

#### (倫理面への配慮)

組織採取、臨床応用を行う場合、名古屋大学倫理委員会にて承認された申請内容に従い、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。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

注入型培養骨の骨再生能力を欠損のみ、自家骨、PRPのみと比較検討した。その結果、再生された骨占有率は、移植後8週目においては、 $18.3 \pm 4.84\%$  (欠損のみ),  $29.2 \pm 5.47\%$  (PRP),  $61.4 \pm 3.38\%$  (自家骨), そして  $67.3 \pm 2.06\%$  (注入型培養骨)であった。また、インプラントとの骨結合率については  $26.4 \pm 9.5\%$  (欠損のみ),  $44.2 \pm 10.8\%$  (PRP),  $49.9 \pm 8.2\%$  (自家骨), and  $58.6 \pm 9.7\%$  (注入型培養骨)であった。さらに、組織学的にも注入型培養骨は十分な層板構造を持った成熟した骨再生が確認された。また、非脱灰切片を作製し、人工材料であるBioOssとも比較検討を行い、物理的強度を計測した結果、移植後2週という初期において  $8.40 \pm 1.50\%$  (欠損のみ),  $9.30 \pm 1.64\%$  (PRP),  $11.24 \pm 1.97\%$  (自家骨),  $17.66 \pm 2.60\%$  (注入型培養骨)の値を示したのに対し、BioOssでは十分な強度を有しておらず、計測不可能であった。また、採取しているMSCsはCD105、CD44などの表面抗体を発現しており、造血幹細胞に特異的とされるCD34、CD45などの発現は見られなかった。さらに、細胞の安全性についても検討し、マイコプ

ラズマ感染、エンドトキシンなども検出されなかった。また、染色体においても転座、欠失などの異常は見られなかった。以上の結果をもとに、臨床応用を行った。インプラントとの応用例(13例)、骨延長部への応用例(6例)、歯周病への応用例(3例)に適用され、現在経過は良好である。



図1：培養骨による骨再生

(V) イヌ下顎骨モデルによる実験 (Vi) 非脱灰切片による培養骨の組織学的所見 (Vii) 臨床応用例; 74歳男性、広範囲な骨欠損を認める。(Viii) 注入型培養骨の応用 (ix) 6ヶ月後に良好な骨再生が確認された。矢印が骨再生部

#### D. 考察

幹細胞を応用したトランスレーショナルリサーチは良好な結果を得ており、今後も臨床例を積み重ね、よりよい臨床研究、貢献を続けていくと同時に、慎重に経過観察を行っていくものとするのが重要であると思われる。

#### E. 結論

基礎研究に根ざした、MSCsとPRPを用いた骨再生療法は、臨床応用においても、現在22例すべて経過良好であった。今後臨床症例の拡充と同時に、臨床経過を検討していくこととする。

## 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。

## 研究発表

### 1. 論文発表

Yamada, Y., Itano, N, Narimatsu, H., Kudo, T., Hirohashi, S., Ochiai, A., Ueda, M., and Kimata, K. Elevated Expression of Hyaluronan Synthase1 Correlates with Poor Prognosis of Human Colon Cancer, *Clin Exp Metastas*, 21(1), 57-63, 2004.

Yamada, Y., Ueda M, Naiki T and Nagasaka, T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Impl Res*, 15, 589-597, 2004.

Yamada, Y., Itano, N, Hata, K., Ueda, M., and Kimata, K. Differential Regulation by IL-1 $\beta$  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*, 122 (3), 631-639, 2004.

Yamada, Y., Ueda M, Hibi H and Nagasaka, T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet -rich plasma-from basic research to clinical case study. *Cell transplantation*, 13, 343-355, 2004.

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Takahashi, M., Hata, K., and Nagasaka, T. Autogenous injectable Bone for Regeneration with Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Platelet-Rich Plasma (PRP) – Tissue-engineered bone regeneration- *Tissue engineering*.10 (5/6), 955-964, 2004.

Takahashi, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ohya, M., Ito, K., and Ueda, M. Expression of Odontoblastic-related Genes in Human Dental Follicle Cells, Dental Pulp Stem Cells, and Oral Mucosal Cells. *Int J Oral-Med Sci*, 3, 41-48, 2004.

Ito, K., Yamada, Y., Nagasaka, T., Baba, H., and Ueda, M. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-Oss®), platelet-rich plasma (PRP), and tissue engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 73, 63-72, 2005.

Ohya, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ito, K., Takahashi, M., and Ueda M. Sinus floor elevation applied for tissue-engineered bone – comparative study between mesenchymal stem cells (MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits -. *Clin Oral Impl Res*, in press.

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.

Yamada, Y., Ueda, M., Hibi, H., and Baba, S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells (MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) using tissue engineering technology – a clinical case report - .*The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* in press.

## 2. 学会発表

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*

日比英晴, 木下一彦, 菱田純代, 西口浩明, 山田陽一, 上田 実. 創内型多方向性骨延長装置の下顎骨区域欠損への適応. 第 58

回日本口腔科学会総会. 横浜, 2004.5.7-8.

山田陽一, 古市保志, 伊藤憲治, 山本松男, 馬場俊輔, 日比英晴, 和泉雄一, 上田実. 未分化間葉系幹細胞、多血小板血漿を応用した注入型による歯周組織再生療法：－基礎研究から臨床応用へのトランスレーショナルリサーチ－, 第 47 回日本歯周病学会春季学術大会. 鹿児島, 2004.5.21-22.

山田陽一, 上田 実. 間葉系幹細胞を応用した骨、歯周組織再生医療－基礎研究から臨床応用へのトランスレーショナルリサーチ, 第 7 回日本組織工学会, シンポジウム; 皮膚・眼・歯周, 東京, 2004.7.2  
Ohya, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ito, K., Takahashi, M., Kagami, H., Hibi, H., Hata, K-I and Ueda M. Maxillary sinus augmentation in rabbits: A comparative histologic-histomorphometric study between mesenchymal stem cells and autogenous bone. 13th annual scientific meeting of European association for osseointegration, Paris, France, 2004, 9.16-18.

山田陽一, 上田 実, 小澤亮太郎, 伊藤憲治, 大屋盛道, 高橋 誠, 日比英晴, 馬場俊輔. トランスレーショナルリサーチの概念による基礎研究に基づいた注入型培養骨の臨床応用とその特徴, 第 34 回日本口腔インプラント学会総会. 大阪, 2004.9.24-26.

日比英晴, 山田陽一, 木下一彦, 小澤亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 高橋 誠, 各務秀明, 上田 実.

骨延長法への間葉系幹細胞移植の応用. 第 34 回日本口腔インプラント学会総会. 大阪, 2004.9.24-26

Yamada, Y., Hibi, H., Ozawa, R., Ito, K.,

Ohya, M., Takahashi, M., Kagami, H., and Ueda, M. The various possibilities of injectable tissue-engineered bone (the application for dental implants, periodontitis, distraction osteogenesis, and residual alveolar cleft. 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, Tokyo, Japan, 2004. 10.20-23.

Hibi, H., Yamamoto, N., Oda, T., Yamada, Y., Kagami, H., Tohnai, I., and Ueda, M. Mandibular reconstruction using multidirectional internal distraction device. 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, Tokyo, Japan, 2004. 10.20-23.

山田陽一, 上田 実, 日比英晴, 各務 秀明. 注入型培養骨を用いた顎顔面領域再生への挑戦: インプラント、歯周病、骨延長、顎裂部骨移植への応用, 第4回日本再生医療学会総会. 大阪, 2005.3.10-12.

山田陽一, 上田 実. ティッシュエンジニアリングコンセプトに基づいた歯槽骨と歯周組織の再生, 第52回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会, シンポジウム; 歯科領域における再生医療の最近の進歩, 東京, 2004.11.27-28.

Yamada, Y., Hibi, H., Yajima, A., Ito, K., Ohya, M., Ozawa, R., Takahashi, M., Nagasaka, T., and Ueda, M. The clinical application of tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells (MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) on basis of basic experimental research. Academy of osseointegration, Orland, FL, USA, 2005. 3.10-12.

Hibi, H., Yamada, Y., Kinishita, K., Ozawa, R., Ohya, M., Ito, K., Takahashi, M., Kagami, H., and Ueda, M. Distraction osteogenesis assisted with injection of tissue-engineered osteogenic material. Academy of osseointegration, Orland, FL, USA, 2005. 3.10-12.

知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特許申請中

特願 2004-097644 「組織または器官再生用材料」

特願 2004-317241 「骨又は歯周組織形成用組成物」

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

軟骨効果的効率的再生に関する研究

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

ウサギ膝軟骨欠損モデルを作製し、未分化間葉系幹細胞（MSC）を関節軟骨部の欠損に PGA の不織布を担体として埋入することで、骨膜等で関節面を被覆する方法と同等の関節面保護、癒着防止効果が得られる可能性を見いだした。

一方、関節面の治療には、軟骨のみでなく骨・軟骨複合組織が有用である。間葉系幹細胞は、骨芽細胞、軟骨細胞双方へ分化可能だが、この分岐には増殖因子、サイトカイン等の関与が知られている。今回 MSC を分化させずに移植に用いても、骨部位では移植した細胞が骨様組織に分化しており、また、軟骨部においては、軟骨様組織を呈していた。未分化な MSC を骨軟骨欠損部に移植することで、低侵襲で骨軟骨様組織が作成可能であり、将来臨床的に応用可能と考えられた。

研究目的

現在までに、関節軟骨の欠損に対して培養軟骨細胞を注入する治療が行われてきたが、骨膜を採取して損傷部位をカバーする必要があることから、新たな組織欠損をつくるなど解決すべき課題がある。本研究では、生体吸収性材料を用いた特殊な不織布を用いて、骨膜によるカバーを用いない関節軟骨再生法を新たに開発する。これにより治療侵襲を軽減できるのみでなく、長期予後の改善にもつながる可能性がある。

研究方法

日本白色家兎(1.5-2.5kg)の骨髄を採取し、MSCを単離、培養を行った。PHK26(Sigma社製)を用いて標識されたMSCをpolyglycolic acid(以下PGA)のscaffoldに播種して一週間さらに培養した。ウサギ膝

関節大腿骨顆部荷重面に5×10mm、深さ2mmの軟骨下骨が十分に露出する軟骨欠損を作成し、培養組織を移植し、関節裂隙にSeptrafilm(GENZYME社製)をスペーサーとして使用し移植モデルとした。術後2・4・8・12週での肉眼的所見、組織学的評価、蛍光免疫染色(I型およびII型コラーゲン)を行い作成した移植片を評価した。

(倫理面への配慮)

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。

研究結果

作成した移植片は2週の時点で軟骨様の組織へと変化していたが、2週から8週までに作成された軟骨様組織の厚みは正常軟骨の2/3に減少していき、8週からは変

化しなかった。軟骨下骨にも PKH 陽性細胞は認められた。II型コラーゲンはほぼ軟骨様組織全体で発現が認められた。I型は軟骨下骨に近い部分でのみ発現が認められた。

#### 考察

未分化な MSC を骨軟骨欠損部に移植することで、低侵襲で骨軟骨様組織が作成可能であり、将来臨床的に応用可能と考えられた。

#### 結論

間葉系幹細胞（以下 MSC）は採取が容易で増殖能に優れ、低侵襲での軟骨欠損の治療が実現できる可能性を持っている。これらのことより、骨・軟骨複合組織の再生を目指す上で、MSC から骨、軟骨細胞に分化させた細胞をそれぞれ別に移植するよりも、今回の実験で用いたように移植する事で、より早期に、コスト削減の面からも有用である事が示唆された。

#### 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。

#### 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 $\beta$ -mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 10, 921-929, 2004

M. Tatebe, R. Nakamura, H. Kagami, K. Okada, M. Ueda. The formation of joint cartilage and bone by fluorescent labeled mesenchymal stem cells without differentiation. (*Clinical Orthopaedics and Related Research*) in preparation

Ikuo Hyodo, Bin Nakayama, Mitsuru Takahashi, Kzuhiro Toriyama, Yuzuru Kamei and Shuhei Torii: The gastrocnemius with soleus bi-muscle flap. *British Journal of Plastic Surgery*, 57: 77-82, 2004.

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

我々は、磁力を利用して細胞を自在に配置・配列する技術を組織工学に応用して、Mag-TE(Magnetic force-based tissue engineering)を開発した。本研究課題において、Mag-TE の技術を用いて、磁力で高密度に間葉系幹細胞 (MSC) を播種・培養することによって、MSC の増殖を促進させることができることを示した。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。

#### 1. 研究目的

Tissue Engineering 分野における工程では、患者の細胞を増幅する工程と、増幅した細胞を三次元的に再構築する工程に分類することができる。我々は機能性磁性微粒子である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。今年度は、この技術を用いることで、MSC の増幅培養法を開発した。

#### 2. 研究方法

機能性磁性微粒子を用いた MSC の増幅培養  
磁性微粒子であるマグネタイトを脂質二重膜であるリポソームで包埋して、その表面に MSC 特異的な抗体である抗 CD105 抗体を結合した AML(Antibody-conjugated magnetoliposome : 図 1)を、顎骨あるいは腸骨から採取した骨髄液を 1 ml 含む培地(total 10 ml)に添加した。AML 添加後、骨髄液を培養面積 55cm<sup>2</sup> の培養皿に播種した。播種の際に、上面の面積が 3cm<sup>2</sup> 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、AML 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。

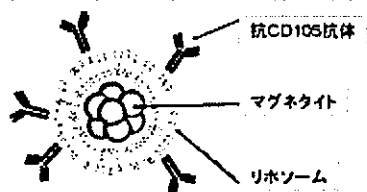


図 1 AML の模式図。粒子径は 140

さらに、本方法で得られた細胞が MSC であることを同定するために、骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨細胞への分化誘導培地で培養を行うことで、多分化能を評価した。

#### 3. 研究結果

AML を添加して、磁石を設置した場合、磁石を設置した部分に細胞が集積している様子が観察された。播種して7日後の細胞数を測定したところ、磁石を用いなかった場合では、顎骨髄液からは細胞は得られず、腸骨髄液からもわずかな細胞しか得られなかった。一方、磁石を用いた培養では、対照群と比べて、明らかに多数の細胞を得ることができた(図 2)。さらに、腸骨あるいは顎骨の骨髄液から得られた細胞は、アルカリホスファターゼの発現誘導およびカルシウムの沈着が見られたことから骨芽細胞への分化能が、脂肪滴の形成から脂肪細胞への分化能が、さらにトリジンブルーおよびII型コラーゲン陽性であったことから軟骨細胞への分化能が確認された。

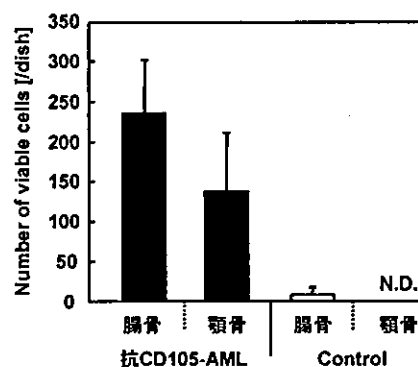


図2. 磁石を用いた高密度播種による細胞増殖の促進

#### 4. 考察

本実験では対照群として、1 ml の骨髓液を 55cm<sup>2</sup> の培養皿に播種した群を用いた。この従来法と比較して、AML を用いて高密度播種することで、多数の細胞数を得ることができた。これは、低密度に播種された細胞は細胞増殖に遅れがでるためだと考えられる。その理由として、細胞が分泌するサイトカイン等の成長因子によるオートクライン作用が考えられる。MSC は Dickkopf-1 (Dkk-1) の自己分泌によって細胞増殖が開始するといった報告がある。MSC を、AML を用いて高密度に播種することによって、Dkk-1 等のオートクライン因子の濃度が高まり、lag time なく増殖が開始したと考えられる。

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。

#### 5. 評価

##### 1) 達成度について

組織工学における重要な工程である細胞増幅法について、磁性微粒子と磁力を用いるといった全く新しい方法論で取り組み、成功するといった成果をあげた点で、基礎研究としては80%以上の達成度が得られたと考えられる。しかし、この新手法“Mag-TE”は、未だ基礎研究の段階であるので、今後臨床応用するために、さらに具体的で詳細な検討が必要となる。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究成果は、国際的な専門誌で発表されており、学術的に評価されている。また、再生医療分野の新しい方法論を開発したことから、医療福祉の点で社会的意義を持つと考えられる。

##### 3) 今後の展望について

本研究で開発した Mag-TE 法を幅広い細胞・組

織・臓器に応用していき、その中で Mag-TE の威力が最も発揮されるケースを見つけて、臨床応用を目指す。

##### 4) 研究内容の効率性について

本研究に関連した成果は、この1年間で11件の学会発表および9報の論文発表が行われており、高い効率で成果をあげているといえる。

#### 6. 結論

磁力を利用して細胞を自在に配置・配列する技術を組織工学に応用して、Mag-TE を開発した。本研究課題において、Mag-TE の技術を用いて、磁力で高密度に MSC を播種することによって、MSC の増殖を促進させることができることを示した。これらの結果から、Mag-TE 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。

#### 7. 研究発表

##### 1) 国内

口頭発表 9件

原著論文による発表 0件

それ以外 (レビュー等) の発表 2件

そのうち主なもの

論文発表

論文

井藤 彰、本多裕之「磁性微粒子を用いた Tissue Engineering の開発」『ケミカルエンジニアリング』49巻 6-12頁 2004年

井藤 彰、本多裕之「ナノ磁性微粒子を用いた生体組織構築」『ケミカルエンジニアリング』印刷中 2005年

学会発表

井藤 彰、本多裕之「機能性磁性ナノ粒子を用いた Tissue engineering 手法の開発」 中化連秋季大会、名古屋大学、2004年9月17日

井藤 彰、各務秀明、上田実、本多裕之「機能性磁性微粒子を用いた三次元生体組織の構築-Mag-TE の開発」 日本組織工学会、砂防会館、2004年7月1



日

伊野浩介、井藤 彰、小林 猛、本多裕之「機能性磁性微粒子を用いた細胞シートの作製」 日本生物工学会、名城大学、2004年9月21日

日比野恵里、井藤 彰、小林 猛、寺崎浩子、各務秀明、上田 実、本多裕之「Mag-TE による網膜色素上皮シートの作製と移植」 日本生物工学会、名城大学、2004年9月21日

本多裕之、井藤 彰「ナノ磁性微粒子を用いた生体組織構築」 日本バイオイメージング学会、京都府立医科大学、2004年11月5日

井藤 彰、各務秀明、上田 実、本多裕之「磁性ナノ粒子を用いた組織工学手法の開発」 日本再生医療学会、大阪国際会議場、2005年3月1日

伊野浩介、林田真生、小林 猛、井藤 彰、本多裕之「磁性ナノ粒子を用いた管状組織の構築」 化学工学会、名古屋大学、2005年3月22日

清水一憲、吉田達郎、井藤 彰、小林 猛、山田陽一、上田 実、本多裕之「磁力を用いた間葉系幹細胞シートの作製」 化学工学会、名古屋大学、2005年3月22日

井藤 彰、日比野恵里、小林 猛、山田陽一、日比英晴、上田 実、本多裕之「抗体結合型マグネトリポソームを用いた間葉系幹細胞の濃縮培養法」 化学工学会、名古屋大学、2005年3月22日

## 2) 海外

口頭発表 2件

原著論文による発表 7件

それ以外 (レビュー等) の発表 0件

そのうち主なもの

### 論文発表

Akira Ito, Masao Hayashida, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi "Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force" *Tissue Engineering*, 10, 873-880, 2004.

Akira Ito, Eri Hibino, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi "A new methodology of mesenchymal stem cell

expansion using magnetic nanoparticles" *Biochemical Engineering Journal*, 20, 119-125, 2004.

Akira Ito, Yohei Takizawa, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi "Tissue engineering using magnetite nanoparticles and magnetic force: heterotypic layers of co-cultured hepatocytes and endothelial cells" *Tissue Engineering*, 10(5/6), 833-840, 2004.

Akira Ito, Eri Hibino, Hiroyuki Honda, Chiaki Kobayashi, Hiroko Terasaki, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi "Construction and delivery of tissue-engineering human retinal pigment epithelial cell sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force" *Tissue Engineering*, in press, 2005.

Akira Ito, Kousuke Ino, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda "The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting" *Biomaterials*, in press, 2005.

Akira Ito, Kousuke Ino, Masao Hayashida, Takeshi Kobayashi, Hiroshi Matsunuma, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Hiroyuki Honda "A Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic force" *Tissue Engineering*, in press, 2005.

Akira Ito, Eri Hibino, Kazunori Shimizu, Takeshi Kobayashi, Yoichi Yamada, Hideharu Hibi, Minoru Ueda and Hiroyuki Honda "Magnetic force-based mesenchymal stem cell expansion using antibody-conjugated magnetoliposomes" *Journal of Biomedical Materials Research*, in press, 2005.

### 学会発表

Akira Ito, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Hideaki Kagami, Minoru Ueda, Takeshi Kobayashi, "Construction of multilayered cell sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force" APCChE 10th Congress, October 17, 2004, Kitakyushu, Japan.

Akira Ito, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Hideaki Kagami, Minoru Ueda, Takeshi Kobayashi, "Construction of multilayered cell sheets using magnetite nanoparticles

and magnetic force” YABEC 2004, September 24, 2004,  
Osaka, Japan.

8. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

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 名古屋大学エコトピア科学研究機構 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。

また、新たに非晶質炭素系材料およびシリカ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。血漿タンパク質 (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。

(3) 超はっ水・超親水パターン上での細胞接着性

自然界には、ハス、サトイモなどの植物の葉のように、水滴を球に近い形ではじく超はっ水性を示すものがある。こうした植物の超はっ水性表面は、疎水性の微細な突起や毛などで覆われているという特徴を持っている。一方、このような構造をもつ有表面に親水基を導入すること

により、超親水性を示すことが知られている。本研究では、マイクロ波プラズマ CVD および真空紫外光 (VUV) リソグラフィを用いて超はっ水/超親水パターンの作製およびその細胞親和性に関する検討を行った。

超はっ水膜は、マイクロ波プラズマ CVD 法を利用し作製した。成膜条件は、トリメチルメトキシシラン (TMMOS), Ar の分圧をそれぞれ 26.7 Pa, 46.7 Pa, マイクロ波出力を 300 W であった。成膜後、TEM メッシュをフォトマスクとして利用し、真空紫外光リソグラフィにより、超はっ水/超親水パターンを作成した。最後に、超はっ水/超親水パターンを基板とし、マウス線維芽細胞 (NIH-3T3) を培養し、微細構造化表面の細胞親和性あるいはその特異性について詳細に調べた。

(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°C 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。

(3) 図6に培養後3日目の細胞の光学顕微鏡像を示す。この図から、細胞は超親水領域に位置選択的に成長していることがわかる。

#### 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。

(3) 超はっ水・超親水パターン上では、超親水領域に選択的に線維芽細胞が接着した。これと比較するため、疎水性の自己組織化単分子膜(SAM)を利用し、はっ水・親水パターンを作製し、細胞を培養させた。しかし、超はっ水/超親水パターン基板上のような高度な選択性は得ることが出来なかった。つまり、超はっ水領域および超親水領域の双方を細胞が認識することにより、上記の選択性が実現しているものと考えられる。

#### 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

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

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。  
Y. Wu, M. Kouno, N. Saito, Y. Inoue, O. Takai, Impact of Water Droplets on Ultra Water-Repellent Surface: Their Shape and Energy Dissipation, *MRS 2004 FALL MEETING*, Nov. , 2004, Boston, America.

中西一生、河野正雄、呉雲影、齋藤永宏、井上泰志、井藤彰、本多裕之、高井治、マイクロ構造化超はっ水・親水表面上でのキャピラリー血管一括形成、表面技術協会 第111回講演大会、平成17年3月14日～16日、千葉工業大学(講演奨励賞)  
呉雲影、河野正雄、中西一生、齋藤永宏、井上泰志、井藤彰、本多裕之、高井治、超はっ水性表面を利用した新規細胞培養

法の開発、表面技術協会 第111回講演大会、平成17年3月14日～16日、千葉工業大学

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許の名称：所定のパターンの細胞物生産方法及び該生産用基板

出願日：平成16年9月8日

出願番号：特願2004-261216

発明者名 (寄与率)：高井治 (20%)、齋藤永宏 (20%)、呉雲影 (20%)、本多裕之 (20%)、井藤彰 (20%)

出願人 (持ち分)：名古屋大学 (100%)

特許の名称：生体有機体の生産方法及び該方法に用いる容器

出願日：平成16年3月31日

出願番号：

発明者名 (寄与率)：高井治 (20%)、齋藤永宏 (20%)、呉雲影 (20%)、本多裕之 (20%)、井藤彰 (20%)

出願人 (持ち分)：名古屋大学 (100%)

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

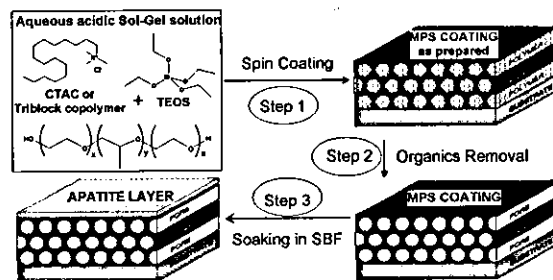


図1 MPS膜作製に使用した手順



図2 MPS上に形成したアパタイト

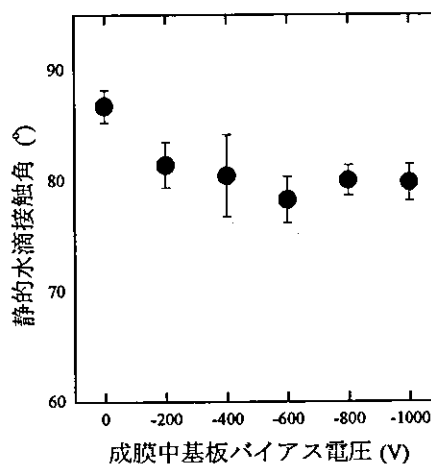


図3 各成膜中基板バイアス電圧で作製

した a-CN 薄膜の静的水滴接触角

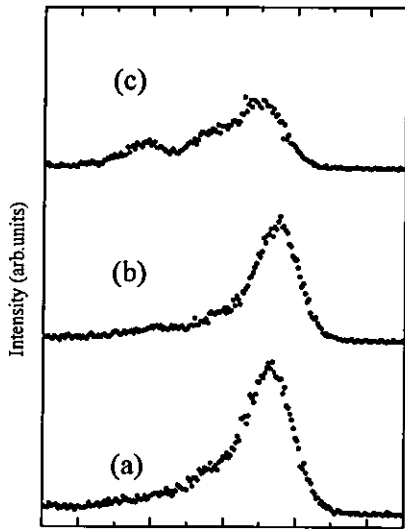


図4 XPS  $C_{1s}$  スペクトル ((a) 各溶液浸漬前の a-CN 薄膜, (b) PBS 溶液に浸漬した a-CN 薄膜, (c) フィブリンノーゲンを溶解した PBS 溶液に浸漬した a-CN 薄膜)

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

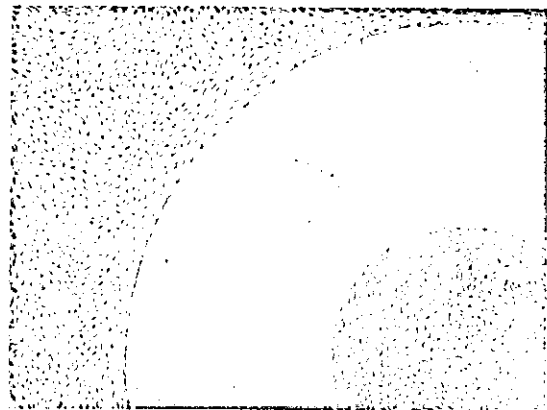
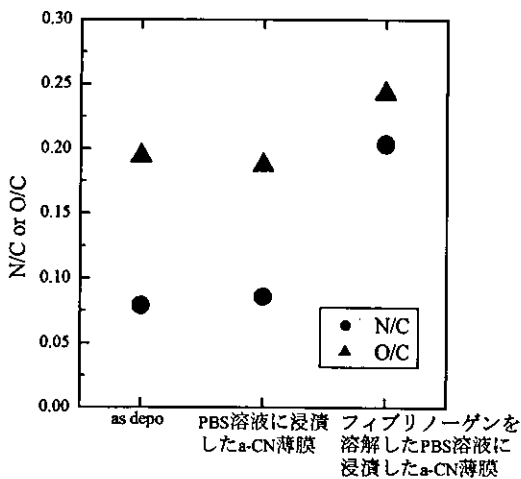


図6 超はっ水・超親水上でのマウス線維芽細胞培養. 超親水性領域に細胞が選択的に接着している.





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

培養器の表面性状の改良

分担者 小林一清 名古屋大学工学研究科 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、自己組織化単分子膜で表面改質されたシリコンあるいはガラス基板上に、糖鎖高分子を吸着させることにより、一つの基板に異なる分子シグナルを微細提示した。この基板を用いて、疎水性相互作用によって自己組織化する糖鎖高分子と、静電相互作用や水素結合によって自己組織化するプロテオグリカンのマイクロパターン形成を試みた。糖鎖高分子はレクチン認識性を有し、またプロテオグリカンの一つヘパリンは維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor ; FGF) と特異的な相互作用を示すことがわかっている。これらを用いて、生体シグナルである二つの糖鎖の微細提示とこれに続く蛋白質の提示をした。

A. 研究目的 材料のナノ構造を制御する技術は格段の進歩をみせている。ナノテクノロジーを生体材料に応用することによって、優れたバイオ材料を開発することができる。例えば、微細構造化したバイオマテリアルは優れた生体適合性を示すようになることが報告されている。

ナノまたはセミマイクロ領域の構造を制御する上で、自己組織化を活かすと、精緻な構造を造るのに有用である。特に光リソグラフィなどのトップダウンの手法と分子の自己組織化を同時に用いることで、望みのマイクロ構造を容易に得ることができる。我々はシリコン基板上に、自己組織化単分子膜を形成させ、両親媒性を有する糖鎖高分子を選択的に自己組織化させた。これを生体高分子のマイクロ構造制御に利用して、糖鎖と蛋白質を容易にマイクロ構造化した表面を得られること、

その表面が優れた生体認識性を有していることを示してきた。本研究では、2種類の糖鎖分子、糖鎖高分子とプロテオグリカンを用いて、自己組織性を用いることで、2種類の糖、2種類の蛋白質を選択的に提示することを目標とした。

B. 研究方法 シリコン基板上 Octadecyltrimetoxysilane (ODS) の自己組織化単分子膜のマイクロパターンを光リソグラフィによって作製した。3-aminopropyltriethoxysilane (APS) をレジスト領域に自己組織化させ、2種類のマルチパターンを形成した。糖鎖高分子 (PVLA) の疎水性相互作用、および Heparin の静電相互作用によって生理学的にマイルドな条件で、選択的に自己組織化した。さらに集積化された糖鎖高分子を蛍光ラベル化レクチンによって結合させ、階層

化させた。FITC および TRITC で蛍光プローブされたパターンの観察は、蛍光顕微鏡で観察を行った。

C. 研究結果 シリコン 基板上に施した ODS と APS の複合パターンに対して、自己組織性を活かして選択的に生体高分子を並べるために、ODS あるいは APS の各パターンに対する糖鎖高分子、およびレクチンの吸着の挙動をエリプソメーターと接触角、X 線光電子分光法 (XPS) によって解析した。ODS-SAM 上に疎水性相互作用による糖鎖高分子 (PVLA) の吸着、または APS-SAM 上の静電的相互作用による Heparin の吸着は、ナノレベルの薄膜を形成し、糖鎖を自己組織的に固体表面上に修飾させる有効性が示唆された。これらの知見を応用し、ODS-SAM と APS-SAM の複合パターンを作製し、糖鎖・タンパク質といった複数の生体高分子の自己組織化を試みた。ODS と APS 上に構築された PVLA、および Heparin の薄膜に、FITC や TRITC によって蛍光ラベル化されたレクチンを作用させ、蛍光顕微鏡写真で観察した。ODS-SAM 上には、FITC 由来の RCA120 の蛍光が観察された。一方で、ODS のレジスト領域、つまり APS-SAM 上には、TRITC のパターンが観察できたことから、bFGF の存在が確認された。その蛍光画像の S/N 比は、それぞれ 3.1 および 2.2 であることを解析した。以上より、RCA120 や bFGF の特異的な吸着によって、糖鎖高分子や Heparin の自己組織化と、糖鎖による認識を利用したタンパク質の規則的な階層化が確認された。

D. 考察 疎水性相互作用と静電相互作用さらにタンパク質と糖鎖の相互作用という、幾つかの分子認識を組み合わせて、複雑かつ精緻な構造を有する材料の構築の可能性を示した。自己組織化単分子膜を介してシリコンあるいはガラス表面を改質する手法は、生体高分子の平滑で安定な機能表面の提示とその複合化において有効であることがわかった。

E. 結論 複数の生体高分子の微細構造を制御する手法は、細胞膜を模倣する機能表面の開発が可能になり、バイオチップや細胞培養材料の開発に大いに役立つだろう。この選択的自己組織化の手法は、自己組織性を用いた材料工学として極めて新しく、有用な手法であることを記しておきたい。

#### F. 健康被害情報 特になし

研究発表

論文発表

Miura, Y.; Ikeda, T.; Kobayashi, K. Chemoenzymatically Synthesized Glyco conjugate Polymers, *Biomacromolecules*, 4, 410-415 (2003).

Miura, Y.; Sato, H.; Ikeda, T.; Sugimura, H.; Takai, O.; Kobayashi, K. Micro-Patterned Carbohydrate Displays by Self-Assembly of Glyco-conjugate Polymers on Hydrophobic Templates on Si, *Biomacromolecules*, 5, 1708-1703 (2004).

学会発表

佐藤元, 三浦佳子, 齋藤永宏, 高井治,  
小林一清 “糖鎖高分子によるマイクロ構造  
化インターフェースの創製” 第53回高分子  
分子討論会, 口頭発表, 札幌, 2004年9月  
H, Sato.; Y, Miura; N, Saito.; K, Kobayashi.;  
O, Takai. Assembly of Glycoconjugate  
Polymers on Hydrophobic Templates on

Silicon. MRS (Materials Research Society)  
fall meeting. 608. Boston, U.S. December  
2004.

H, Sato.; Y, Miura; N, Saito.; K, Kobayashi.;  
O, Takai. Saccharide display on the silicon  
surface. 5-th international symposium on  
Biomimetic Materials Processing (BMMP).  
71. Nagoya, Japan. January, 2005.

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、実際の臨床応用を視野に入れた注入型軟骨作製および3次元培養におけるマトリックスの至適材料の検討を行った。本年度は特に、天然のマトリックスにより類似し、かつ軟骨再生のキーとなる細胞増殖因子が有効に作用するグリコサミノグリカン鎖結合マトリックススキファオールドの有効性を組織学的、生化学的にも確認した。

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目的として、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を実際の臨床応用を視野に入れて検討を行った。

B. 研究方法

注入型および3次元培養における軟骨組織再生の面から至適材料の検討を行い、PLC（ポリ乳酸-ε-カプロラクトン共重合体）などの生体内で分解可能なポリマーを選択した。グンゼ株式会社で開発されたPLCはポリ乳酸とε-カプロラクトンの量比を75:50(75PLC)と50:50(50PLC)のものを用意し、さらにこれらをコラーゲンでコートしたhybrid-PLCやコラーゲンゲルも用意した。ラットの肋軟骨から得た軟骨細胞、牛の関節軟骨から得た軟骨細胞をあらかじめ整形されたスキファ

ールドマトリックスに播種し、2時間後にマトリックスに不接着の細胞を洗い流した後、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で培養した。一部の軟骨細胞を以下に示すポリマーマトリックスに播種し、1日培養後にヌードマウスの背部皮下に移植を行い、2週、4週後に組織をアルシアンブルー染色、基質アグリカン量、リアルタイムPCR（GDH（グリセロール脱水化酵素）をコントロール）により基質アグリカン mRNA 発現レベルを中心とした軟骨マーカーの発現を指標にそれぞれのマトリックスを評価した。PLCに天然の場に近い、グリコミノグリカン糖鎖の効果を加えるため、PLCマトリックスへグリコサミノグリカン鎖を以下のようにして結合させた。グリコサミノグリカンのホスファチジルエタノールアミンジパルミトイル誘導体（GAG-PE）水溶液をPLCに加えて4℃で結合させ、その後リン酸緩衝液で良く洗浄して未結合のものを洗い流して行った。

C. 研究結果