

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750144

研究課題名(和文) Engineering thick tissues in vivo using oxygen-releasing pro-angiogenic biomaterials

研究課題名(英文) Engineering thick tissues in vivo using oxygen-releasing pro-angiogenic biomaterials

研究代表者

モンターニュ ケヴィン (MONTAGNE, Kevin)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50606118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞密度の高い厚みのある組織再生は、酸素供給が不十分な問題があった。本研究では、組織の生存状態を維持するために、酸素の徐放性を制御しながら血管新生を促進できる新規な材料の開発を目標とした。20%の過酸化カルシウムを含むPDMS(ポリジメチルシロキサン)スポンジは良好な酸素徐放特性を示すことがわかった。そして、1週間培養に亘る高密度培養にも関わらず、内部組織の生存率の維持に成功した。さらに、低酸素状態で細胞が死滅する方向に細胞内部の状態が進行していることを意味する遺伝子の発現が、新規に開発した材料で抑制されていたことから、本研究で開発したモデルは再生医療用組織として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Engineering thick, cell-dense artificial tissues to replace diseased organs has been hindered so far by the difficulty in maintaining the cells alive after implantation due to insufficient oxygen supply. The aim of this research was to create thick tissue constructs based on oxygen-releasing biomaterials that both promote blood vessel growth upon implantation into a host while simultaneously releasing oxygen to maintain the viability of the construct. So far, oxygen-releasing biomaterials have been prepared consisting of polydimethylsiloxane sponges containing up to 20% of calcium peroxide. Those sponges have been shown to increase the oxygen concentration in the cell culture medium. Furthermore, cells cultured at a high density in the sponges were still viable after up to seven days in culture and showed a decreased hypoxic response compared to cells cultured in control materials

研究分野：Tissue engineering

キーワード：Hypoxia Biomaterials Tissue engineering

1. 研究開始当初の背景

ティッシュエンジニアリングは再生医療の一つの分野であり、損傷した臓器を交換する目的である。そのために細胞を人工担体に播種し、*in vitro*で培養してから患者に移植するプロセスである。現在、骨、皮膚、膀胱、軟骨などの薄い、または細胞の密度が低い臓器の人工的な交換に成功しているが、細胞密度の高い厚みのある組織再生は酸素供給が不十分な問題で非常に困難である。その理由として、組織に血管がない限り、表面に近い細胞が酸素をすべて消費し、組織の表面から200マイクロンより離れている細胞に酸素が拡散しないことが分かっている(Folkman et al., 1973)。その結果、低酸素状態が長く続くと、組織の深いところにある細胞が酸素の不十分で死滅する。

生体内では、血管のネットワークのおかげですべての細胞に十分な酸素や栄養を提供することができる。それを利用して人工組織に毛細血管を作ろうとするアプローチが様々なあるが、まだ厚い組織の作成に成功していない。過酸化物は水と反応すると酸素に変化することが知られている。最近、過酸化物を含むバイオマテリアルが使われており、徐放される酸素のおかげで培養細胞の生存率の上昇、低酸素症による細胞の死滅の予防に成功したが、*in vitro*または*in vivo*での厚い(数mm)組織の作成にはまだ応用されていない。

2. 研究の目的

本研究では、厚い組織の生存状態を維持するために、酸素の徐放性を制御しながら血管新生を促進できる新規な材料の開発を目標とした。このアプローチで移植用の人工組織だけでなく基礎研究や薬剤スクリーニングで使う*in vitro*の臓器モデルが作れると期待できる。

3. 研究の方法

(1) 酸素徐放性ポリマーの作成：

酸素透過ポリマーであるPDMS(ポリジメチルシロキサン)を作るには、主剤と硬化剤(東レ・ダウコーニング)を重量比にて10:2の割合で混合し、過酸化カルシウム(CaO₂) (75%, シグマ アルドリッチジャパン)を重量比にて25%までPDMSに溶かした。

(2) 酸素を徐放する担体の作成：

担体を作成するには角砂糖をCaO₂を含むPDMSに浸し、PDMSが毛管作用で染み込むまで待ち、80℃で2時間硬化し、砂糖を冷たい水で1時間溶かした。その結果、四角のCaO₂を含むPDMSスポンジ(PDM/CaO₂)ができた。細胞をスポンジの中まで播種できるように、スポンジを15%ゼラチン溶液に浸し、ビブラトーム(Leica)で0.5mmの切片を作った。出来上がったスポンジの切片を図1に示してある。



図1：PDMSのスポンジ(上)とスポンジの切片(下)。右は20wt%CaO₂を含むスポンジで薄い茶色になっている

(3) 細胞培養：

マウスのインスリン分泌細胞株であるMIN6-m9細胞をDMEM + 10%ウシ胎児血清入りの培地で培養した。マウスの軟骨前駆細胞であるATDC5細胞をDMEM/F12 + 5%ウシ胎児血清入りの培地で培養した。

(4) 酸素濃度の測定：

0%, 10%あるいは25%のCaO₂を含むPDMSスポンジを培地浸し、培地内の酸素濃度をクラーク電極で25日間測定した。

(5) 遺伝子発現の解析：

担体で培養した細胞において低酸素の反応が起きているかを検討するために、低酸素状態で普段発現が上昇する遺伝子である*Adm*, *Dec1*, *Pdk1*, *Pgk1*, *Phd3*と*Slc16a3*はリアルタイムPCR法で測定した。結果はリファレンス遺伝子である*Rpl13a*の発現にノーマライズした。

(6) 細胞の生存率：

細胞の生存率をCalcein-AMとプロピジウムイオダイド(PI)の染色で検討した。試薬は同仁化学研究所で購入した。生きている細胞はCalcein-AMをCalceinに分解し緑で光り、死んでいる細胞の核にPIが入り込み赤で光る。

4. 研究成果

(1) PDMS/CaO₂担体からの酸素徐放：PDMS/CaO₂のスポンジが酸素を徐放できるかを確認するために、担体を培地に浸し、37度のインキュベーターに置き、培地の酸素濃度を3週間ほど測り続けた。PDMSだけのスポンジと比べて、10%または25%のCaO₂を含むスポンジが培地内の酸素濃度を50%ほど上げることが確認できた。またその徐放は3週間以上続けることが分かった(図2)。

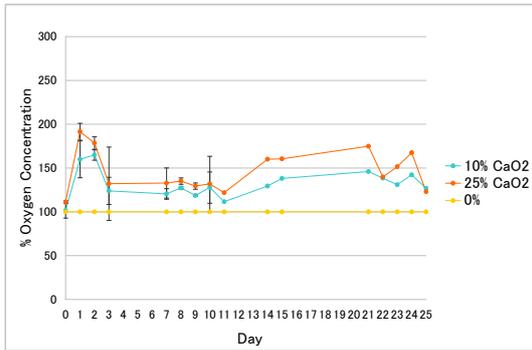


図2：0%，10%あるいは25%のCaO₂を含むPDMSスポンジを浸した培地の酸素濃度の測定。PDMSだけのスポンジの結果を100にノーマライズした。

(2) 細胞播種：

まずは細胞を直接PDMSスポンジに播種したが、スポンジの気孔率が非常に高いため細胞がほとんど接着せずスポンジを通り抜けてしまい、高密度の播種ができなかった。培養開始の4日後、担体内の細胞が少ないことが分かった(図3)。

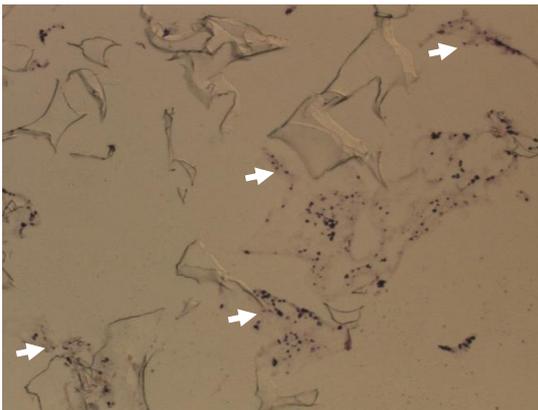


図3：直接に播種した細胞が担体に接着せず担体を通り抜けるため、細胞の密度が低い(接着した細胞が矢印で示してある)。

播種密度を上げるために細胞を巡回培養で培養し小さい(100マイクロン前後)凝集体を作った。翌日細胞をコラーゲンゲルで懸濁しスポンジに播種した。ゲルがスポンジを通りぬけないためスポンジ内の細胞密度が上げることができる(図4)。

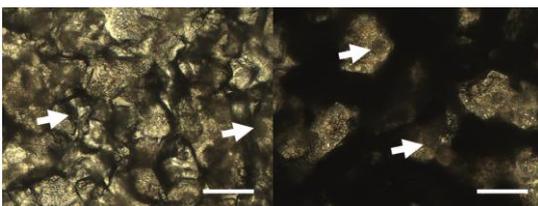


図4：細胞の凝集体をコラーゲンゲルで懸濁しPDMSだけ(左)あるいはPDMS/CaO₂20%のスポンジに播種した細胞凝集体の写真。

凝集体が矢印で示してある。スケールバー：250マイクロン

(3) 細胞生存率：

細胞の生存率を調べるために担体に播種した細胞をCalcein-AMとプロピジウムイオダイド(PI)で染色した(図5)。その結果どんなスポンジでも生存率が高く、大きな差が見られなかった。

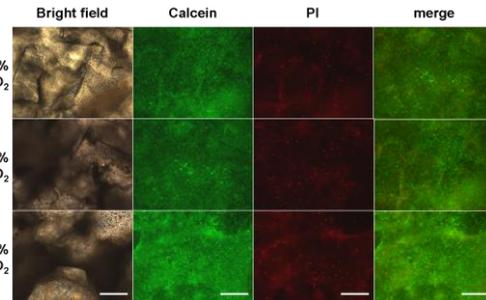


図5：Calcein-AMとプロピジウムイオダイド(PI)で染色したスポンジで播種した細胞の蛍光画像。スポンジに0%，10%あるいは20%のCaO₂が溶かしてある。左は透過工の写真。スケールバー：200マイクロン

(4) 低酸素症の遺伝子発現：

播種した細胞の呼吸の状態を検討するためにHIFである低酸素状態で活性化される重要な転写因子の発現を蛍光免疫染色で調べた(図6)。

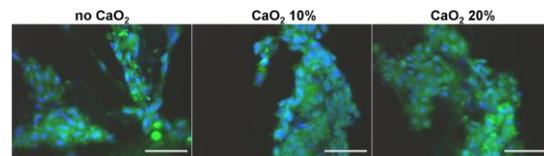


図6：0%，10%または20%のCaO₂を含むPDMSスポンジに高密度で播種した細胞におけるHIFの蛍光免疫染色。スケールバー：50マイクロン

HIFが活性化すると、核に移動することが知られている。一方、どんなPDMS/CaO₂スポンジでも、播種の4日後、HIFが細胞質で見られ、ほとんど核に移動しないことが分かった。そのことから細胞に低酸素症飯能が起きていないと思われる。細胞の播種密度は $2 \cdot 10^7$ 細胞/mLであったが、生体内の細胞密度($10^8 \sim 10^9$ 細胞/mL)より十倍以上低く、培地に溶けてある酸素で細胞の呼吸に十分であると考えられる。

低酸素症の反応が起きていないかをもっと調べるために、低酸素状態で発現が上昇することが知られている遺伝子(Adm, Dec1, Pdk1, Pgk1, Phd3, Slc16a3)の発現を測定した。その結果、20%のCaO₂が含まれているPDMSスポンジでは測定した遺伝子の発現

がすべて低下したことが見られた。その結果から、低酸素反応がCaO₂入りのスポンジで抑制されると思われる(図7)。

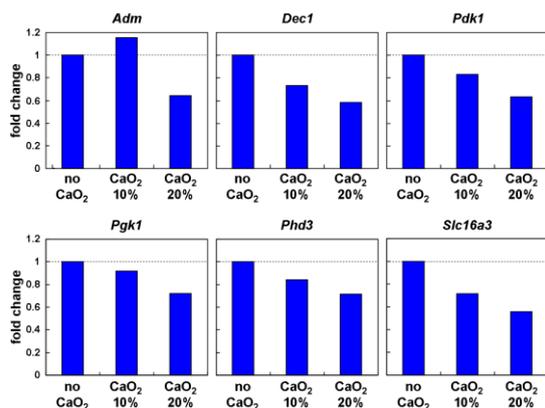


図7：0%、10%または20%のCaO₂を含むPDMSスポンジに播種した細胞の低酸素症の遺伝子発現。播種後4日間培養し、PCRで遺伝子発現を測定した。

(5) 血管新生に係わる遺伝子発現の測定：VEGFは血管新生に重要な増殖因子であり、低酸素状態で誘導されることが知られている。その結果、Vegfaの発現がCaO₂入りの担体で低下することが分かった(図8)。

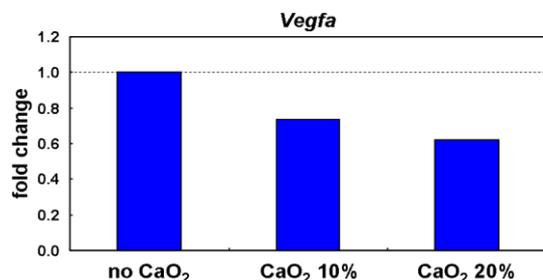


図8：0%、10%または20%のCaO₂を含むPDMSスポンジに播種し、4日間培養したATDC5細胞におけるVegfaの遺伝子発現

生体内で血管新生を促進するためにVegfaの発現を誘導することが重要である。そのために低酸素症を真似する試薬であるdesferioxamine (DFO)が使える。DFOでATDC5細胞を刺激した結果Vegfaの発現が圧倒的に上昇することが確認できた。一方MIN6-m9での影響は非常に弱かった(図9)。

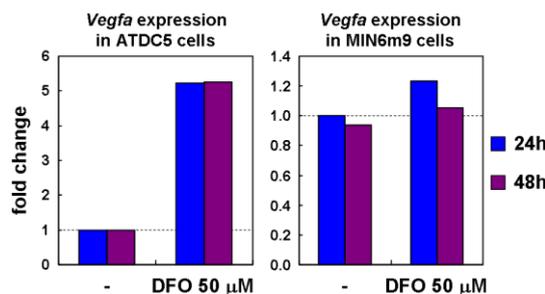


図9：24時間か48時間DFO(50 μM)で刺激したATDC5とMIN6-m9細胞における

Vegfaの発現

結論として0~20%のCaO₂入りのPDMSスポンジを作成し、細胞を高密度で播種することができた。担体は細胞に毒性がないことが確認した。その上、CaO₂入りのスポンジが低酸素症の反応を抑制することが分かった。今後はDFO等の低酸素を真似する試薬を用い、移植後の生体内において血管新生を促進することができるかを検討する予定である。

<引用文献>

(1) Folkman J., Hochberg M., Self-regulation of growth in three dimensions, *J Exp Med*, 138 (1973), 745-753.

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 モンターニュ ケヴィン, オ ドンイグ, キム ジョンヒョン, 牛田 多加志, 古川 克子, Involvement of the mTOR pathway in redifferentiation of bovine chondrocytes under dynamic hydrostatic loading, *Japanese Journal of Clinical Biomechanics*, 査読有, 37巻, 2016, in press

② Ting Stephanie, Montagne Kevin, Nishimura Yoshihiro, Ushida Takashi, Furukawa Katsuko, Modulation of the effect of transforming growth factor-β3 by low-intensity pulsed ultrasound on scaffold-free dedifferentiated articular bovine chondrocyte tissues, *Tissue Engineering Part C Methods*, 査読有, 21巻, 2015, 1005-1014
DOI: 10.1089/ten.TEC.2014.0428

③ Kim Jeonghyun, Montagne Kevin, Ushida Takashi, Furukawa Katsuko, Enhanced chondrogenesis with upregulation of PKR using a novel hydrostatic pressure bioreactor, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 査読有, 79巻, 2015, 239-241
DOI: 10.1080/09168451.2014.975184

[学会発表] (計 5 件)

① モンターニュ ケヴィン, 小笠原 陸雄, キム ジョンヒョン, 古川 克子, 牛田 多加志, Hydrostatic Pressure Activates Heterotrimeric G Proteins in Chondrocyte Progenitor Cells, 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, 2015/9/16~19, 北海道大学札幌キャンパス, 北海道, 札幌市

② モンターニュ ケヴィン, 小笠原 陸雄, キム ジョンヒョン, 古川 克子, 牛田 多加志, High hydrostatic pressure induces Fos expression in chondrogenic cells, 第42回日本臨床バイオメカニクス学会, 2015/11/13~14, ソラシティカンファレンスセンター, 東京都, 千代田区

③ キム ジョンヒョン, モンターニュ ケヴィン, 廣田 泰, 平岡 毅大, 吉野 修, 横田 雅世, 齊藤 滋, 大須賀 穰, 牛田 多加志, 古川 克子, Cyclic stretching promoted cAMP production in human endometrial stromal cells leading to differentiation into smooth muscle cells, 第42回日本臨床バイオメカニクス学会, 2015/11/13~14, ソラシティカンファレンスセンター, 東京都, 千代田区

④ モンターニュ ケヴィン, 小笠原 陸雄, 古川 克子, 牛田 多加志, 軟骨前駆細胞における高静水圧刺激によるストレス反応および脱分化メカニズムの検討, 日本機械学会第28回バイオエンジニアリング講演会, 2016/1/9~10, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京都, 目黒区

⑤ キム ジョンヒョン, モンターニュ ケヴィン, メートネン テーム, 廣田 泰, 吉野 修, 齊藤 滋, 大須賀 穰, 牛田 多加志, 古川 克子, Promoted differentiation of smooth muscle cells in hMSPs by cyclic strain via the cAMP pathway, 第15回日本再生医療学会総会, 2016/3/17~19, 大阪国際会議場, 大阪府, 大阪市

〔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

モンターニュ ケヴィン (MONTAGNE, Kevin)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号：50606118

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：