

20020465

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 上 田 実

平成 15 (2003) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究 上田 実	-----1
--------------------------------	--------

II. 分担研究報告

1. 未分化間葉系細胞・幹細胞培養に関する研究 島 賢一郎	-----8
2. 超音波刺激による軟骨分化誘導促進に関する研究 鳥居 修平	-----10
3. 細胞の大量培養システムの確立に関する研究 小林 猛	-----12
4. 骨組織マトリックスの作成に関する研究 高井 治	-----14
5. 糖鎖結合型材料に関する研究 小林 一清	-----17
6. 軟骨再生における至適材料評価に関する研究 木全 弘治	-----19
7. マトリックスの改良および開発に関する研究 春日 敏宏	-----21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----26

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

主任研究者 上田 実 名古屋大学大学院医学研究科頭頸部・感覚器外科学講座 教授

研究要旨

ティッシュエンジニアリングは、生きた細胞を用いて移植組織が作製できる極めて優れた方法として世界的に注目されている。今回骨、軟骨組織の再生に着目し、これらティッシュエンジニアリングの手法を用いた骨系統疾患患者の治療方法を確立しようとするものである。本研究の特徴は、基礎的研究から臨床応用まで一貫して検討することにある。今年度は、主に未分化間葉系細胞の細胞生物学的特徴を明らかにすることで有用な培養および骨、軟骨への分化誘導法につなげる研究と、流動型マトリックスを用いた骨再生の臨床応用を行った。また、培養骨膜による骨再生を大型動物疾患モデルにて行い効果を確認した。

分担研究者

畠賢一郎 名古屋大学医学部附属病院遺伝子・再生医療センター 助教授

鳥居修平 名古屋大学医学部形成外科 教授

小林 猛 名古屋大学大学院工学研究科生物機能工学専攻生物プロセス工学講座 教授

高井 治 名古屋大学理工科学総合研究センター 教授

小林一清 名古屋大学大学院工学研究科生物機能工学専攻生体材料工学講座 教授

木全弘治 愛知医科大学分子医科学研究所 教授

春日敏宏 名古屋工業大学工学部材料工学科ハイブリッド機能機構学講座 助教授

A. 研究目的

国民が高度な医療を享受してゆくためには、細胞組織工学（ティッシュエンジニア

リング）を基礎としたヒト組織の再生技術とそのための基盤的技術を早急に確立させ、再生医療用製品生産に関わる産業の発展を促進させることが必要不可欠である。本研究開発は、多種類の細胞を生体中にある状態と同様に組織化し、組織・臓器の持つ高次な機能を再現するための細胞組織工学技術を確立するとともに、再生した細胞組織を用いての各種生理活性物質、例えばサイトカイン、各種成長因子、血清等の生産にも寄与する等、広範な分野での新規産業の創出に資するものである。

近年注目されているティッシュエンジニアリング技術を用い、自家あるいは同種の骨移植にかわりうる、新しい人工骨あるいは軟骨材料を開発し臨床応用に至る道筋を拓くことが本研究課題の主眼である。以下、本研究の具体的目標として、骨、軟骨組織に分けて述べる。

骨：整形外科または顎顔面外科においては欠損した骨の再建を日常臨床として行っている。現在までの研究により骨形成能を有する細胞を培養増殖することが可能となり、これらを用いた人工骨への可能性は高い。したがって本研究課題としては、これらマトリックスの開発を含めた細胞の移植方法の確立が主なテーマである。

軟骨：現在までに軟骨形成能を有したままでの軟骨細胞の大量培養法は確立されていない。これは軟骨細胞の分化と増殖の制御が困難であることに由来する。本研究ではその前半でこれら軟骨細胞の大量培養法を試みる。その方法としてはバイオリクターを用いた培養や、メカニカルストレス下での培養を試みる。またこれら培養軟骨細胞を種々のマトリックスを用いて生体に移植し、関節軟骨を作成する。

さらに、未分化間葉系細胞を分離し、それらを骨および軟骨に分化させる因子の解明を行っていく。本研究の成果いかんでは、推定1000万人ともいわれる重症骨系統疾患患者の運動機能の回復に大きく貢献すると確信する。また本研究では最終的に臨床応用することを強く意識し、臨床現場で有効かつ使用が簡便な材料形状を念頭に置いた人工骨の開発を目指すことを付言したい。

B. 研究方法

骨髄由来ヒト間葉系幹細胞の細胞機能研究

骨髄のMSCに関しては、より効率的かつ大量採取する方法、培養条件下にお

ける骨芽細胞への分化促進の方法、移植に用いるマトリックスの検討を加え、より効率的な骨形成率実現させる。従って動物実験レベルでの移植実験を継続して行い、骨形成率を詳細に検討する。また、遺伝子レベル(RNA)での検討も行う予定であり、細胞接着因子と骨分化誘導との関係をALP, Osteocalcin, CBFA-1, BMP2 遺伝子の発現を定量する。また各サイトカイン、機械刺激、酸素分圧等による骨、軟骨分化に及ぼす影響について骨、軟骨マーカーにより生化学的に測定を行う。これらにより、この細胞を用いた組織作成上の指針となるデータが得られるものとする。

骨再生に関する研究

注入型マトリックスの検討を引き続き行う。臨床的操作性を考えるとブロック状のマトリックスより注入型マトリックスが有利であるが、生きた細胞周囲に密な無機化合物が存在することは、これら細胞の呼吸および代謝を行う上で問題が生じる。このことはブロック状のマトリックス、注入型マトリックスの両者の動物移植実験で実証されている。これら注入型マトリックスの移植後の組織学的検討を中心に、流動性マトリックスを評価する。その上で多血小板血漿、基材、 β -TCP粉末の混合比や移植方法などの検討を行っていく。同時に、これらの注入型骨とブロック骨の臨床応用に向けて総括し、治療体系を確立する。また、整形外科領域における応用を考え、体幹における長幹骨への応用のために強度の大きいブロック状マトリックスを開発する。

軟骨再生に関する研究

大量培養法の確立を目的に、バイオリクターおよび種々のメカニカルストレス刺激装置を作成し、軟骨細胞の分化および増殖制御を検討する。軟骨細胞のマーカーを指標に、より多くの組織を作製できるよう超音波刺激および酸素分圧等による細胞変化について生化学的解析を行う。メカニカルストレスにおいてはストレスの種類やさらに詳細な作用時間、作用回数、培養期間の検討を、移植実験を含めて行っていく。前年度までの結果をもとにスポンジ型および注入型マトリックスについて最適なものを決定する。これらを通じて臨床応用に向けた総括を行い、治療体系を確立する。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト組織の取り扱いについては、組織採取を行う場合、手術時に余剰となったものを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、患者プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。また、動物実験については名古屋大学動物実験指針に基づき、学内動物実験委員会にて承認された内容を遵守して行った。

C. 研究結果

われわれは、これまで動物の骨髄由来細胞から骨形成能を有する細胞を分離培養し、移植実験を行ってきた。その結果移植された培養細胞は十分な骨形成能を

有し再生骨を得ることができた。この研究に用いた硬組織マトリックスとしては主にブロック型カルシウムリン酸化合物を用いており、生分解性材料として興味深い知見を得てきた。本年度の研究結果を骨、軟骨および幹細胞に分けて述べる。

骨再生に関する研究

流動型マトリックスを用いた注入型人工骨作製研究では、イヌ下顎骨へ骨欠損を作成し新たな担体としてフィブリン糊、添加する因子として PRP を調製し、それぞれを組み合わせることで評価を行ってきた。MSC を加えることで、担体のみのコントロール群と比較して早期に骨化が認められた (Yamada et al., 2003)。また、家兎の上顎洞底部にアルギン酸、あるいは β -TCP、フィブリン、および独自に開発したリン酸カルシウム製剤(CPC)などと骨芽細胞に分化させた MSC の組み合わせで、従来行ってきたヒト腸骨海面骨移植に匹敵する骨密度の再生骨を得ている。以上の結果をもとに、倫理委員会に注入型人工骨の臨床応用に関する申請を行い、平成14年度に3名の患者に注入型人工骨による骨再生治療を行った。症例は、歯槽骨の延長を培養骨で行うもの1例と、上顎洞底に骨作成を行ったもの2例である。人工歯根周囲に骨の再生を認めており、現在長期経過の観察中である。

培養骨膜を用いた骨再生では、イヌ下顎骨の歯周病モデル(歯根分岐部の骨欠損)に対して有意な骨再生を認め、第5回国際組織工学会にて報告を行った

(Mizuno et al., 2002)。培養骨膜を用いた歯周病患者への骨再生治療については平成14年度に倫理委員会での審査を終えた。その後平成15年度になって、口唇口蓋裂患者に最初の臨床応用が行われた。

軟骨再生に関する研究

自動加圧およびビーズを用いた大量自動培養装置（バイオリアクター）の開発を行ってきたが、平成14年度は引き続き機械的刺激によるMSCの軟骨細胞への分化誘導促進の可能性について検討を行った。ペレット状に培養したMSC由来細胞に、増殖因子による分化刺激の後超音波刺激を与えたところ、再生軟骨中のアグリカン量が上昇した。条件の最適化を行い、1日10分間、30 mW/cm²の出力でアグリカン量は約2.2倍に上昇することが明らかとなった。

一方、流動型をはじめとした新たな再生軟骨用担体の開発では、3Dスポンジ型ではPGA、poly lactate-e-caprolactoneの共重合体のほか、流動性担体を用いて軟骨再生の可能性について検討を行ってきた。PGA, caprolactoneでは良好な軟骨形成が認められたため、本年論文化を行った（Honda et al., Biomaterial in press）。

骨髄由来ヒト間葉系幹細胞の細胞機能研究

これまで未分化間葉系幹細胞(MSC)の採取および培養方法を確立するために、培養中のMSCの各種生理活性物質に対する反応性を評価してきた。また、各種物理的刺激因子、特にメカニカルストレスに対するMSCの挙動変化を検討して

きたが、平成14年度にはメカニカルストレスによる分化誘導のメカニズムを解析し、NF- κ Bを介する細胞内のシグナルトランスダクションが活性化されることを明らかとした。この事実は、今後未分化間葉系幹細胞の大量培養における至適条件設定に役立つものと考えている。

一方、臍帯血、末梢血中に存在するごく少量の間葉系幹細胞の採取、分離、培養技術の確立を目指して実験を試みた。骨髄より培養されたMSCから、その細胞の特異的細胞表面マーカーを、FACSにより検討を行ってきた。CD29, 44, 73, 105, 166 positive抗体として、CD14, 34, 45をnegative抗体として使用することにより、MSC分画が認識されることを示したが、それらの細胞からの十分な増殖や骨芽細胞への分化能が得られていない。そのため、平成14年度には表面マーカーによる選択培養のみでなく、高密度培養による幹細胞の増殖を検討した。マグネタイトリポソームを細胞に取り込ませて磁石を用いて未分化間葉系幹細胞の高密度培養を行い、通常の培養法と比較して約5倍の速度で増殖することを見いだした。

D. 考察

近年組織工学的技術を用いた製品開発が世界的に行われているが、本研究分野の製品は未だ開発途中であり、完成品と言われるような製品は創出されていないのが現状である。今後、1000万人ともいわれる重症骨系統疾患が対象となることを考慮すると、本研究の成果は新たな骨再生治療の創出につながると期待しており、ひいては世界的な製品市場の開拓も

見込まれる。

注入型人工骨については、今後は症例を増やすことで、適応の拡大を目指すとともに長期予後について検討をおこなうことで、治療法としての確立が期待される。また、培養骨膜を用いた骨再生治療についても、臨床応用を開始することで、有用性を検証することが可能となるであろう。

軟骨の再生については、確立された MSC からの至適培養条件と、新たな担体との組み合わせで、新たな軟骨再生法の創出につながるものである。これまでの実験条件をもとに *in vivo* での軟骨再生法を確立した後、動物モデルを用いて関節部の軟骨欠損の治療を行い、臨床応用につなげることで成果の活用につなげたい。

現在、MSC マーカーに対する抗体マグネタイトリポソームを用いて、末梢血や臍帯血などからの MSC の効率的単離培養法の確立が重要となっている。本年度の研究成果にて、通常の培養法と比較して5倍の速度で、最も増殖が困難な初期の培養を行うことが可能となった。今後他の分化誘導因子やサイトカインによる刺激を併用することで、臍帯血や末梢血からの効率的な MSC の培養法の創出として成果が還元されるものと期待される。

E. 結論

本研究課題では、自家あるいは同種の移植に代わりうる、新たな骨、軟骨の再生医療の実用化について研究成果が得られた。注入型人工骨および培養骨膜シートを用いた骨再生は、顎顔面外科領域で臨床応用の段階に達している。軟骨につ

いても、メカニカルストレスによる分化誘導を併用することで、より確実な再生治療の可能性が示された。今後は臨床例の増加とともに長期経過についても観察し、安定した治療につながるものと期待される。また、歯科用インプラント治療の治癒期間短縮や歯周病患者など、幅広い応用を進めることとしている。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

論文発表

Yamada Y, Ueda M, et al.: Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. J. Cranio-fac. Surg. in press

Maeda H, Kasuga T, Nogami M, Hibino Y, Hata K, Ueda M, Ota Y: Biomimetic apatite formation on poly (lactic acid) composites containing calcium carbonates. J Mater Res 17(4): 727-730, 2002

Boo J S, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K, Yoshikawa T, Sugiura Y, Ueda M: Tissue engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. J Cranio-fac. Surg. 13 231-239, 2002

Itano N, Yamada Y, Miyaiishi O, Senga T, Hamaguchi M, Kimata K: Abnormal accumulation of hyaluronan matrix

diminishes contact-inhibition of cell growth and promotes cell migration. Proc Natl Acad Sci USA; 99:3609-3614, 2002

(分担研究者)

(畠 賢一郎)

Maeda, H., Kasuga, T., Nogami, M., Hibino, Y., Hata, K., Ueda, M., Ota, Y. Biomimetic apatite formation on polylactic acid composites containing calcium carbonates

Journal of Materials Research, (as a Rapid Communication)(in press)

Boo JS, Yamada, Y., Okazaki, Y., Hibino, Y., Okada, K., Hata, K., Yoshikawa, T., Sugiura, Y., Ueda, M. Tissue Engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold J. Cranio-fac. Surg. (in press)

(鳥居 修平)

Toriyama, K. Torii T. et al. Endogenous adipocyte precursor cells for regenerative soft-tissue engineering. Tissue Engineering 8:157-168 2002

(小林 猛)

Ito A, et al.: Proliferation and stratification of keratinocyte on cultured amniotic epithelial cells for tissue engineering. J. Biosci. Bioeng. 95(4), in press (2003).

Ito A, et al.: Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. J. Biosci. Bioeng. 95(2), 196-199 (2003)

(高井 治)

K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and O. Takai, Hydroxyapatite Coating on Titanium by Thermal Substrate Method in Aqueous Solution, J. Biomed. Mater. Res. Vol. 59, No.2 (2002)

390-397

K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and O. Takai, Effects of Ion Concentration and pH on Hydroxyapatite Deposition from Aqueous Solution onto Titanium by the Thermal Substrate Method, J. Biomed. Mater. Res. Vol. 61, No. 3 (2002) 354-359

M. Okido, K. Nishikawa, K. Kuroda, R. Ichino, Z.W. Zhao and O. Takai, Evaluation of the Hydroxyapatite Film Coating on Titanium Cathode by QCM, Mater. Trans. Vol. 43, No. 12 (2002) 3010-3014

K. Kuroda, Y. Miyashita, R. Ichino, M. Okido and O. Takai, Preparation of Calcium Phosphate Coatings on Titanium Using the Thermal Substrate Method and Their in vitro Evaluation, Mater. Trans. Vol. 43, No. 12 (2002) 3015-3019

M. Okido, K. Kuroda, M. Ishikawa, R. Ichino and O. Takai, Hydroxyapatite Coating on Titanium by Means of Thermal Substrate Method in Aqueous Solutions, Solid State Ionics, Vol. 151 (2002) 47-52

J.M. Gomez-Vega, K. Teshima, A. Hozumi, H. Sugimura and O. Takai, Mesoporous Silica Thin Films Produced by Calcination in Oxygen Plasma, Surface and Coatings Technology, in press (2003)

(木全 弘治)

M. Honda, T. Yada, M. Ueda, K. Kimata. Cartilage formation by cultured chondrocytes in a new scaffold made of poly (L-lactide-ε-caprolactone) sponge.

J Oral Maxillofac Surg 2000;58:767-775.

M. Yoshida, N. Itano, Y. Yamada, K. Kimata. In vitro synthesis of hyaluronan by a single

protein derived from mouse HAS1 gene and characterization of amino acid residues essential for the activity. *J Biol Chem* 2000;275:497-506.

N. Itano, Y. Yamada, O. Miyaishi, T. Senga, M. Hamaguchi, K. Kimata.

Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact-inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA*

2002;99:3609-3614.

Honda M., Morikawa N., Hata K., Yada T., Morita S., Ueda M, and Kimata K. Rat costochondral cell characteristics on poly (L-lactide-co-e-caprolactone) scaffolds

Biomaterials 2003;in press

(春日 敏宏)

• T. Kasuga, H. Maeda, K. Kato, M. Nogami, K. Hata, M. Ueda: Preparation of poly(lactic acid) composites containing calcium carbonate (vaterite), *Biomaterials*, *in press*.

• H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, Y. Hibino, K. Hata, M. Ueda, and Y. Ota : Preparation of Bioactive Poly(lactic Acid) Composites Containing Calcium Carbonates, *Key Engng. Mater.*, **240-242**, 163-166 (2003).

• H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, Y. Hibino, K. Hata, M. Ueda, and Y. Ota: Biomimetic Apatite Formation on Poly(lactic Acid) Composites Containing Calcium Carbonates, *J. Mater. Res.*, **17**, 727-730 (2002).

(小林 一清)

Y. Miura, T. Ikeda, K. Kobayashi, Chemoenzymatically synthesized glycoconjugate polymers, *Biomacromolecules*, **4**, 410-415 (2003).

2. 学会発表

Mizuno H, Hata K, Wada K, Kogami H, Sojo K, Ueda M: Regeneration of alveolar bone by grafting autologous cultured membrane derived from periosteum. 5th annual meeting of the Tissue engineering society international 12.8-10, 2002, Kobe

Okada K, Yamada Y, Kogami H, Hata K, Ueda M : Mechanical stress up-regulates on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. 5th annual meeting of the Tissue engineering society international 12.8-10, 2002 Kobe

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

7. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特許出願

• 特願 2002-64235

「骨又は歯周組織形成用の組成物」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

分担研究者 畠 賢一郎 名古屋大学医学部附属病院遺伝子再生医療センター 助教授

研究要旨

今回われわれはMSCを骨細胞へ分化誘導した細胞を用いて、低出力超音波パルス (US) が細胞機能におよぼす影響を検索し、人工骨作製のための有用性を明らかにした。同時にNF- κ Bの活性化が見られリン酸化I κ Bの変動なども証明できたことより、超音波刺激による分化促進効果のメカニズムにおける一因を証明することができた。

A. 研究目的

最近の研究により超音波刺激による骨形成促進効果が明らかとなり、周知の通り臨床応用に至っている。このような経緯によってわれわれはMSCの骨形成促進を目的として、培養中に超音波を応用してきた。本報告ではこれら超音波刺激によりもたらされる細胞変化についてそのメカニズムを含めて考察を加え、さらに再生医学における人工骨作製において超音波刺激の有用性について言及したい。

B. 研究方法

骨芽細胞様細胞に分化したMSCについて低出力超音波パルス (US) (15 mW/cm²) を加え、アルカリフォスファターゼ、細胞内カルシウム量、オステオカルシン、オステオポンチン、オステオネクチンなどの各種分化マーカーを指標として細胞の骨形成能の変化を観察した。また、超音波刺激によるこれら細胞変化をもたらすメカニズムの一因を明らかにするために、NF- κ B, I κ -Bの活性化について検討を行った。

(倫理面への配慮)

組織採取を行う場合、手術時に余剰とな

ったものを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。

C. 研究結果

低出力超音波パルス(LIPUS)を7日間持続的に付加したものは対照群と比較して各骨基質マーカーが1.5~2倍上昇しており、MSCから骨芽細胞へ分化途中にある細胞にとって、LIPUSが分化を促進する効果がある事が示唆された。また、分化促進メカニズムの一因としてLIPUS刺激によりNF- κ Bの活性化およびI κ Bのリン酸化が促進されており、細胞内シグナル伝達への影響が示唆された。

D. 考察

NF- κ Bの核移行が進むことにより細胞分化や増殖を制御する各種サイトカインや調節因子が転写開始されることが言われている。またこのことは前年までに明らかに

した酸化ストレスによる分化促進の仮説にも一致する。

E. 結論

LIPUS 刺激により、MSC から骨芽細胞への分化を促進する能力があることが分かった。その一因として NF- κ B の関与が示唆された。このことは MSC から骨組織を作製する際、物理刺激をかけることにより、より効率的に移植材料を作製することができる可能性がある。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生しておりません。

G. 研究発表

1. 論文発表

Maeda H, Kasuga T, Nogami M, Hibino Y, Hata K, Ueda M, Ota Y: Biomimetic apatite formation on poly (lactic acid) composites containing calcium carbonates. J Mater Res, 17(4): 727-730, 2002

Boo J S, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K, Yoshikawa T, Sugiura Y, Ueda M: Tissue engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. J Craniofac Surg, 13 231-239, 2002

2. 学会発表

Okada K, Yamada Y, Kogami H, Ueda M, Hata K, Mechanical Stress Up-Regulates on Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells *In Vitro* Tissue engineering Dec 8-10 2002 Kobe

Mizuno H, Hata K, Wada K, Kogami H, Sojo K, Ueda M: Regeneration of alveolar bone by

grafting autologous cultured membrane derived from periosteum. 5th annual meeting of the Tissue engineering society international 12.8-10, 2002, Kobe

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

総括研究報告書に記す

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

分担研究者 鳥居 修平 名古屋大学医学部形成外科 教授

研究要旨

間葉系幹細胞（MSC）から軟骨細胞へ分化させ、低出力超音波刺激（LIPUS）を加えたときの、軟骨マーカーの変動について検討を行った。ペレット中のタンパク量、DNA、細胞数などに、LIPUS の影響はなかったものの、軟骨基質アグリカン量の増加が見られた。MSC から軟骨細胞への分化過程に超音波を当てることにより軟骨分化誘導を促進することが明らかになった。

A. 研究目的

軟骨は血管および神経支配がなく、また軟骨細胞自体も特有の細胞外基質に囲まれており、一度損傷するときわめて自己修復の難しい組織である。MSC は人為的に軟骨細胞へと分化させることができるため、多量の軟骨細胞を調製しうる材料として注目されている。われわれは成熟した機能軟骨の形成をめざして、軟骨分化へ誘導した MSC を用いて軟骨マトリックスの形成に対する低出力超音波パルスの影響を検討した。

B. 研究方法

MSC からペレット培養で軟骨細胞へ分化させ、一日10分間、毎日1週間 LIPUS を加えたときの、軟骨マーカーの変動について検討を行った。測定項目は組織学的検査、アリューシャンブルー染色、免疫染色、基質アグリカン量を測定した。また超音波の出力の強さの至適化実験を行った。

（倫理面への配慮）

組織採取を行う場合、手術時に余剰とな

ったものを利用することを原則に、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。さらにこれら説明文、同意書については名古屋大学倫理委員会にて承認されたものを用いた。また、採取したすべての組織については、プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。

C. 研究結果

軟骨細胞に分化したペレット中において、LIPUS 刺激群において、タンパク量当たりの基質アグリカン量が有意に増加していた。それぞれのペレット中のタンパク量、DNA、細胞数などに、LIPUS の影響はなかった。LIPUS の至適出力実験の結果から 30mW/cm² が最も基質アグリカン量の増加が見られた。アリューシャンブルー染色、2型コラーゲン免疫染色の結果からもこの結果を示唆するデータが得られた。

D. 考察

MSC から軟骨へ分化を試みた細胞において、軟骨マーカーであると言われてい

るアリューシャンブルー染色、2型コラーゲン免疫染色、基質アグリカン量の上昇が認められた。この変化が LIPUS 刺激により増強されたことより、軟骨分化を促進することを見いだした。このことより、低出力超音波パルスが、人工軟骨作成の上で有用である事が示唆された。

E. 結論

LIPUS 刺激が MSC の軟骨マトリックス形成を促進することを見だし、この方法が軟骨再生に有用であることが明らかになった。現在超音波によるメカニズムについて、細胞内シグナル伝達経路を解析中である。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生しておりません。

G. 研究発表

1. 論文発表

Toriyama K, Torii T. et al. Endogenous adipocyte precursor cells for regenerative soft-tissue engineering. *Tissue Engin* 8, 157-168, 2002

Tajima R, Kawaguchi N, Horino Y, Takahashi Y, Toriyama K, Inou K, Torii S, Kitagawa Y. Hypoxic enhancement of type IV collagen secretion accelerates adipose conversion of 3T3-L1 fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1540, 179-87, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

総括研究報告書に記す

分担研究者 小林 猛 名古屋大学大学院工学研究科 教授

研究要旨

骨および軟骨再生のために、MSC（間葉系幹細胞）の新規培養法の開発を行った。MSCに正電荷脂質包埋型マグネタイト（MCL; magnetite cationic liposome）を添加して、MSCを磁化させることで、磁石を用いてMSCを高密度に播種することができた。このことによって、細胞自身の持つオートクライン作用によって、細胞増殖が活発になった。この方法によって細胞を高密度播種（1000 cells/cm²）したものは、MCLと磁石を用いなかったもの（播種密度: 1000 cells/55cm²）の5倍の細胞数を得ることができた。この新しい細胞培養技術は、MSCだけでなく、体内にごくわずかにしか存在しない幹細胞等を大量培養するために非常に有用な技術であると考えられる。

A. 研究目的

骨・軟骨細胞の供給源として、MSC（間葉系幹細胞）を大量に培養する方法の開発を行った。MSCは骨髄中に、全細胞の0.0005-0.01%程度と非常に低い割合でしか存在しない。これは、骨髄液1mlに対して、MSCは1000個しかないことを意味している。現在のMSCの培養法は、例えば骨髄液を1ml採取して、これを培地で5倍程度希釈して、55-75cm²ほどの広さの培養皿で培養する。これでは播種細胞密度が1000 cells/55-75cm²となり、非常に低密度になる。そこで、本研究ではMSCの高密度播種による細胞のオートクライン作用を利用した大量培養法の開発を行った。酸化鉄の磁性微粒子マグネタイトを用いてMSCを磁化し、磁石を用いてMSCを高密度に集積させることで高密度播種する。このことによって、細胞数が少ないことで増殖が悪いMSCの細胞増殖が活性化されるかについて調べた。

B. 研究方法

磁性微粒子を正電荷脂質二重膜で包埋したMCL(Magnetite cationic liposome : 図1)をMSCに添加した。MCL添加後、細胞数1000個のMSCを培養面積55cm²の培養皿に播種した。播種の際に、上面の面積が12cm²の円柱状ネオジ磁石(0.45T)を培養皿底面に設置した。対照群として、MCLを添加せず、磁石を設

置しない細胞を用いた。磁石を設置して、7日後の細胞数を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、in vitroの実験であることから、特に倫理面に問題は生じない。

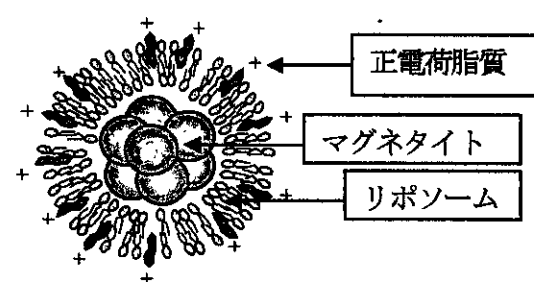


図1. MCLの概略図

C. 研究結果

MCLは4時間後に添加量の20%がMSCに取り込まれることが、マグネタイト濃度測定を行うことで分かった。このMCLによって、細胞は磁化され、磁石を設置した培養皿表面に二時間ほどで接着した。細胞が接着した面積を画像処理によって求めると約1cm²だった。このことから、細胞を磁石で集積させると1000 cells/cm²の密度で細胞を播種することができる。一方、対照群では細胞密度が1000 cells/55cm²と見なせることから、55倍の高密度で細胞を播種す

ることができると言える。一方、播種して7日後の細胞数を測定したところ、磁石を用いた培養では、対照群と比べて、約5倍の細胞数を得ることができた(図2)。

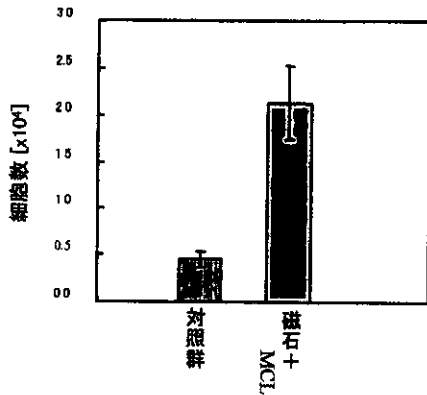


図2. 磁石を用いた高密度播種による細胞増殖の促進

D. 考察

本研究では、MSCを集積させるために、MCLを用いている。MCLのMSCに対する毒性については、増殖に対する影響と、骨芽細胞と脂肪細胞への分化に対する影響を調べたが、それぞれに対する毒性は見られなかった。このことから、MCLはMSCの培養に影響しないと考えられる。

本実験では対照群として、1000個のMSCを55cm²の培養皿に播種した群を用いた。これは、骨髓液1mlを55cm²の培養皿に播種するといった従来法に対応している。この従来法と比較して、MCLを用いて高密度播種することで、約5倍の細胞数を得ることができた。

この技術はMSCに限らず、幹細胞をはじめとする他の正常細胞にも応用できることから、この技術は再生医学にとって、非常に重要な技術になりうる。

E. 結論

MCLを用いたMSCの培養法を開発した。磁石で細胞培養面積を設定することによって、MSCを従来法の55倍の密度で播種することができた。この方法により、培養7日後に従来法の約5倍の細胞数を得ることができた。我々が確立したこの技術は、体内で細胞数が非

常に少ない幹細胞等を効率的に大量培養できる技術として有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito A, et al.: Proliferation and stratification of keratinocyte on cultured amniotic epithelial cells for tissue engineering. J. Biosci. Bioeng. 95(4), in press (2003).
- 2) Ito A, et al.: Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. J. Biosci. Bioeng. 95(2), 196-199 (2003)

2. 学会発表

- 1) 滝沢洋平ら：トランスグルタミナーゼゲル化法による新規創傷被覆材の開発、日本生物工学会(於：大阪)、2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2003-046060 号

「細胞培養方法」

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

分担研究者 高井 治 名古屋大学理工科学総合研究センター 教授

研究要旨

新しい骨形成マトリックス作製のために、特に無機材料を中心として研究開発を行った。すなわち、バイオミメティック・プロセスにより、シリカ系のナノ細孔薄膜を合成し、バイオガラスと組み合わせることにより人工的骨組織マトリックスとして応用することを目的とした。新たに合成した、ナノ細孔材料の一種であるシリカ系のMPS膜は、人工体液中でのアパタイト形成能力が優れていることが判明した。今後、MPSを骨組織形成に応用をはかり、その再生医療用材料としての評価を進める予定である。

H. 研究目的

本研究では、バイオミメティック・プロセスにより、シリカ系のナノ細孔薄膜を合成し、バイオガラスと組み合わせることにより人工的骨組織マトリックスとして応用することを目的とする。トリブロックコポリマーまたは界面活性剤をテンプレートとする方法により、有機-無機複合薄膜を合成し、その後、有機物を除去することにより、メソポーラスシリカ（MPS）薄膜を作製した。有機物除去法として、フォトカルシネーション法を開発した。本方法が、ナノ細孔構造制御に、またアパタイト形成に、従来の熱カルシネーション法や溶媒抽出法より優れていることを実証する。

I. 研究方法

メソポーラスシリカ（MPS）膜は、トリブロックコポリマーまたは界面活性剤（CTAC）ミセルをテンプレートとして合成した。Xeエキシマランプにより発生

した真空紫外光（ $\lambda=172\text{nm}$ ）を照射するフォトカルシネーション法により、シリカ-界面活性剤メソ構造体内部のポリマーまたは界面活性剤を除去した。従来の方法における剥離、クラック、周期構造の乱れが生じやすいという問題点の解決を目指した。フォトカルシネーションと熱カルシネーションの2種類の処理方法の違いが、MPS薄膜の周期構造、組成、膜体積に与える影響について調べた。MPS膜のアパタイト形成能力を、人工体液中に浸せきすることにより評価した。

使用した手順を、図1に示す。

（倫理面への配慮）

本研究では、生体に関する実験は一切行っていない。

J. 研究結果

コポリマーまたは界面活性剤除去の有無を赤外吸収分光で調べた結果、フォトカルシネーションにより効果的に、コポ

リマーと界面活性剤が除去されたことが判明した。また、X線回折の結果、フォトカルシネーションでは、熱カルシネーションに比べ、周期構造の乱れ、細孔径・膜体積の収縮が小さいことがわかった。また、ガラス基板上においても優れた配向性を示すことが判明した。人工体液中でのアパタイト形成を行った結果を、図2に示す。37℃で7日後の表面観察結果である。アパタイト形成が観察される。

K. 考察

MPS上での形成物をFT-IRによる赤外吸収分光にて調べた。この解析結果より、MPS上へのアパタイトの形成が認められた。MPSを被覆していないガラス上には、アパタイトが形成しなかった。このことから、MPSはバイオアクティブな性質を有している。また、MRS上では、高速で、アパタイト形成が行えることがわかった。これらの理由については、検討中である。

L. 結論

フォトカルシネーションは、従来の方法に比べ、MPS薄膜のコポリマーおよび界面活性剤の除去において周期構造の維持が行える新しい方法であり、ナノ細孔薄膜合成に有用である。新たに合成した、ナノ細孔材料の一種であるシリカ系のMPS膜は、人工体液中でのアパタイト形成能力が優れていることが判明した。今後、MPSを骨組織形成に応用をはかり、その再生医療用材料としての評価を進めることが重要である。

M. 健康危険情報

本研究を通じて、健康に危険をもたらす事項を認めていない。

N. 研究発表

1. 論文発表

K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and O. Takai, Hydroxyapatite Coating on Titanium by Thermal Substrate Method in Aqueous Solution, *J. Biomed. Mater. Res.* Vol. 59, No.2 (2002) 390-397

K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and O. Takai, Effects of Ion Concentration and pH on Hydroxyapatite Deposition from Aqueous Solution onto Titanium by the Thermal Substrate Method, *J. Biomed. Mater. Res.* Vol. 61, No. 3 (2002) 354-359

M. Okido, K. Nishikawa, K. Kuroda, R. Ichino, Z.W. Zhao and O. Takai, Evaluation of the Hydroxyapatite Film Coating on Titanium Cathode by QCM, *Mater. Trans.* Vol. 43, No. 12 (2002) 3010-3014

K. Kuroda, Y. Miyashita, R. Ichino, M. Okido and O. Takai, Preparation of Calcium Phosphate Coatings on Titanium Using the Thermal Substrate Method and Their in vitro Evaluation, *Mater. Trans.* Vol. 43, No. 12 (2002) 3015-3019

M. Okido, K. Kuroda, M. Ishikawa, R. Ichino and O. Takai, Hydroxyapatite Coating on Titanium by Means of Thermal Substrate Method in Aqueous Solutions, *Solid State Ionics*, Vol. 151 (2002) 47-52

J.M. Gomez-Vega, K. Teshima, A. Hozumi, H. Sugimura and O. Takai, Mesoporous Silica Thin Films Produced by Calcination in Oxygen Plasma, *Surface and Coatings Technology*, in press (2003)

2. 学会発表

J.M. Gomez-Vega, H. Sugimura, O. Takai and A. Hozumi, Bioactive Mesostructured Silica Coatings, 2nd

International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-2), 2002. 1. 15-17, Nagoya, Japan, Organizing Committee of BMMP-2

J. M. Gomez-Vega, H. Sugimura, O. Takai and A. Hozumi, Bioactive Pure Silica Coatings with Ordered Nanostructures, International Workshop on Ceramic and Metal Interfaces, 2002. 6. 23-27, Oviedo, Spain, Spanish Ceramics Society

O. Takai, Wettability Control at Water/Solid Interface, International Workshop on Ceramic and Metal Interfaces, 2002. 6. 23-27, Oviedo, Spain, Spanish Ceramics Society

O. Takai, Plasma Processing for Biomimetic Materials, The Gordon Research Conference on Plasma Processing Science, 2002. 7. 21-26, Tilton, U.S.A, Gordon Research Conference

O. Takai, Advanced Plasma Coating Technologies, 5th Latin American Course on Plasma Processing of Materials, 2002. 8. 12-16, Buenos Aires, Argentina, JICA & CNEA

O. Takai, Biomimetic Materials Processing, The II-National Symposium on Surface Engineering and JIFI 2002, 2002. 11. 24-29, Caracas, Venezuela, Central University of Venezuela

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

European Patent Application EP 1252904A3

Date of Filing 24. 04. 2002

Precursors for active materials,

active materials using such precursors, and method for producing said active materials

Inventors: Sugimura Hiroyuki, Takai Osamu, Gomez-Vega, Jose Manual

Applicant: Nagoya University

Priority 25. 04. 2001 JP201128093

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

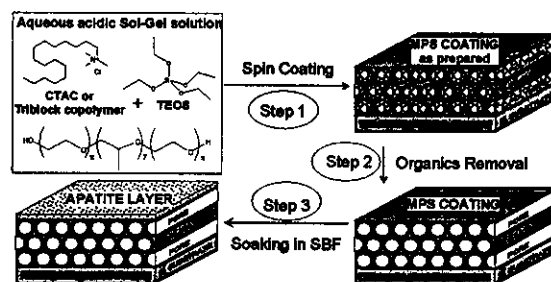


図1 本研究で使用した手順



図2 MPS上に形成したアパタイト

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

分担研究者 小林一清 名古屋大学大学院工学研究科 教授

研究要旨

組織工学技術の一環として、生体認識機能を発現する糖鎖を高分子材料に結合させることにより、生体適合性・生分解性に優れた細胞培養足場材料の開発を目指している。本年度は、酵素化学的合成と有機化学的合成の二つのアプローチにより合成した生分解性糖鎖高分子を用いて、細胞培養皿を表面修飾すると、肝細胞のすぐれた足場材料となることを明らかにした。また、糖鎖結合アルギン酸は血管新生に優れた効果を発現した。

A. 研究目的 細胞表層に存在するオリゴ糖鎖は、細胞間の情報伝達信号の役割を担っている。生体親和性にすぐれた生体吸収性の糖鎖高分子を合成すれば、再生医工学から強く要請されている細胞培養のための足場材料となる可能性を秘めている。高度な生体認識能を示すバイオマテリアルズを開発する。

B. 研究方法

酵素化学的合成：乳糖、麦芽糖の還元糖（ラクチトール、マルチトール）と、カルボン酸ジビニルエステルとをプロテアーゼやリパーゼなどの加水分解酵素を触媒としてエステル化反応を行った。

有機化学的合成：DL-リンゴ酸を出発原料としてβ-ベンジルマロラクトネートとβ-デシルマロラクトネートを合成した。この開環共重合および脱保護、ついでpAP配糖体との縮合を行い糖結合ポリ(β-リンゴ酸)を合成した。

アルギン酸多糖への糖鎖の結合による生

体機能材料の開発：培養細胞移植基材の開発を目的に、ラクトース、キトビオースを付加したアルギン酸塩を作製し、ヌードマウス背部皮下に移植し、その後の組織学的変化を評価した。

C. 研究結果

酵素化学的合成：プロテアーゼやリパーゼを触媒とすると、位置選択的エステル化が効率よく進行し、糖鎖高分子(PV-Lac、PV-Mal)を得ることに成功した。PV-Lacをコーティングした培養皿にて癌化肝細胞(HepG2)の接着実験を行ったところ、HepG2細胞の接着性が向上した。

有機化学的合成：糖結合ポリ(β-リンゴ酸)を培養皿にコーティングし、HepG2細胞、マウス線維芽細胞の接着培養実験を行った。その結果、糖結合ポリ(β-リンゴ酸)をコーティングした培養皿では細胞接着性が著しく向上した。

アルギン酸多糖への糖鎖の結合による生体機能材料の開発：ラクトース、キトビオ

ース添加アルギン酸においては周囲組織との親和性が高まっており（移植基材内に肉芽組織が多く形成され）、内部の血管新生能も更新していた。

D. 考察 酵素化学的合成により、重合官能基を有する糖モノマーを1段階で合成でき、その重合により簡便に糖鎖高分子(PV-Lac、PV-Mal)を得ることに成功した。ラクチトールを出発原料とする糖鎖高分子(PV-Lac)は、側鎖に β -Galを有するため、アシアロ糖タンパクレセプターを持つ肝細胞と特異的に接着することが考えられる。糖鎖結合アルギン酸は血管新生に優れた効果を発現し、移植細胞生存に有利な環境を与えたと考えている。

E. 結論 酵素化学的合成ではポリビニルアルコール型糖鎖高分子を、有機化学的合成ではポリエステル型糖鎖高分子を合成することに成功した。酵素触媒法を経て合成したPV-Lacは優れた肝細胞培養材料となることが示唆された。有機化学的合成による糖鎖高分子は、主鎖がエステル構造であるので、生分解性と高い細胞接着性を併せ持ち、優れた再生医工学材料となる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Y. Miura, T. Ikeda, K. Kobayashi, Chemoenzymatically synthesized glycoconjugate polymers, *Biomacromolecules*, 4, 410–415 (2003).

2. 学会発表

(1) 生分解性を有する糖鎖高分子の酵素合成と機能発現、池田高康・三浦佳子・小林一清、第51回高分子学会年次大会横浜(2002・5・31)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 酵素触媒による生分解性糖鎖高分子の製造法、出願番号：特願2002-62899、出願日：平成14年3月8日、発明者：三浦佳子・池田高康・小林一清、出願人：小林一清