

European association for osseointegration 12th annual scientific congress, Vienna, Austria, 2003. 10.9-11

山田陽一, 日比英晴, 小澤亮太郎, 伊藤憲治, 大屋盛道, 高橋 誠, 木下一彦, 長坂徹郎, 各務秀明, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 馬場俊輔, 上田 実. 注入型培養骨による骨再生医療－基礎研究から臨床応用に関するトランスレーショナルリサーチ－, 第48回日本口腔外科学会総会. 富山, 2003.10.23-24.

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Ito, K., Hibi, H., and Baba, S. Translational research as for injectable tissue-engineered bone regeneration: from basic research to clinical approach. The 6th Conference of Asia-Pacific International Molecular Biology Network (A-IMBN) 2003, Tokyo, Japan, 2003. 11.12-13

Hibi, H., Kinoshita, K., Hishida, S., Nishiguchi, H., Yamada, Y., and Ueda. New internal and multidirectional distractor for the treatment of mandibular segmental defect. 7th European craniofacial congress, Italy, 2003.11.19-22

Yamada, Y., Fujimoto, A., Ozawa, R., Ito, K., and Ueda, M. Cluster analysis and gene expression profile between mesenchymal stem cells (MSCs) and Dentin pulp stem cells (DPSCs). International Association for Dental Research (82nd General session & Exhibition of IADR), Honolulu, America, 2004. 3.10-13

Ito, K., Yamada, Y., Baba, H., Hibi, H., Ozawa, R., Takahashi, M., Ohya, M., Sojo, K., Kinoshita, K., and Ueda, M. Mechanical properties of tissue-engineered bone using MSCs and PRP. International Association for Dental Research (82nd General session & Exhibition of IADR), Honolulu, America, 2004. 3.10-13

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特許申請中

「組織または器官再生用材料」

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

超音波刺激による軟骨分化誘導促進に関する研究

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

未分化間葉系幹細胞（MSC）をペレット培養法で軟骨細胞へ分化誘導時に、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、軟骨染色性に優れ、軟骨基質アグリカン量の増加が見られる、より軟骨分化が成熟された軟骨塊を作成することに成功した。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。

H. 研究目的

再生医療におけるティッシュエンジニアリング組織の中で軟骨は比較的臨床応用されやすく、また移植軟骨組織を必要とする患者の数も多い。本研究では軟骨移植の臨床応用に向けてより効率的な軟骨移植組織作製を念頭に実験を行った。また、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。

I. 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、アリューシャンプルー染色、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最適化実験を行った。また実際にウシ軟骨細胞や MSC を種々のマトリックスに埋入し、ヌードマウスの背部皮下に移植を行い、軟骨組織を作製した。できた軟骨組織の検討により、それぞれのマトリックスを評価した。

（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。

J. 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 の最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。アリューシャンプルー染色、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。

軟骨細胞に分化した細胞中においては、タンパク量当たりのコンドロカルシン、ムコ多糖、コンドロイチン硫酸、II 型コラーゲン量が有意に増加していた。それぞれの RNA においてもタンパクの増加と同様に、各 RNA の上昇が見られた。

K. 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ジャンブル一染色、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。

L. 結論

近年、超音波が軟骨細胞の軟骨マトリックス形成を促進することが報告され始め、注目を集めている。超音波は低侵襲であり、細胞に何も加えずに、刺激を加えるのみといった簡便な方法で軟骨分化を促進するために、これからの再生医学に重要な位置づけを占めるかもしれない。

M. 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ません。

N. 研究発表

論文発表

K. Ebisawa, K. Hata, K. Okada, K. Kimata, M. Ueda, S. Torii, H. Watanabe. Ultrasound enhances TGF β -mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. Tissue Eng 2004:in press.

Ikuo Hyodo, Bin Nakayama, Mitsuru Takahashi, Kazuhiro Toriyama, Yuzuru

Kamei and Shuhei Torii: The gastrocnemius with soleus bi-muscle flap.

British Journal of Plastic Surgery, 57: 77-82, 2004.

Hasegawa Yukiharu, Sakano Shinji, Iwase Toshiki, Iwasada Seiki, Torii

Shuhei, Iwata Hisashi : Pedicle bone grafting versus

transutrochanteric rotational osteotomy for avascular necrosis of the femoral head. J Bone

Joint Surg 84-B(2): 191-198, 2003 .

Bin Nakayama, Yuzuru Kamei, Kazuhiro Toriyama, Ikuo Hyoudo, Yasuhisa

Hasegawa and Shuhei Torii: Usefulness of a first transferred free flap

vascular pedicle for secondary microvascular reconstruction in the head and neck. Plast Reconstr Surg, 109: 1246-1253, 2002.

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 猛之 名古屋大学大学院工学研究科 助教授

研究要旨

従来、骨および軟骨再生のためには、細胞をポリ乳酸やポリグリコール酸などのスキャホールドに播種して培養する必要があったが、それらの高分子の分解物が生体に及ぼす悪影響は無視できない。そのため、新たな三次元生体組織の構築法が望まれる。本研究では、磁性微粒子マグネタイトと磁力を用いた新しい三次元構築法「マグ ティッシュ エンジニアリング, Mag-TE」を開発した。マグネタイトをカチオニックリポソームで包埋した MCL(Magnetite cationic liposome)を細胞に取り込ませて、磁石で細胞を集積・重層化させたところ、重層化細胞シートを構築することができた。この方法は、骨や軟骨を含む Tissue Engineering における有用な手法になると考えられる。

A. 研究目的

Tissue Engineering 分野において、複雑な構造と機能を持つ器官構造を再構築するために、新たな三次元組織構築法の開発が望まれている。我々は機能性磁性微粒子マグネタイトで細胞を標識し、磁力で引きつけることによって、細胞を任意の場所に配置・接着させて三次元組織を構築する手法（マグ ティッシュ エンジニアリング, Mag-TE）を開発した。本年度はモデル組織として、本手法を用いた表皮角化細胞の重層化および肝実質細胞と血管内皮細胞の異種細胞による共培養の検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

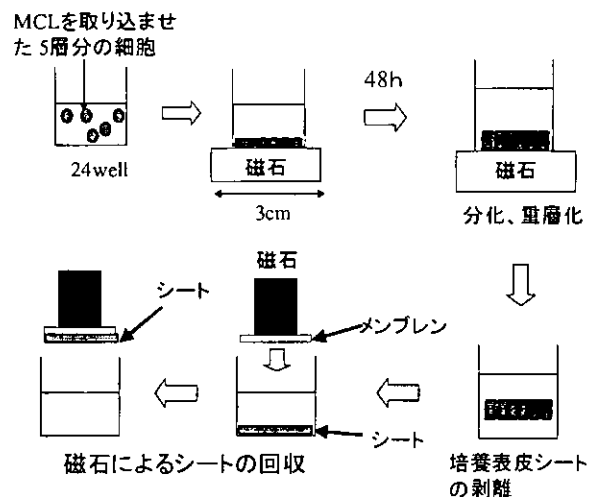
培養表皮シートの作製法を図1に示した。表皮角化細胞は新生児包皮由来の keratinocyte（クラボウ）を用いた。マグネタイトをカチオニックリポソームで包埋した MCLs (magnetite cationic liposomes) を 50 pg/cell、25 pg/cell の濃度で添加し細胞を磁気ラベルした。

磁気ラベルした細胞を超低接着性 24 well plate（コーニング）に 2×10^5 cell/well（コンフルエントの細胞数の5倍）で播種し、30 mm²の円柱磁石を培養皿底面に設置して1日培養した。その後、高カルシウム濃度（1mM）培地で1日培養し、表皮シートを作製した。

次に、培養皿底面の磁石を撤去した後、表面に PVDF

膜を吸着した 10 mm²の円柱磁石を well の上から接近させて、表皮シートを回収した。

作製した培養表皮は、電子顕微鏡による観察と横断面の観察により評価した。また作製した培養表皮の



MCLs 残存量を測定した。

図1 培養表皮シートの作製法

（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。

C. 研究結果

keratinocyte に MCLs を 50 pg/cell、25 pg/cell の濃度で

添加したところ、4 時間後に取り込みが最大となり、それぞれ 32.6 pg/cell、18.3pg/cell のマグネタイトが細胞に取り込まれた。一方、この MCLs 取り込みによる細胞の増殖阻害は見られなかった。

25 pg/cell の濃度で MCLs を添加した場合、磁石で細胞は十分に集積せず、均一なシートを形成しなかった。一方、50 pg/cell の濃度で MCLs を添加した場合、均一なシートを作製した。

電子顕微鏡で細胞間結合を観察したところ、デスモソームを観察できた。これにより、細胞同士は細胞外マトリクスを通して結合していることが確認できた。

次に HE 染色してシートの横断面を観察したところ、10 層の細胞層を確認できた。(図 2)

また、表皮シートのシート内マグネタイト量を測定したところ、シート作製前とほぼ同じだった。そのため、作製したシートは円柱磁石を近づけることで容易に回収することができた。このように磁力で回収することにより、回収を自動化できる可能性がある。

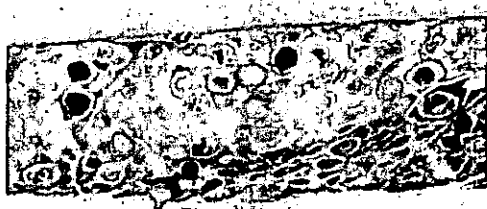


図 2 培養表皮シートの横断面

D. 考察

本研究では、三次元組織を構築するために、MCL を用いている。本研究ではモデル細胞として表皮角化細胞を用いたが、今後 MSC(間葉系幹細胞)を用いて実験を行っていく。MCL の細胞に対する毒性については、すでに前年度で MSC における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とを報告している。このことから、MCL は MSC の培養に影響しないと考えられる。

この技術は骨や軟骨あるいは MSC に限らず、様々な組織にも応用できることから、この技術は Tissue Engineering にとって、非常に重要な技術になりうる。

E. 結論

MCLs と超低接着性 plate を用いて培養表皮シートを作製し、酵素を使わずに磁力で回収することができた。これらの結果から Mag-TE は Tissue Engineering における有用な方法になると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito A, Takizawa Y, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M and Kobayashi T: Tissue engineering using magnetite nanoparticles and magnetic force: heterotypic layers of co-cultured hepatocytes and endothelial cells, *Tissue Eng*, in press (2004)
- 2) Ito A, Hayashida M, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M and Kobayashi T: Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force, *Tissue Eng*, in press (2004)
- 3) Ito A, Hibino E, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M and Kobayashi T: A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticles, *Biochem Eng J*, in press (2004)
- 4) Kato N, Kobayashi T, and Honda H. : Screening of stress enhancer based on analysis of gene expression profiles: hyperthermia-induced tumor necrosis by an MMP-3 inhibitor, *Cancer Science*, 94 (7), 644-649 (2003)
- 5) Ito A, Takizawa Y, Shinkai M, Honda H, Hata K, Ueda M, Kuno N, Itakura A and Kobayashi T: Proliferation and stratification of keratinocyte on cultured amniotic epithelial cells for tissue engineering, *J Biosci Bioeng*, 95(6), 589-593(2003)
- 6) Ito A, Mase A, Takizawa Y, Shinkai M, Honda H, Hata K, Ueda M and Kobayashi T: 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) 井藤彰ら：機能性磁性微粒子を用いた三次元生体組織の構築、化学工学会（於：東北大）、2003.
- 2) 林田真生ら：機能性磁性微粒子を用いた新規培養表皮シート作製法の開発、化学工学会（於：東北大）、2003.
- 3) 日比野恵理ら：機能性磁性微粒子を用いた間葉系幹細胞の新規培養法、化学工学会（於：東北大）、2003.

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」

特願 2003-78964 号

「医用材料」

特願 2003-73808 号

「細胞培養方法及び細胞シート」

特願 2003-136336 号

「細胞培養方法及び培養組織」

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

骨組織マトリックスの作成に関する研究

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。バイオメテック・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研究した。新合成のナノ細孔材料の一種であるシリカ系のメソポーラスシリカ（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わかり、その作製法の改良を行った。また、硬質炭素系材料の開発を行い、骨組織マトリックスとしての可能性を検討した。今後、MPSおよび炭素系材料を骨組織マトリックスとしての応用をはかり、その再生医療用材料としての評価を進める。

A. 研究目的

本研究では、バイオメテック・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。

また、新たに非晶質炭素系材料のプラズマ合成を行い、骨組織マトリックス用材料および生体適合材料としての本材料の可能性を検討した。

B. 研究方法

(1) 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。さらに、プラズマカルシネーションの効果についても検討した。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。

(2) 非晶質炭素系材料としては、誘導結

合プラズマ化学蒸着法 (ICP-CVD) により作製した非晶質窒化炭素 (a-CN) 薄膜を検討材料にした。基板には、ポリエチレンテレフタレート (PET), ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) などのポリマーおよび Si (100) を用いた。原料ガスには、ベンゼンと窒素を用いて作製した。成膜中高周波出力は 1 kW とした。生体適合性を調査するため、今年度は、各成膜中基板バイアス電圧 (0, -200, -400, -600, -800, -1000V) で作製した a-CN 膜の血漿蛋白質適合性を調査した。

材料表面の蛋白質適合性は、表面の濡れ性により大きく左右される。各試料表面の濡れ性は、静的水滴接触角測定により評価した。血漿蛋白質 (フィブリノーゲン, アルブミン) に対する適合性を評価するため、血漿蛋白質を溶解したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に各試料を浸漬した。比較のため、フィブリノーゲンを溶解していない PBS 溶液にも浸漬した。各試料表面の血漿蛋白質吸着状態は、X線光電子分光法 (XPS), 電界放射型走査電子顕微鏡 (FESEM), 原子間力顕微鏡 (AFM) により評価した。

(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。

C. 研究結果

(1) 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。

また、プラズマカルシネーションについても検討を行い、その有用性が確認できた。フォトカルシネーションにくらべ、プラズマカルシネーションは高速処理であるが、周期構造には乱れが大きいことが判明した。プラズマカルシネーションしたMPS膜の人工体液中でのアパタイト形成能については、今後の検討が必要である。

(2) 図 3 に、成膜中各基板バイアス電圧により作製した Si(100) 基板上の a-CN 薄膜の静的水滴接触角を示す。基板バイアス電圧を印加せずに作製した a-CN 薄膜 (0 V) よりも、各バイアス電圧で作製した a-CN 薄膜の方がより親水性の表面を有していた。基板バイアス電圧-200 V で作製した a-CN 薄膜は、静的水滴接触角測定の際に、水を吸収し、Si (100) 基板から剥離した。

各基板バイアス電圧で作製した a-CN 薄膜を、PBS 溶液に浸漬した結果、基板バイアス電圧 0 および-200V で作製した a-CN 薄膜は、吸着試験中に剥離した。図 4 に、フィブリノーゲン吸着試験前後の基板バイアス電圧-400 V で作製した a-CN 薄膜の XPS C 1s スペクトルを示す ((a) 各溶液浸漬前の a-CN 薄膜, (b) PBS 溶液に浸漬した a-CN 薄膜および (c) フィブリノーゲンを溶解した PBS 溶液中に浸漬した a-CN 薄膜)。帯電補正を行っ

ていないため、全ての結合エネルギーが高エネルギー側にずれている。PBS 溶液への浸漬のみでは、a-CN 薄膜の C 1s スペクトルに大きな変化はなかった。フィブリノーゲンを溶解した PBS 溶液に浸漬後の a-CN 薄膜の C 1s スペクトルには、高結合エネルギー側にいくつかのピークが現れた。これらは、フィブリノーゲン中の C に帰属すると考えられる。図 5 に、XPS により得られた組成から算出した各試料の N/C および O/C 組成比を示す。PBS 溶液への浸漬のみでは、a-CN 薄膜の N/C および O/C 組成比にほとんど変化はなかった。フィブリノーゲンを溶解した PBS 溶液中に a-CN 薄膜を浸漬した結果、a-CN 薄膜表面の N/C および O/C 組成比が増加した。a-CN 薄膜表面の N および O の増加は、フィブリノーゲンの吸着に起因すると考えられる。

D. 考察

(1) 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。

(2) 非晶質炭素系 a-CN 膜の血漿蛋白質適合能について検討した。静的水滴接触角測定の結果、成膜中基板バイアス電圧の印加により、a-CN 薄膜表面がより親水性となった。XPS による化学結合状態解析の結果、基板バイアス電圧-400V

で作製した a-CN 薄膜にフィブリノーゲンの吸着が確認された。今後、骨組織マトリックスとしての特性を検討することが必要である。

E. 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。また、新たに開発したプラズマカルシネーション法も高速処理法として有用であることが判明した。

また、新たな骨組織マトリックス用材料として、非晶質炭素系材料の検討を行った。この結果、生体材料としての基礎的な知見が得られた。炭素系材料は、生体親和性および機械的特性を併有する材料として可能性を秘めている。

今後、MPS および非晶質炭素系材料の骨組織マトリックスとして応用をはかり、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。

F. 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。

G. 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, Vol. 169 (2003) 583-586
2. 学会発表
- Riichiro Ohta, Kyung-Hwang Lee, Nagahiro Saito, Yasushi Inoue, Hiroyuki Sugimura, Osamu Takai, Microscopic Behavior of Blood Coagulation Protein Adsorbed on NO-Releasing Amorphous Carbon Nitride Surface, The 8th IUMRS International Conference on Advanced Materials, October 8-13, 2003, Yokohama, Japan.
- 太田理一郎, 齋藤永宏, 井上泰志, 杉村博之, 高井治, ポリマー基板上NO貯蔵アモルファス窒化炭素薄膜の作製と化学結合状態評価, 2003年8月30-9月2日, 秋季第64回応用物理学関係連合講演会, 福岡大学.
- 太田理一郎, 齋藤永宏, 井上泰志, 高井治, 非晶質炭素系薄膜表面の血漿蛋白質適合能評価, 2004年3月15-17日, 表面技術協会第109回講演大会, 東京都立大学.
- 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 Manuel

Applicant: Nagoya University

Priority 25.04.2001 JP201128093

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

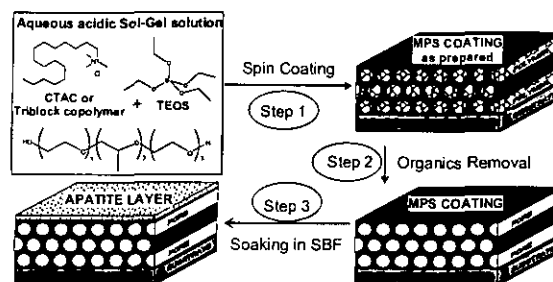


図1 MPS膜作製に使用した手順



図2 MPS上に形成したアパタイト

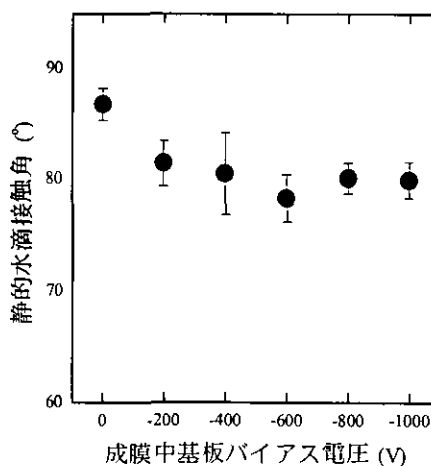


図3 各成膜中基板バイアス電圧で作製した a-CN 薄膜の静的水滴接触角

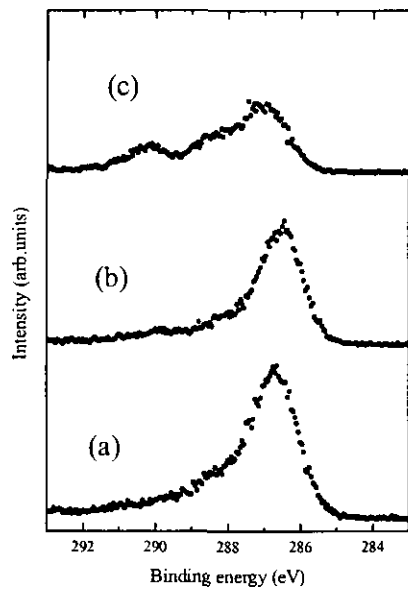


図4 XPS C 1s スペクトル ((a) 各溶液浸漬前の a-CN 薄膜, (b) PBS 溶液に浸漬した a-CN 薄膜, (c) フィブリノーゲンを溶解した PBS 溶液に浸漬した a-CN 薄膜)

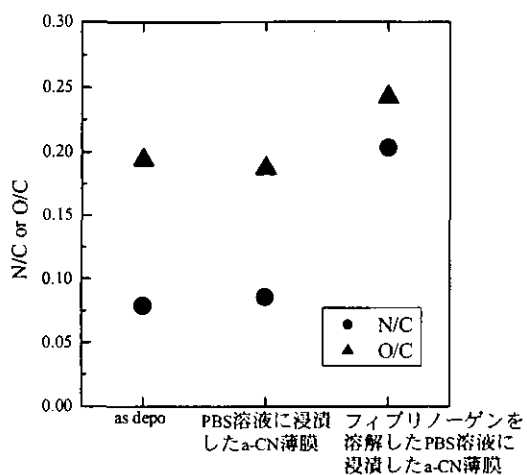


図5 基板バイアス電圧-400 V で作製した a-CN 薄膜の XPS により得られた N/C および O/C 組成比

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

糖鎖結合型材料に関する研究

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、糖鎖をシリコンあるいはガラス基板上に表面修飾することにより糖鎖マイクロアレイを作成し細胞接着実験を行った。6-硫酸化-N-アセチルグルコザミン (6S-GlcNAc) 糖鎖を固定化した基板では、マウス 3T3 繊維芽細胞の接着性、増殖能の増強が確認された。グルコース固定化基板ではさらに強い細胞の増殖能が確認された。糖マイクロアレイを用いることによって様々な糖の機能が解明できることが明らかとなった。

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。細胞表層には繊維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR : Fibroblast growth factor receptor) やヘパラン硫酸プロテオグリカンを代表する糖鎖が数多く存在している。ヘパラン硫酸を構成する糖鎖の一部として 6S-GlcNAc があり、このヘパラン硫酸の硫酸基が FGF との認識に深く関与している。そこで、本研究では合成が簡便な 6S-GlcNAc に注目し、この糖を基板に固定化し、単糖レベルでの糖の機能を解明する。

B. 研究方法

糖を基板に固定化する方法として自己組織化単分子膜(SAM)の技術を用いた。ガラス表面を UV 照射すると、親水基が露出される。この親水基と末端にアルキンを有す

るシラン化合物を反応させるとアルキンを表面に提示する単分子膜を作成することができる。このアルキンと末端にアジドを有する糖との、トリアゾール形成によるシクロアディクションにより糖が基板に固定化した。

C. 研究結果

タンパク質の吸着実験。糖を固定化したガラス基板を用いてタンパク結合実験を行った。まず、WGA(Wheat Germ Agglutinin : GlcNAc およびシアル酸認識タンパク)を用いてタンパク結合能を測定したところ、6S-GlcNAc の固定化された基板で高いタンパク結合能が検出された。また、FGF-2 を用いて同様な実験を行ったところ、6S-GlcNAc の固定化されたガラス基板でやや強い結合能が検出された。

細胞の接着実験。1 well につき 3,000 個のマウス 3T3 繊維芽細胞を播種し、CO₂ インキュベーターで培養し、所定時間が経過したら PBS で洗浄し、WST-8 を加え、細胞数

を計測した。全体的に、ガラス基板と比較して、6S-GlcNAc の固定化された基板上で細胞のやや強い接着性、増殖性が見られた。これは、固定化された 6S-GlcNAc の硫酸基と FGF-2 が認識したためであると考えられる。

D. 考察 興味深いことに、グルコースを固定化したガラス基板で 72 時間培養した細胞数は、6S-GlcNAc の細胞数を上回った。この現象は、固定化されたグルコースにより、細胞に何らかの増殖活性が与えられていることを示唆している。

E. 結論 6S-GlcNAc 基板上での繊維芽細胞細胞の接着性、増殖能の増強が確認された。グルコース固定化基板ではさらに強い細胞の増殖能が確認された。以上の結果より、糖マイクロアレイを用いることによって様々な糖の機能が解明できることが明らかとなった。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

(2) Miura Y, Ikeda T, Wada N, Sato H,

Kobayashi K: Chemoenzymatic Synthesis of Glycoconjugate Polymers: Greening Synthesis of Biomaterials. *Green Chemistry*, 5, 610-614 (2003).

(3) Miura Y, Ikeda T, Wada N, Kobayashi K: Yoshiko Miura, Chemoenzymatic Synthesis of a Multivalent Aminoglycoside, *Macromol. Biosci.*, 3, 662-667 (2003).

2. 学会発表

(1)山内孝浩, 三浦佳子, 小林一清, アジド糖を利用した糖質薄膜の調製と生体機能解析, 第 53 回高分子学会年次大会神戸 (2004・5・25-27) 発表予定。

特許

(1) 生体用材料

出願番号 特願 2002-111346

出願日 平成14年 3月10日

発明者 三浦佳子、上坊史子、小林一

清

出願人 小林一清

公開番号 特開 2003-260125

公開日 平成 15 年 9 月 16 日

(2)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

公開番号 特開 2003-261621

公開日 平成 15 年 9 月 19 日

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

軟骨再生における至適材料評価に関する研究

分担研究者 木全 弘治 愛知医科大学分子医科学研究所 教授

研究要旨

組織工学的手法を用いた再生軟骨作製に関わる、マトリックスの検討や実際の臨床応用を視野に入れた検討を行った。注入型軟骨作製および3次元培養における至適材料の検討において、組織アリュースャンブルー染色、基質アグリカン量を中心とした軟骨マーカーを指標に観察した。その結果、生体分解性の合成コポリマー、カプロラクトン（PCL）+PLAに糖鎖を付加したものが極めて軟骨組織の再生を行う上で組織工学的材料として至適である結果が得られた。

A. 研究目的

再生医療におけるティッシュエンジニアリング組織の中で軟骨は比較的臨床応用されやすく、また移植軟骨組織を必要とする患者の数も多い。本研究では軟骨移植の臨床応用に向けてより効率的な軟骨移植組織作製を念頭に実験を行った。

B. 研究方法

注入型軟骨組織再生の面から至適材料の検討を行った。試した材料は、PGA, PLAに糖鎖+BMPやFGFなどの細胞増殖因子を付加した物を検討した。これらのマトリックスに軟骨細胞を混ぜヌードマウスの背部皮下に移植を行い、2週、4週後の組織をアリュースャンブルー染色、基質アグリカン量を中心とした軟骨マーカーを指標にそれぞれのマトリックスを評価した。

（倫理面への配慮）

採取した組織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った。また動物実験においては使用動物および使用法に関して慣例を逸脱しないように配慮した。

C. 研究結果

PGA, PLAなどの様々な担体を用いて *in vivo* での軟骨再生の最適条件の比較検討を行った。また、糖鎖を担体マトリックスに付加することで、BMPやFGFなどの細胞増殖因子の活性発現部位を任意に調節可能で効率よく利用でき、同時により生体親和性の高い担体の開発を行った。実際、ウシ膝関節軟骨から得た細胞は、PCL+PLAのコポリマー培養基質とBMPの添加により高い軟骨分化能をかなりの細胞分裂後も再獲得できることを明らかにした。従って、コポリマーの糖鎖結合部分の成形により、任意の形を持った軟骨が得られる可能性が出てきた。また、超音波刺激による間葉系幹細胞からの効率的培養法の確立に成功した。

D. 考察

今回の成果により軟骨細胞をある形を持つように局所的に増殖させることが可能になった。実際の軟骨組織中の細胞は一様ではなく、部位により増殖や合成する細胞外基質分子も異なる（組織分化）。今後は今回開発に成功した系における組織分化現象を解析し、*in vivo* を

反映するものに近づける。

E. 結論

再生軟骨作成では、未だ、スポンジ型に比べまだ軟骨再生の大きさや成熟度に問題があり、3次元のマトリックスを埋え込む方が成績がよい傾向にある。至適材料の検討はこれからも重要な位置を占めるであろう。

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

M. Honda, N. Morikawa, K. Hata, T. Yada, S. Morita, M. Ueda, K. Kimata. Rat costochondral cell characteristics on poly (L-lactid-co-ε-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials* 2003;24: 3511- 3519.

P. Jemth, E. Smeds, A-T. Do, H. Habuchi, K. Kimata, U. Lindahl, M. Kusche- Gullberg. Oligosaccharide library-based assessment of heparan sulfate 6-O- sulfotransferase substrate specificity. *J Biol Chem* 2003;278:24371-24376.

A. Irie, H. Habuchi, K. Kimata, Y. Sanai. Heparan sulfate is required for bone morphogenetic protein-7 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308:858-65.

T. Kozaki, Y. Matsui, J. Gu, R. Nishiuchi, N. Sugiura, K. Kimata, K. Ozono, H. Yoshikawa, K. Sekiguchi. Recombinant expression and characterization of a novel fibronectin isoform expressed in cartilaginous tissues. *J Biol Chem* 2003;278:50546-50553.

H. Watanabe, K. Matsumoto, K. Kimata. The

proteoglycan aggregate: Structure and function. *Connective Tissue* 2003; 35:201-205.

K. Nogami, H. Suzuki, H. Habuchi, N. Ishiguro, H. Iwata, K. Kimata. Distinctive expression patterns of heparan sulfate O-sulfotransferases and regional differences in heparan sulfate structure in chick limb buds. *J Biol Chem* 2004;279:8219-8229.

S. Ashikari-Hada, H. Habuchi, Y. Kariya, N. Itoh, A. H. Reddi, K. Kimata. Characterization of Growth Factor- binding Structures in Heparin/Heparan Sulfate Using an Octasaccharide Library. *J Biol Chem* 2004;279:12346-54.

Y. Yamada, N. Itano, K. Hata, M. Ueda, K. Kimata. Differential regulation by IL-1β and EGF of expression of three different hyaluronan synthases in oral mucosal epithelial cells and fibroblasts and dermal fibroblasts: Quantitative analysis using real time RT-PCR. *J Invest Dermatol* 2004:in press.

K. Ebisawa, K. Hata, K. Okada, K. Kimata, M. Ueda, S. Torii, H. Watanabe. Ultrasound enhances TGFβ-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2004:in press.

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

研究要旨

粒子溶出法とバイオメティック法を組み合わせ、炭酸含有アパタイトがセラミックス/ポリマー複合体 CCPC の骨格表面を覆った新規多孔体を作製した。得られた多孔体は、大きな気孔径を持ち、気孔率は 75 % であった。CCPC 上に骨類似アパタイトが存在すると、骨芽細胞の接着性を向上させるだけでなく、破骨細胞による吸収も増加する。炭酸含有アパタイトが CCPC 骨格表面を覆った多孔体は、骨再生用組織工学 scaffold として有用であると思われる。

A. 研究目的

炭酸含有アパタイト(HCA)は、骨を構成するアパタイトの組成に近く、焼結アパタイトと同程度の骨芽細胞との親和性を示し、高い生体吸収性も持つことが期待されているため、新規生体材料としての応用が提案されている。そこで、HCA の scaffold への応用を我々は検討しているが、セラミックス単体では脆く、培養操作の際に、マトリックスが崩壊する恐れがある。このような欠点を補うために、脆性破壊を示さないポリ乳酸(PLA)のような生体吸収性高分子で多孔体を作製し、その骨格表面に HCA をコーティングすることを考えた。

本年度の研究では、昨年度までに検討してきた、PLA と炭酸カルシウムの多形であるバテライトからなる複合体(CCPC)を用いて、HCA で骨格表面を覆った多孔体の開発を試みた。また、scaffold への応用を検討する上で、細胞と材料の親和性を調べた。

B. 研究方法

バテライトの作製には、炭酸ガス化合法を用いた。作製したバテライトは、2次粒子が 500 nm、比表面積が 40 m²/g と微細な球形の結晶が得られた。

塩化メチレンに溶解した分子量 16 万の PLA

溶液に、バテライト粉末を混合し、PLA スラリーを得た。このとき、バテライトと PLA の重量比は 1:2 とした。多孔化の方法として、粒子溶出法を用いた。PLA スラリー中に、造孔剤として、0.5~1 mm でふるいわけしたショ糖を CCPC に対して 6 倍(重量比)加え、攪拌混合した。混合溶液を、金型に流し出し、乾燥後、180℃、1 時間で熱処理を行い、40 MPa でプレス成型した。作製した試料から、ショ糖を取り除くと同時に、HCA を析出させるために、SBF に 3 日間浸漬し、多孔体を作製した。

SBF に 3 日間浸漬し、作製した多孔体に骨芽細胞を播種し、1 週間培養した。また、破骨細胞による材料の吸収を調べるために、ディスク状に成形した CCPC(バテライト:PLA=1:2 wt ratio)を SBF に 2 日間浸漬し、表面を骨類似アパタイトに置換した状態のものに、破骨細胞を播種し、2 日間培養した。

C. 研究結果および考察

図 1 に SBF に浸漬して、作製した多孔体の SEM 写真を示す。気孔径は 450~580 μm、連通気孔径は 70~120 μm、気孔率は 75 % であった。また、骨格表面は、HCA で覆われていた。水銀ポロシメータにより、平均気孔径は 125 μm であり、骨芽細胞が侵入しにくいかもしれ

ない数十 μm という小さな気孔はほとんどないことがわかった。これは、ホットプレス時に、ショ糖表面が溶解し、隣同士のショ糖粒子の接着面積が増加したためと思われる。これらの結果から、ショ糖を用いて作製した多孔体は、細胞が侵入できるような気孔構造を持つと思われる。

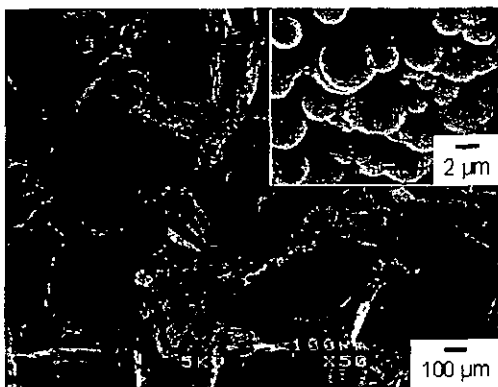


図 1. HCA を骨格表面に析出させた CCPC 多孔体の断面 SEM 写真(挿入図: 骨格表面の拡大写真)

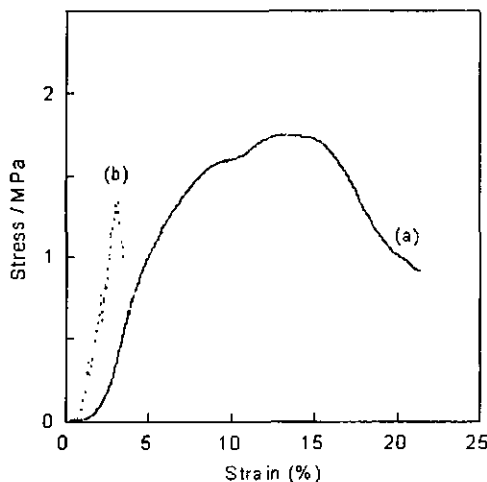


図 2. (a)作製した CCPC 多孔体と(b) β -TCP 多孔体の圧縮試験の応力-歪み曲線

図 2 に、作製した CCPC 多孔体、および同程度の気孔率を持つ β -TCP 多孔体の圧縮試験の応力-歪み曲線の例を示す。CCPC 多孔体は、1.5 MPa 程度の圧縮応力に耐えるが、セラミックスのような脆性破壊は示さず、大きな変形ができることを意味する。一方、 β -TCP 多孔体は

CCPC 多孔体と同程度の圧縮強度を示したが、脆性破壊を示した。CCPC 多孔体では、細胞播種時、埋入時のハンドリングに十分耐えることができるかと期待される。

図 3 に、骨芽細胞を播種後、1 週間培養した後の、破断面の中心部の SEM 写真を示す。骨芽細胞が、HCA で覆われた骨格表面に接着した。このことから、細胞が試料内部にまで、侵入することができると思われる。SEM 観察において、同様の方法で作製した PLA 多孔体では、試料内部ではほとんど細胞が見られなかった。このことから、骨格表面を HCA で覆った多孔体は、細胞の接着性を向上させられる。

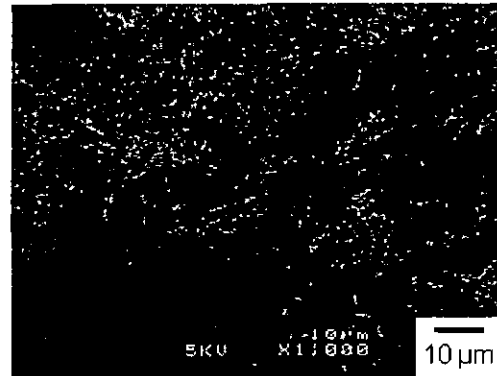


図 3. 骨芽細胞 1 週間培養した後の、CCPC 多孔体の中心部の断面 SEM 写真

図 4 に、破骨細胞播種後、2 日間培養した後のディスク状試料表面の SEM 写真を示す。SBF に浸漬し、HCA を析出させた CCPC 表面では、破骨細胞が接着し、25 μm 程度の吸収窩が観察された。一方、SBF に浸漬しなかった CCPC では、15 μm 程度の吸収窩が観察された。また、HCA を析出させた CCPC の方が、多く破骨細胞の接着と吸収窩が見られた。このことから、CCPC 上に生成した HCA は破骨細胞が接着しやすい環境になり、効果的に吸収されることがわかった。

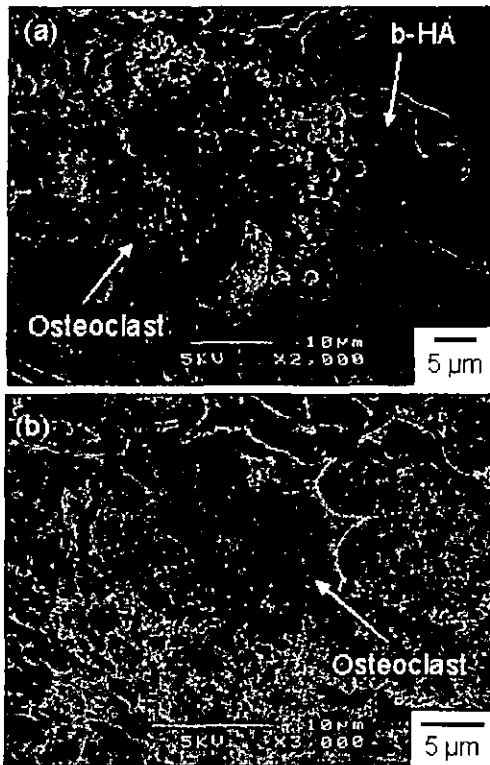


図4. 破骨細胞 2 日間培養した後の、(a)HCA を析出させた CCPC、(b)CCPC のディスク状試料の表面 SEM 写真

D. 結論

粒子溶出法とバイオミメティック法を組み合わせた新規多孔体作製法を用いることで、CCPC 多孔体の骨格表面を、HCA に短期間に、かつ、容易に置換できた。この多孔体の気孔径は、450~580 μm で、連通孔は、70~120 μm 、気孔率は、75%あった。多孔体の気孔構造は、細胞の導入に適していると思われる。また、多孔体は、延性を示すために、ハンドリング時の材料の破壊の恐れが低下すると思われる。HCA で CCPC を覆うことで、細胞親和性を向上できたと思われる。HCA を骨格表面に持つ多孔体は、scaffold としての応用が期待できる。

E. 研究発表

1. 論文発表

・ H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, and Y. Ota: Preparation of Calcium Carbonate Composites and

Their Apatite-Forming Ability in Simulated Body Fluid, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, *in press*.

・ H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, H. Kagami, K. Hata, and M. Ueda: Preparation of Bonelike Apatite Composite Sponge, *Key Engng. Mater.*, **254-256**, 497-500 (2004).

・ H. Maeda, T. Kasuga, and M. Nogami: Vaterite / Poly(lactic acid) Composite Biomaterials, *Arch. Biocer. Res.*, **3**, 110-113 (2003).

・ H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami: Preparation of Calcium Carbonate / Poly(lactic acid) Composite (CCPC) Hollow Spheres, *Key Engng. Mater.*, **254-256**, 533-536 (2004).

・ Hirotaka Maeda, Toshihiro Kasuga, and Masayuki Nogami: Apatite formation on titania-vaterite powders in simulated body fluid, *J. Eur. Ceram. Soc.*, **24**, 2125-2130 (2004).

2. 口頭発表

・ H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, and Y. Ota: Preparation of Calcium Carbonate Composites and Their Apatite-Forming Ability in Simulated Body Fluid, 5th International Meeting of Pacific Rim Ceramic Societies, Nagoya, 29-2 Sep.-Oct. 2003.

・ H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, H. Kagami, K. Hata, and M. Ueda: Preparation of Bonelike Apatite Composite Sponge, 16th International Symposium on Ceramics in Medicine, Sydney, 6-9 Nov. 2003.

・ H. Maeda, T. Kasuga, and M. Nogami: Vaterite / Poly(lactic acid) Composite Biomaterials, Asian BioCeramics Symposium 2003, Fukuoka, 18-20 Nov. 2003.

・ 前田、春日、野上：ポリ乳酸複合体の骨様アパタイト生成、第7回生体関連セラミックス討論会（東京、2003年12月4~5日）

F. 知的財産権の出願・登録状況

出願・登録ともなし。

研究成果の刊行に関する一覧表

M.Ueda Clinical Case Reports of Injectable Tissue-engineered Bone Applied for Alveolar Augmentation with Simultaneous Implant Placement. The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry 2004(in press)

臍帯血からの間葉系幹細胞の分離と再生医療への応用

山田陽一、上田実

細胞 36(2),2004

Ozawa, R., Yamada, Y., Nagasaka, T., and Ueda M., A comparison of osteogenesis-related gene expression of mesenchymal stem cells during the osteoblastic differentiation induced Type-I collagen and/or fibronectin, Int J Oral-Med Sci, 1, 148-155, 2003.

Yamada, Y., Ueda M, Naiki T and Nagasaka, T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. Clin Oral Impl Res, in press (2004).

Yamada, Y., Itano, N, Hata, K., Ueda, M., and Kimata,K. Differential Regulation by IL-1 β and EGF of Expression of Three Different Hyaluronan Synthases in Oral Mucosal Epithelial Cells and Fibroblasts and Dermal Fibroblasts: Quantitative Analysis using Real Time RT-PCR, J Invest Dermatol, in press.

A Novel approach to regenerating periodontal tissue by grafting autologous cultured periosteum-a preliminary study in canine mandible- Mizuno H, Hata K-I, Kogami, H, Wada K, Bonassar LJ and Ueda M. Tissue Engineering 投稿中

Ueda, M., Yamada, Y., Ozawa, R., and Okazaki, Y. A clinical report of injectable tissue-engineered bone applied for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry in press.

(分担研究者)

(各務 秀明)

A Novel approach to regenerating periodontal tissue by grafting autologous cultured periosteum-a preliminary study in canine mandible- Mizuno H, Hata K-I, Kogami, H, Wada K, Bonassar LJ and Ueda M. Tissue Engineering 投稿中

Miyata Y, Okada K, Fujimoto A, Hata K, Kagami H, Tomita Y, Ueda M:

The effect of the long-term cultivation on telomere length and morphology of cultured epidermis, Journal