem cells (MSCs) and calcium phosphate materials based on the oxygen-permeable device we developed. We found that the device was able to improve osteoblastic differentiation of MSCs and generate hybrid spheroids consisted of cells and calcium phosphates. These results suggest that the device is useful for engineering 3D cellular constructs for tissue engineering.

研究分野：再生医工学

キーワード：生体材料学 細胞培養デバイス

1. 研究開始当初の背景

球状細胞凝集塊(スフェロイド)培養法は、三次元的に細胞同士が接着し、通常行われる平面単層培養に比べ、より生体内に近い環境での細胞培養が可能になる。しかし、スフェロイド直径増大に伴う内部壊死が大きな課題であった。研究代表者はこれまでに独自の三次元細胞培養器を開発し、特許出願および論文投稿を行った(Anada et al., 2012 Biomaterials 及び 2010 Sens Actuators B)。この培養器の最大の特徴は酸素透過性である。この酸素透過性細胞培養器は、スフェロイドに安定的に酸素を供給することができる。酸素要求量が高い肝癌細胞株をモデル細胞として実験を行った結果、酸素透過性培養器を用いることで、スフェロイドへの酸素供給が大幅に向上し、細胞増殖が著しく向上することを見出している。また、細胞塊内部の状態を低酸素プローブにより比較したところ、従来法ではスフェロイド直径が 100 μm を超えると内部の大部分が低酸素(10 mmHg 以下)におちいるのに対して、本培養器では直径 400 μm でも内部まで酸素が供給されることがわかった。この効果により、酸素透過性培養器では酸素不足によるネクrosisが大幅に抑制されることを見出した。また、肝機能マーカーであるアルブミン産生を調べた結果、本培養器は、従来法に比べてより長期間高い活性を維持できることがわかった。以上より、当該培養器は、細胞塊内部まで酸素を供給することが可能であり、細胞生存に優位な代謝環境や分化の促進・維持を可能にすることがわかった。このような細胞組織体の内部壊死を抑制することができる培養デバイスは、様々な応用展開が可能である。当該培養器は、従来のスフェロイド培養の問題点を解決し、再生医療を含めた広範な応用が可能な基盤技術であることを見出した。一方、疾病などにより骨に障害が起き、患者の QOL が損なわれることが社会の高齢化に伴って大きな問題になっている。自家骨移植が現在のゴールドスタンダードであるが、移植部位以外への侵襲、感染、採取量に制限があるなど問題点がある。そのため、自家骨に代わる人工骨再生担体材料、治療法の開発に対するニーズは非常に高い。ハイドロキシアパタイト(HA)や β -リン酸三カルシウム(β -TCP)は骨補填材として臨床で使われているが、これら既存人工材料は吸収が遅く、自家骨に比べて骨再生能、吸収速度の点で改善の余地がある。これまでに我々のグループは、リン酸オクタカルシウム(OCP)に着目し研究を進めてきた。OCP は骨や歯のアパタイトの前駆物質であり、生理的環境下において徐々に HA へと結晶構造が変化(転換)する。これまでに OCP が *in vitro* で骨芽細胞分化や破骨細胞分化を促進すること(Anada et al, 2008 Tissue Eng, Takami et al., 2009 Tissue Eng)を見いだしている。また、我々は OCP が *in vivo* で既存材料よりも

優れた骨再生能を有することを世界に先駆けて報告している(Suzuki et al., 2006 Biomaterials, Miyatake et al, 2010 Biomaterials など多数)。

2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究は独自開発した培養器を基盤とすることで、生体外で骨再生材料 OCP と細胞から成る三次元組織体を構築し、骨再生医療へ応用することを目的とした。In vitro 及び in vivo 実験から培養デバイスと幹細胞と担体材料を一体化した複合組織体の優位性を証明し、壊死のない「活きの良い細胞組織体」を新規骨再生治療法として提案する。

3. 研究の方法

酸素透過性培養器に間葉系幹細胞(MSC)を播種し、培養器および培養条件の最適化を図った。まず、MSC は株化細胞 D1 細胞や C3H10T1/2 を用いた。骨芽細胞分化培地を用いて培養器での MSC の骨芽細胞分化の最適化を図った。骨芽細胞分化についてはリアルタイム PCR による検討(骨分化マーカーであるアルカリホスファターゼ、コラーゲン I、オステオカルシンなど)や石灰化の経時変化を切片作製により評価した。比較として平面培養と酸素を透過しない三次元培養器を用いた。培養器内で形成されたスフェロイド内部の酸素供給状態を低酸素プローブ分子を用いて解析した。さらに、培養器を用いてリン酸カルシウム材料との複合化を行った。材料として OCP, HA, β -TCP を用いた。これら材料は細胞と同等の大きさ(約 50 μm)に整粒して用いた。細胞と OCP の混合比を変化させて培養器に播種し、MSC と材料が自己組織的に複合化する条件を詳細に検討した。細胞を蛍光標識しておき、共通設備である共焦点顕微鏡を用いて細胞組織体形成を経時的に観察した。また、材料と細胞を複合化することによって骨芽細胞分化にどのような影響があるかについてリアルタイム PCR を用いて検討した。OCP と MSC を共培養して得られる細胞塊をビルディングブロックとして生体外で積層し、組織体構築を行った。酸素透過性培養器を大きな組織体形成のために最適化し、培養条件を検討するための移植用培養デバイスを作製した。このデバイスを用いて作製した細胞組織体をマウス頭蓋骨欠損モデルに埋入し、新生骨形成の *in vivo* 評価を行った。移植後に埋入体を摘出し、切片を作製し、骨再生過程を組織切片より定量的に評価する。共通設備であるマイクロ CT を用いて新生骨の解析を行った。

4. 研究成果

酸素透過性培養デバイス(図 1)を作製した。はじめに D1 細胞を培養デバイスに播種し、骨芽細胞分化誘導培地を用いて細

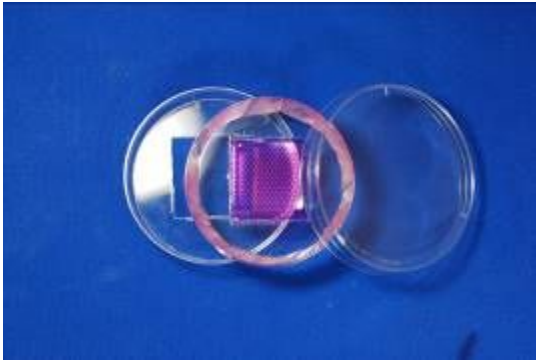


図1. 本研究で作製し、使用した酸素透過性三次元細胞培養デバイスの写真。

胞塊の骨芽細胞分化を誘導した。リアルタイム PCR 及び DNA チップによって骨代謝関連遺伝子の発現を三次元培養と平面培養で比較した。その結果、平面培養に比べて三次元培養の骨芽細胞分化は大幅に促進された。さらに培養器によって酸素を細胞塊へ供給することにより骨芽細胞分化が促進した。DNA チップの解析により低酸素状態になると骨芽細胞よりも軟骨、脂肪細胞への分化が促進された。この結果から、MSC は、酸素分圧の違いによって分化に影響を受け、本培養システムを用いることで軟骨分化やネクロシスを抑制し、迅速に骨芽細胞への分化が誘導されることを見いだした。この結果について投稿し、受理された〔雑誌論文 4〕。最適化した骨芽細胞分化条件において種々のリン酸カルシウム材料を細胞と混合し、その影響を調べた。図 2 に MSC と OCP を培養器で複合化した時の光学顕微鏡写真を示す。用いた全ての材料は培養器を用いることで MSC と複合組織体を形成した。

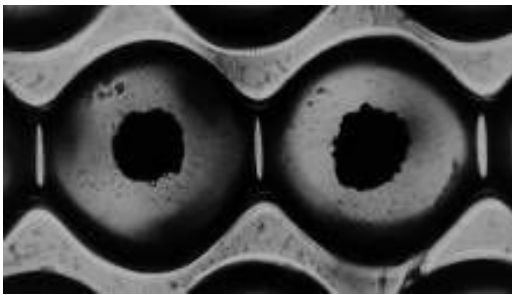


図2. 三次元培養デバイスで形成したMSCとOCPの複合組織体の光学顕微鏡写真。

組織切片を作製し、組織体内部を観察したところ、細胞が材料粒子を取り囲むようにして複合組織体が形成されていた。複合化の骨芽細胞分化への影響を分化マーカーの一つである ALP 活性によって評価した。その結果、細胞のみよりもリン酸カルシウム材料と複合化の方が骨芽細胞分化が促進され、特に OCP を複合化することで大幅な ALP 活性の上昇が観察された。リアルタイム PCR などの結果とあわせて、リン酸カルシウム特に

OCP との複合組織体形成は骨芽細胞分化に有効であることが確かめられた。これらの結果についてまとめ、投稿して受理されている〔雑誌論文 3〕。

In vivo 移植実験のためにこの複合組織体をさらに凝集させ、骨欠損領域と同じ大きさになるようにディスク化した。マウス頭蓋冠規格化骨欠損にこのディスクを移植した結果、複合体によって欠損内部に骨形成が起こることを確かめた(投稿準備中)。これらの結果から、本培養デバイスは、MSC の三元化と骨再生材料粒子との複合化を促進し、OCP との複合化及び酸素供給によって骨芽細胞分化が促進されることを確かめた。以上の結果より、これまでには困難であった迅速な移植用分化細胞の調製や大きな骨欠損の早期再生が期待できる。

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 9 件)

1. S Chiba, T Anada, K Suzuki, K Saito, Y Shiwaku, N Miyatake, K Baba, H Imaizumi, M Hosaka, E Itoi, O Suzuki. (2016) Effect of resorption rate and osteoconductivity of biodegradable calcium phosphate materials on the acquisition of natural bone strength in the repaired bone. J Biomed Mater Res A, 104: 2833-2842. DOI: 10.1002/jbm.a.35828 (査読有)
2. K Saito, T Anada, Y Shiwaku, S Chiba, N Miyatake, K Suzuki, K Tsuchiya, O Suzuki. (2016) Dose-dependent enhancement of octacalcium phosphate biodegradation with gelatin matrix during bone regeneration in a rabbit tibial defect model. RSC Adv 6: 64165-64174. DOI: 10.1039/C6RA07602E (査読有)
3. Anada T, Sato T, Kamoya T, Shiwaku Y, Tsuchiya K, Takano-Yamamoto T, Sasaki K, Suzuki O. (2016) Bioactivity of octacalcium phosphate utilizing osteoblastic cell aggregates in a spheroid culture device. Regenerative Therapy 3: 58-62. DOI: 10.1016/j.reth.2016.02.004 (査読有)
4. Kamoya T, Anada T, Shiwaku Y, Takano-Yamamoto T, Suzuki O. (2016) An oxygen-permeable spheroid culture chip (Oxy chip) promotes osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. Sensors & Actuators: B. Chemical 232 pp. 75-83. DOI: 10.1016/j.snb.2016.03.107 (査読有)
5. S Sakai, T Anada, K Tsuchiya, H Yamazaki, HC Margolis, O Suzuki. Comparative study on the resorbability and dissolution behavior of octacalcium phosphate,

-tricalcium phosphate, and hydroxyapatite under physiological conditions. Dent Mater J 2016; 35(2): 216-224. DOI: 10.4012/dmj.2015-255 (査読有)

6. M Yamada, T Anada, T Masuda, T Takano-Yamamoto1, O Suzuki. (2015) Effect of mechanical stress on differentiation of mouse mesenchymal stem cells seeded into an octacalcium phosphate-gelatin scaffold. Sens Actuators B Chem, 220: 125-130. DOI: 10.1016/j.snb.2015.05.073 (査読有)

7. K Endo, T Anada, M Yamada, M Seki, K Sasaki, O Suzuki. (2015) Enhancement of osteoblastic differentiation in alginate gel beads with bioactive octacalcium phosphate particles. Biomed Mater 10:065019. DOI:10.1088/1748-6041/10/6/065019 (査読有)

8. Ezoe Y, Anada T, Yamazaki H, Handa T, Kobayashi K, Takahashi T, Suzuki O. (2015) Characterization of partially hydrolyzed OCP crystals deposited in a gelatin matrix as a scaffold for bone tissue engineering. J Nanopart Res, 17:127. DOI: 10.1007/s11051-015-2864-1 (査読有)

9. K Kobayashi, T Anada, T Handa, N Kanda, M Yoshinari, T Takahashi, O Suzuki. (2014) Osteoconductive property of a mechanical mixture of octacalcium phosphate and amorphous calcium phosphate. ACS Applied Materials & Interfaces, 6 (24): 22602-2261. DOI: 10.1021/am5067139 (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

1. 穴田貴久、鈴木治、酸素透過性三次元培養デバイスによる間葉系幹細胞培養、第16回日本再生医療学会総会、2017年3月7-9日、仙台

2. Tomoya Sato, Takahisa Anada, Takuo Kamoya, Yukari Shiwaku, Kaori Tsuchiya, Teruko Takano-Yamamoto, Keiichi Sasaki, Osamu Suzuki, The effect of oxygen supply and incorporation of calcium phosphate microparticles into 3-D cellular aggregates for bone tissue engineering, The 2017 Japan-NIH Joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease, 2017年2月15日-17日、仙台

3. Anada T, Suzuki O, Three-dimensional culture of dental epithelial cells using spheroid culture device, China-Japan-Korea Dental Science Symposium 2016, Fuzhou, China, December 9-10, 2016

4. Anada T, Suzuki O, Development of an oxygen-permeable spheroid culture chip (Oxy chip) to prevent central hypoxia of spheroids. Organ-on-a-Chip World Congress & 3D-Culture 2016, Boston, USA, July 7-8,

2016

5. 佐藤智哉、穴田貴久、加茂谷拓央、塩飽由香利、山本照子、佐々木啓一、鈴木治、マウス間葉系幹細胞による三次元細胞組織体形成に及ぼすリン酸カルシウムの影響、第15回日本再生医療学会総会、2016年3月17日～19日、大阪

6. 穴田貴久、福田淳二、鈴木治、酸素透過性三次元細胞培養デバイスの開発と応用、日本動物実験代替法学会第27回大会、2014年12月6日、横浜

〔図書〕(計2件)

1. 鈴木治、穴田貴久。(2016) "骨". 細胞社会学.細胞工学ライブラリ3,大和雅之編,コロナ社, pp.81-92

2. 穴田貴久、福田淳二、鈴木治(2015) 酸素透過性三次元細胞培養デバイスの開発「三次元ティッシュエンジニアリング 細胞の培養・操作・組織化から品質管理、脱細胞化まで」エヌ・ティー・エス. pp.213-218

〔その他〕

ホームページ等
 東北大学大学院
 歯学研究科顎口腔機能創建学分野
<http://www.cfe.dent.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

穴田 貴久 (ANADA, Takahisa)
 東北大学・大学院歯学研究科・准教授
 研究者番号：30398466

(2)研究分担者

鈴木 治 (Suzuki, Osamu)
 東北大学・大学院歯学研究科・教授
 研究者番号：60374948