

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750161

研究課題名(和文) 三次元培養スキャフォールドを用いた血管新生制御による生体硬組織の再生

研究課題名(英文) Regeneration of bone tissues in three-dimensional scaffold by controlling of vascularization

研究代表者

本田 みちよ (Honda, Michiyo)

明治大学・理工学部・専任准教授

研究者番号：20384175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、立体的な硬組織再生のために、三次元培養可能なスキャフォールドに再生組織内部への酸素や栄養分の供給を可能とするための血管新生を誘導する結合組織増殖因子(CTGF)を担持させた足場材料を作製した。さらに、骨形成とともに血管形成を実現させるために、骨芽細胞と血管内皮細胞を共培養し、骨分化、血管新生過程における両細胞の相互作用の重要性を明らかにした。骨芽細胞と血管内皮細胞を共培養することで、骨分化レベルが促進され、同時に血管形成も確認された。血管新生誘導型のスキャフォールドと血管内皮細胞、骨芽細胞共培養系を組み合わせることにより、立体的な骨組織の形成を可能にすることができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have fabricated three-dimensional apatite-fiber scaffold for regeneration of bone tissues. To possess the vascular network supplying cells with nutrients and oxygen, connective tissue growth factor (CTGF) was loaded on AFS. On the other hand, to create three-dimensional vascularized bone tissue, co-culture system (osteoblasts and endothelial cells) was employed. As a result, co-culture of osteoblasts and endothelial cells significantly increased alkaline phosphatase activity and expression of bone-related genes. Furthermore, abundant microcapillary-like structures were observed. Combination of these cell-based approaches and tissue engineering like three-dimensional scaffolds could provide a novel strategy for bone regeneration.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：骨再生 血管新生 スキャフォールド

1. 研究開始当初の背景

「再生医療」は先天的、または事故や疾患によって後天的に失われた組織や器官を再生する医療として近年、注目を集めている。iPS (induced pluripotent stem cell)細胞の樹立により、再生医療の可能性は飛躍的に高められ、国内外を問わず、競争の激しい研究分野の一つと言える。組織工学・再生医療の研究には、細胞・増殖因子・足場材料(スキャフォールド)と呼ばれる三要素が提唱されているが、スキャフォールドの開発は細胞や成長因子の研究よりも遅れており、再生医療のための優れた「三次元培養基材(足場材料)の開発」が強く求められている。また、幹細胞の基礎研究が進展し、iPS 細胞を含む幹細胞による臓器構築技術には期待が寄せられているが、幹細胞の多分化能に関する研究の多くが二次元培養による成果であり、現段階では幹細胞から移植可能な三次元的な構造をもった再生臓器の構築は実現されていない。細胞・増殖因子、そして足場材料を利用して如何に三次元的な構造を有する臓器構築を試みるかが課題である。

2. 研究の目的

本研究では生体硬組織の再生を実現させるために、既存材料の中では最も優れた生体活性(インプラント時にホストの骨と直接結合する性質)を示す水酸アパタイト(HAp)または β -リン酸三カルシウム(β -TCP)からなる多孔質スキャフォールドを創製し、三次元的な構造を有する骨組織の構築を目指す。さらに、骨再生過程における血管新生制御の重要性に注目し、血管新生能を有するタンパク質(connective tissue growth factor; CCN2/CTGF)を担持させたスキャフォールド(血管新生誘導型骨再生スキャフォールド)を創製し、血管誘導能を有する足場材料を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 多孔質足場材料の作製

試料溶液は HAp の化学量論組成である Ca/P 比 1.67 となるように $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ および HNO_3 を混合して調製した。この溶液を 80°C で 24 時間、ついで 90°C で 72 時間加熱してアパタイトファイバー(AF)を合成した。得られた AF に対して任意の割合でカーボンビーズを添加し、吸引過することで成形体を作製した。得られた成形体を 1300°C 、5 時間水蒸気雰囲気下で焼成することにより AFS を得た[1]。なお、本研究では粒径 20 もしくは $150 \mu\text{m}$ のカーボンビーズを使用した。

(2) 細胞培養

培養には、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC, Lonza)およびヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞(MG-63, Riken cell bank)を用い、任意の割合で一定期間単独もしくは共培養を行なった。

HUVEC のみの培養には EGM-2 培地(Lonza)、MG-63 のみの培養には Eagle's MEM 培地(Sigma)を用いた。なお、共培養時は EGM-2 培地を利用した。また、AFS における培養は、以下の手順で行なった。24 well plate へセットした AFS をエタノールにて親水処理し、これに MG-63、MG63+HUVEC、もしくは HUVEC 細胞の懸濁液を 0.25 ml 添加し、10 分程度静置した。その後、さらに培地 2 ml を加え、一定期間培養を行なった。この時、コントロールには 24 well Tissue culture plates (TCPs)を用いた。

(3) 骨分化レベルの解析

TCPs における細胞増殖性は、培養後 Trypsin 処理した細胞の数をカウントすることによって評価した。共培養した細胞に関しては、フローサイトメーターを用いて、骨芽細胞と血管内皮細胞の割合を決定し、各細胞の細胞数を算出した。組織学的評価には、一定期間培養した細胞を 4% PFA により固定し、0.25% TritonX-100 で膜処理した後、各種染色(HE 染色、免疫染色)を行なった。AFS に関しては、培養後の AFS を O.C.T.-compound へ包埋し、cryostat を用いて凍結薄切片を作製した後に各種染色を実施した。骨分化レベルの解析には、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性をラボアッセイ ALP キット(Wako) を利用して測定した。ALP 活性染色は TRAP/ALP 染色キット(Wako)を用いた。フローサイトメトリーによる解析では、血管内皮細胞の分離に FITC-CD31 抗体(BD)を用いた。また、免疫染色には、血管内皮細胞のマーカーである CD31 (DAKO)抗体を使用した。

(4) *In vivo* 試験

異なる粒径の気孔形成剤を添加することにより作製した気孔率 85%の AFS (ϕ 3.6 mm, 6.5-7.0 mm (height))へ recombinant human CTGF を $5 \mu\text{g}$ 担持させた。これを日本白色兔脛骨へ 8 週間埋入した後、犠牲にし、ピラヌエバ骨染色を行い、非脱灰研磨標本作製した。なお、コントロールには CTGF を担持させていない AFS を用いた。

4. 研究成果

(1) 多孔質足場材料の作製

既報[1]に従い、多孔質足場材料を作製し、さらにそれらの微細構造を変化させた異なる材料形態を有する複数種類のスキャフォールドを作製した。作製した多孔質スキャフォールドに関しては、内部の構造や力学的強度、*in vitro* における溶解性について調査した。その結果、粒径の異なる 2 種類の気孔形成剤(カーボンビーズ)を使用したことにより、気孔率や連通性、溶解性の異なる足場材料の創製に成功した。

(2) 骨芽細胞と血管内皮細胞の共培養による骨分化に及ぼす影響の検討

はじめに TCPs において、血管内皮細胞 (HUVEC) と骨芽細胞 (MG-63) を共培養し、血管内皮細胞の存在が骨芽細胞の増殖や分化にどのような影響を与えるかを調査した。

初期の骨分化マーカーである ALP 活性を測定した結果、HUVEC が存在することにより MG-63 の ALP 活性は増加し、さらにその活性はより早期に発現することが確認された (Fig. 1)。また、ALP 活性が陽性の細胞の周辺には血管内皮細胞や毛細血管様の構造を有する細胞が局在していた。この細胞-細胞間の相互作用や血管内皮細胞により産生される増殖因子などを介して骨芽細胞の分化が促進されたものと考えられる。以上の結果から、血管内皮細胞は骨芽細胞と直接的に相互作用することで骨分化を促進させることが分かった。

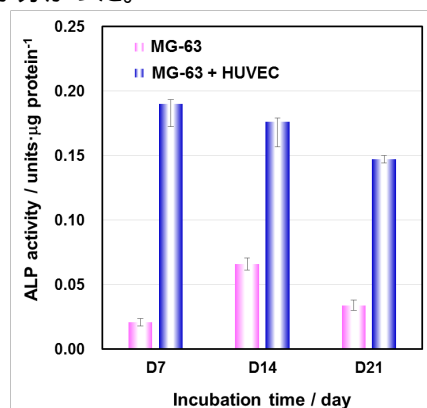


Fig. 1 Comparison of ALP activity between mono-culture and co-culture.

(3) AFS における骨芽細胞と血管内皮細胞の共培養

AFS 三次元培養環境下における共培養時の骨芽細胞への影響については HUVEC: MG-63 = 1:1 の条件で 28 日間培養した。培養 28 日後の AFS から作製した薄切切片の HE 染色の結果から、MG-63 単独での培養および MG-63 と HUVEC の共培養はいずれの培養条件においても、細胞は AF へ接着した後に、ミクロ気孔を利用して増殖した。より詳細に AFS における細胞の分布を観察すると、MG-63 は、マクロ気孔の外周部から内部へと増殖し、さらにマクロ気孔を架橋するように三次元的に局在していた。一方、共培養した場合は、マクロ気孔を充填するようにそれぞれの細胞が増殖し、一部では、管腔様の構造を形成していた。この血管様構造について、さらに詳細に解析するために血管内皮細胞のマーカーである CD31 の発現について免疫染色を行なった。その結果、形成されていた管腔はいずれも CD31 陽性の細胞であり、HUVEC 由来の細胞から形成されていることが分かった。すなわち、AFS はその内部へ血管内皮細胞を誘導し、血管を形成させることが可能な三次元的な骨形成の足場を提供できるということが示された。

さらに、細胞-細胞間の相互作用を調べるた

めに、bulk 状の AFS を染色することで、細胞の局在を観察した。その結果、HUVEC は播種面全体にシート状に広がって増殖していた。また、HUVEC の存在しない部分に CD31 (-) の MG-63 が存在しており、両者が直接接触しながら増殖している様子も観察された。一方、シート状に局在していた HUVEC に対し、内部に単独で存在していた HUVEC では仮足の伸張が認められず、丸い形状のまま点在していた。二次元培養の場合にも観察されたが、管腔構造の形成には多数の細胞が存在していることが重要であったことから、細胞が点在してしまうことは管腔構造の形成には不利であると考えられる。しかし、培養 21 日目以降、特に 28 日目辺りになると、シート状に存在していた HUVEC が管腔を形成し始めることが明らかになった (Fig. 2)。今回観察された管腔はいずれも播種面に形成されており、ここを起点に内部へと侵入する可能性が見出された。一方、MG-63 と HUVEC を共培養していると両細胞の細胞増殖性にも影響を与えているようで、それぞれ単独で培養するよりも細胞生存率が向上している様子が認められた。なお、CLSM を用いて bulk AFS を観察した場合、細胞は播種面から約 200 μm 程度まで存在していることが分かった。しかし、単独培養に比べ、共培養した方が細胞の侵入性が高い傾向が認められた。以上の結果から、HUVEC の生存、強いては管腔の形成には、骨芽細胞との直接的な接触が必要であり、そのためには、2 つの細胞が適度な距離で接触できる空間を形成するスキヤフォールドを創製することが重要であることが分かった。

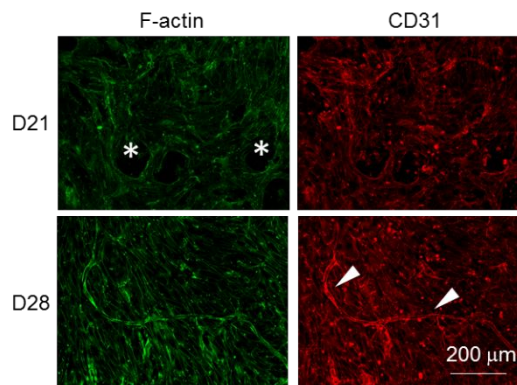


Fig. 2 CLSM images of HUVECs in coculture with human osteoblasts (MG-63)

HUVECs were cocultured with MG-63 on AFS for 21 and 28 days. After culture periods, cells were stained with Alexa 488 phalloidin and anti-CD31 antibody (red) and observed by CLSM. Bar indicates 200 μm. Asterisks show macro pores and arrowheads indicate microcapillary-like structure.

さらに、共培養による骨芽細胞の分化への影響を調べるために、ALP 活性染色を行なった。培養条件に関わらず、ミクロ気孔内で細胞が多数存在する箇所 ALP 活性を有する

細胞が確認された。特に、共培養時に ALP 活性を強く持つ細胞が多く観察された。この結果は、三次元培養環境においても骨芽細胞と血管内皮細胞を共培養すると、骨分化を促進させる傾向にあることを意味している。

(4) CTGF 担持 AFS を用いた骨再生と血管新生

AFS で骨芽細胞と血管内皮細胞を共培養すると、2 種の細胞は培養初期、ミクロ気孔を利用して AFS 表面で増殖するが、培養時間の経過と共に細胞間の相互作用を利用して AFS 内部へ侵入した。この時、マクロ気孔外周部に細胞が多く集積することから、優先的に骨分化が進行しているものと考えられる。さらに培養を続けると、互いの細胞から供給される増殖因子により、毛細血管様構造が形成され、骨形成、血管新生を促進していると考えられる。しかし、毛細血管様構造の形成は AFS 表面を中心に起こっていたため、より内部へ血管が侵入可能な材料設計を施す必要があった。そこで、骨組織の再生を目的に、軟骨再生や血管新生能のある多機能な成長因子である結合組織成長因子 CTGF に着目した。CTGF は、分泌性の増殖促進因子で、その生物学的機能として細胞接着・増殖・分化の促進、細胞外マトリックス形成への刺激、血管形成への関与などがあげられる[2]。この血管新生能を有する CTGF を AFS へ担持させ、血管新生を誘導するスキャフォールドを作製した。In vitro において、MG-63 および HUVEC を共培養し、CTGF を処理した結果、CTGF を処理することにより、HUVEC の減少する割合を抑制すること可能であることが分かった。また、共培養時の ALP 活性は処理した CTGF 濃度に依存して、増加する傾向があることが明らかになった。さらに、骨分化関連遺伝子の発現レベルを定量 PCR により測定した結果、骨分化中期の分化マーカーである ALP、後期のマーカーである OC の発現レベルが CTGF 処理に伴い増加した。これらの結果は、骨芽細胞と血管内皮細胞を共培養し、CTGF を処理すると、骨分化や血管新生が促進されることを示した。そこで、CTGF 担持 AFS の血管新生能と骨再生能を調査するために兔脛骨へ CTGF_AFS を 8 週間インプラントした。その結果、CTGF を担持しなかった AFS に比べ、CTGF_AFS ではスキャフォールド周囲で骨と直接結合する割合が高かった。さらに、スキャフォールド内部への細胞侵入性が高く、石灰化骨の存在量が多いことが明らかになった。また、CTGF_AFS ではスキャフォールド中心部にも多くの細胞が侵入しており、CTGF が細胞や血管の侵入を誘導している可能性が示された。以上の結果から、CTGF_AFS は複雑な再生の場の環境を模倣しており、立体的な硬組織の再生を実現できる材料であると考えられる。

< 引用文献 >

- [1] M. Aizawa, H. Shinoda, H. Uchida, I. Okada, T.J. Fujimi, N. Kanzawa, H. Morisue, M. Matsumoto, Y. Toyama, *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 268-273 (2004).
- [2] M. Takigawa, *J.Cell Comm. Signal.* **7**, 191-201 (2013).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. K. Suzuki, K. Nagata, T. Yokota, M. Honda, M. Aizawa, “Histological evaluations of apatite-fiber scaffold cultured with mesenchymal stem cells by implantation at rat subcutaneous tissue”, *Bio-Med. Mater. and Eng.*, **28**, 57-64 (2017). DOI 10.3233/BME-171656
2. H. Nishikawa, M. Honda, T. Yokota, Y. Shimizu, M. Aizawa, “Preparation of spherical Zn-substituted tricalcium phosphate powder by ultrasonic spray-pyrolysis technique and its characterization”, *J. Nanomater.*, **2016**, 1-8 (2016).

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Michiyo Honda, Mamoru Aizawa, “Direct cell-to-cell interaction between osteoblasts and endothelial cells promoted osteogenesis and angiogenesis”, 16th Australasian Bioceramics Symposium
2. 本田みちよ, 相澤守, “血管新生誘導に伴う骨分化の変化”, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016
3. 本田みちよ, 相澤守, “アパタイトファイバースキャフォールドにおける血管形成と骨分化”, 第 132 回無機マテリアル学会学術講演会
4. 本田みちよ, 相澤守, “アパタイトファイバースキャフォールドにおける骨芽細胞と血管内皮細胞の局在”, 日本セラミックス協会 2016 年年会
5. 本田みちよ, 相澤守, “三次元培養スキャフォールドを用いた骨組織再生における血管内皮細胞と骨芽細胞の関係”, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会
6. 本田みちよ, 中村まり子, 相澤守, “アパタイトファイバースキャフォールドにおける血管内皮細胞と骨芽細胞の共培養”, 日本セラミックス協会第 27 回秋季シンポジウム
7. M. Honda, M. Aizawa, “Enhancement of osteogenesis in coculture of endothelial cells and osteoblasts in three-dimensional apatite-fiber scaffold”, 15 th Asian BioCeramics Symposium (ABC2015).
8. 本田みちよ, 中村まり子, 相澤守, “三次元スキャフォールドを用いた血管新生制御による骨組織の再生”, 第 36 回日本バイオマテリアル学会

〔図書〕(計 4 件)

1. 相澤守, 本田みちよ, “細胞培養の基礎知識と細胞培養基材の利用・開発の留意点”, 情報機構, 2016.
2. 相澤守, 松浦知和, 本田みちよ, “再生医療用足場材料の開発と市場: 第 12 章アパタイトファイバースキャフォールド”, NTN, 2016.
3. 本田みちよ他, 監修: 大政健史, 福田淳二 “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~”, シーエムシー出版, 2015.
4. 相澤守, 松浦知和, 本田みちよ, “三次元ティッシュエンジニアリング: 第 1 編第 2 章第 9 節 硬組織のためのスキャフォールド”, NTN, 2015.

6. 研究組織

(1)研究代表者

本田 みちよ (HONDA, Michiyo)
明治大学・理工学部・准教授
研究者番号: 20384175