アパタイトファイバースキャフォルドによる再生培養骨の構築およびその生体内反応

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2023-05-31
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 鈴木, 来
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/10291/00023162

明治大学大学院理工学研究科

2022 年度

博士学位請求論文

（要約）

アパタイトファイバースキャフォルドによる再生培養骨の構築およびその生体内反応

（Construction of tissue-engineered bone using apatite-fiber scaffold and its living reaction）

学位請求者　応用化学専攻

鈴木　来

日本は超高齢社会となり内閣府が発表した令和 4 年版高齢社会白書では、2025 年には 65 歳以上の高齢化率が 30%を超えると予測している。高齢者数の増加にともなって、運動器疾患患者の増加が懸念されている。さらに、この運動器疾患には骨に関するものが多く、現在のまま対策がない状態であると「生活の質 (Quality of Life: QOL) 」の低下が懸念され、健康長寿社会の実現が困難となる。高齢者の QOL を高めるとともに、医療費の増大を抑制するため、健康寿命延伸を実現することは喫緊の課題である。近年、事故や疾病により失われた組織を再生させる“ティッシュエンジニアリング”に関する研究が活発に行なわれている。ティッシュエンジニアリングは、「細胞」、「成長因子」、「足場材料 (スキャフォルド) 」の三つの要素から成り立っており、その三要素を適切に組み合わせることで組織再生が実現可能となる。

生物における骨は体を支える重要な器官である。それゆえ、皮膚などと同様に、骨は体の中で古い組織から新しい組織へと更新されている。また、骨が傷ついた時にも同様である。これを「骨リモデリングプロセス」と呼ぶ。健康な骨はこの自然の骨再生プロセスである「骨リモデリングプロセス」を受けることから移植する生体材料についてもこのプロセスは大きく関与するといえる。

当研究室では、これまでに均一沈殿法により合成したアパタイトファイバー (Apatite fiber: AF) と、カーボンビーズ (~150 μm) を混ぜ合わせ焼成し、繊維の絡み合いによる細孔径の気孔に加えて、カーボンビーズの焼失に由来する細胞が材料内部まで侵入可能な大孔径連通気孔を有するスキャフォルド (Apatite-fiber scaffold: AFS) の開発に成功している。この AF は *c* 軸方向に配向し、生体骨と類似した結晶面（*m* 面）を多く露出している（本論文では慣例的に以後「*a* 面」と表記)。この AFS は前述した三次元連通気孔を有し、AF を用いていることから形成されるミクロポアも有する足場材料であることは特徴の 1 つである。組織再生用のスキャフォルドは、三次元連通気孔（マクロポア)を有することで、三次元状の組織再生が可能である。再生医療の対象となる組織は多種あり、そのほとんどが複雑な三次元構造を持つ組織である。そのため、再生医療を実現するには、三次元組織を再生させる培養技術の確立が必要不可欠である。

骨再生に関する取り組みとして、当研究室ではこれまでに AFS とラジアルフロー型バイオリアクター (Radial-flow bioreactor: RFB) を利用して、ラット骨髄由来間葉系幹細胞 (Rat bone marrow stem cell: RBMC) を組み合わせて、三次元高密度循環培養することにより三次元的な構造を持つ「再生培養骨」の構築に成功している。RFB の流速のような力学的刺激が骨再生に与える影響を調査し、RFB の流速を変化させることにより、異なる条件下で構築した各再生培養骨の組織学的および生物学的評価を行ない、*in vitro* 条件下での最適な流速を決定している。このように AFS は成形が容易であるために、バイオリアクターにも応

用できる。臨床で求められるセンチオーダーの再生培養骨の構築が可能であり、骨形成能の向上に寄与するイオンのドープ等を行なわない条件でも骨形成能を高めることができる。このような技術は我々の知る限り例はない。

本論文の目的は、これまでの知見に基づき構築された再生培養骨の培養条件の最適化と生体内反応の調査である。次に得られた生体内反応と骨形成能との因果関係を究明することは、より高い機能を持つ人工骨を作製するうえで設計指針となる。本論文では生体骨と類似した結晶構造を有する AF を用いて作製した足場材料を利用したことが特徴的な点の 1 つである。そこで、水酸アパタイト（HAp）の結晶面に着目し、HAp の *a* 面が骨リモデリングプロセスに関与する細胞に影響を与えたと仮説を立てた。骨形成を担う骨芽細胞および骨吸収を担う破骨細胞に焦点をあて、各細胞と HAp の *a* 面との関係性を調査した。

本論文の構成は以下のようになっている。

第 2 章では、臨床応用可能な大型の再生培養骨を構築するための培養条件の最適化を目的として、AFS を装填した RFB による RBMC の培養期間の検討を行なった。RFB を使用した培養は、通常培地と骨分化誘導培地を用いて行なった。ここで、通常培地での培養を 0週、1週および 2週、骨分化誘導培地を用いた培養期間を 0週、1週および 2週として、各培地での培養期間を組み合わせた、合計 8種類の培養条件下で再生培養骨を構築し、骨分化進行レベルを調査した。

第 3 章では、第 2 章で得られた知見をもとに構築した再生培養骨が生体内でも骨形成能を発揮するかを評価するために、同種のラット背部皮下への埋入試験を行なった。まず、予備的検討として、小型のAFS (直径 6-8 mm、高さ 3-4 mm) に RBMC を播種し、ラット背部皮下へ埋入して組織学的評価にて骨形成能を評価した。続いて、最適化した培養条件下で RFB を用いて構築した再生培養骨を、7 週齢の雄ラットの背部皮下へ埋入した。

第 4 章では、第 3 章で明らかにした再生培養骨の優れた骨形成能の成因を精査するため、骨芽細胞を用いた *in vitro*系での実験を計画し、HAp の *a*面が骨形成に関与する細胞に対してどのような影響を与えたかの解明を目指した。我々はこれまでに開発した AF およびアパタイトゲルから作製することに成功している *a*面を多く露出したHApセラミックス (*a*-HAp) を使用して、アパタイトセラミックスの異方性構造と骨芽細胞の応答性を調査した。

第 5 章では、第 3 章で明らかにした再生培養骨の優れた骨形成能の成因を骨吸収の視点から精査するため、*a*-HAp を用いてアパタイトセラミックスの異方性構造と骨吸収を担う破骨細胞との応答性を調べた。

第 6 章では、第 2 章から第 5 章までに得られた知見をまとめて研究全体を総括した。

各章の結果について、要点を記載する。第 2 章では、RFB を用いた培養期

間が骨分化にどのような影響を与えるかを調査した。種々の培養期間を設定し、RFB を用いた再生培養骨の構築を行ない、骨分化マーカーの定量評価や凍結切片に対する組織学的評価をもとに調査を行なった。培養期間が長くなるほど、DNA量、アルカリフォスファターゼ（ALP）活性値およびオステオカルシン（OC）産生量が増加する傾向があることが分かった。その傾向は、骨分化誘導培地を用いた期間が長いほうが強いことが分かった。他の報告でも、力学的な刺激が骨分化の促進に寄与することが報告されており、本研究での結果もその報告と類似している。本研究では、通常培地での培養を 1週間、骨分化誘導培地での培養を 1週間行なった実験系が ALP活性値および OC産生量が比較的高いため、最適な培養期間であると結論付けた。

第 3 章では、これまでの知見および第 2 章で最適化した条件で構築した再生培養骨が生体内でも骨形成能を有するかを調査することを目的とした。本章は、まず小型の AFS で RBMC を培養しラットの背部皮下へ埋入した予備的検討を行なった研究と RFB を用いて再生培養骨を構築し、ラットの背部皮下へ埋入した研究で構成される。まず、RBMC を用いて、培養を行なった。RBMC 懸濁液を調製し、2.0×10^5 個の細胞を AFS に播種し、1 週間培養した。なお、通常培地で培養した試料は「AFS (−) 」と示す。また、骨分化誘導培地で培養を行なった試料を「AFS (+) 」とした。ラットに対して作製した試料を埋入した。試料は、次の 3 つであり、(1) AFS 単体 (Control), (2) AFS (+), (3) AFS (−) とした。なお、Control は、AFS を通常培地に 1 日間浸漬した後に皮下組織へ埋入した。組織学的評価を行なうために、2 週間後にラットを屠殺した。

埋入前の AFS (+) および AFS (−) の凍結切片に対して、ヘマトキシリン・エオジン (HE), ALP およびアリザリンレッド S (ARS) 染色で組織学評価を実施した。HE 染色は、AFS (+) および AFS (−) ともに細胞が AFS 骨格に沿って成長していることを示した。AFS (+) および AFS (−) は、カーボンビーズを焼失させることによって生成されたマクロポアを経由して、細胞が AF の足場に効率的にアクセスし、付着して、細胞が増殖した様子が観察された。ALP 染色により、AFS (−) に比べて AFS (+) には多くの ALP 陽性細胞 (骨芽細胞様細胞) が存在し、AFS (−) においても ALP 陽性細胞が AFS 骨格に沿って観察された。これらの違いは、骨分化誘導培地の使用の有無と一致している。ARS 染色の結果より、AFS (+) および AFS (−) の両方で石灰化した細胞が確認された。ALP 染色の結果と同様に、AFS (+) は AFS (−) よりも高い石灰化レベルを示した。しかしながら、AFS (−) でも一部石灰化部位が検出された。これは、非骨分化誘導条件下でも石灰化が観察されていることから、HAp 自身が単独で間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化を促進する可能性があることを示唆している。ゆえに、ALP および ARS 染色の結果から、AFS (+) には骨芽細胞の分化の初期および後期段階の細胞が存在していることが明らかになった。

埋入した試料片は回収後、凍結切片を作製し、HE, ALP および ARS 染色による組織学的評価を行なった。HE 染色の結果から、埋入された AFS は、2 週間ではほとんど溶解および生体内での吸収は認められなかった。また、埋入した AFS は軟組織で覆われていた。さらに、埋入試料と皮下組織との間の界面に線維組織は観察されなかった。これらの結果は、AFS が炎症や免疫学的反応を誘発せず、*in vivo* 環境下で高い生体適合性を有することを示した。*In vivo* 環境下における骨分化誘導の実施の有無に対する影響を調査するために、ALP 染色および ARS 染色で各試料片の骨分化の進行レベルを調査した。ALP 染色の結果では、AFS (+) において試料内部に多くの ALP 陽性細胞が見られた。しかしながら、Control および AFS (−) では、ALP 陽性細胞の数は AFS (+) よりも少なかった。 さらに、AFS (+) の ALP 染色の色が他のサンプルに比べて濃い青色になっていたため、AFS (+) は他のサンプルよりも高い ALP 活性を発現しているが分かった。 これらの結果は、*in vivo* 環境下で AFS (+) は Control および AFS (−) と比較して、骨芽細胞の骨分化を促進させることを示している。*In vitro* 環境下での結果と同様に、ARS 染色は、Control および AFS (−) と比較して、AFS (+) で広範囲の石灰化が観察された。これらの違いは、*in vitro* 環境下であらかじめ骨分化誘導培地を用いた分化誘導を行なったためだと推察される。これらの予備的検討の結果、骨分化を誘導した細胞を播種した AFS の方が細胞を播種していない AFS よりも高い骨形成を示すことを明らかにした。

次に、RFB を用いて構築した再生培養骨を同種のラット背部皮下に埋入し、その骨形成能を調査した。第 2 章で使用したバイオリアクターに装填可能な AFS を作製し、細胞を播種する 1 日前に RFB に装填し、通常培地に浸漬した。RBMC の三次元細胞培養には、チャンバー容積が 5 cm^3 の RFB (ABLE 製) を使用した。なお、使用した RFB のシステムは第 2 章のシステムと同様である。培地に懸濁した RBMC を RFB のリザーバーに注入した。培地の流量は、我々の以前の報告に基づいて、最適な培地の流量である 6.3 $cm^3 \cdot min^{-1}$ に設定した。RFB を用いた培養は通常培地中で 1 週間行なった。その後、骨分化誘導培地で 1 週間培養した。埋入 4 週間後に試料片は回収され、作製した凍結切片に対して HE および ALP 染色、加えて OC の免疫染色による組織学的評価を行ない、さらに ALP 活性の定量評価を実施した。

予備的検討と同様に、埋入する前の再生培養骨の一部に対して組織学的評価を実施した。組織学的評価として、切片に対して HE 染色および ALP 染色を行なった。また、OC の免疫染色を行なった。加えて、動的な環境下で構築した再生培養骨と静的な環境下で構築した再生培養骨の比較を行なった。HE 染色の結果から、「動的環境下」で構築した再生培養骨中の細胞は、AFS 骨格に沿って成長し、繊維状の足場全体に分布していた。しかしながら、「静的環境下」で培養した再生培養骨は、底部の細胞が少なかった。対照的に「動的環境下」で培養

された再生培養骨の細胞分布は比較的均一であった。さらに、ALP 染色の結果から、ALP 陽性細胞 (骨芽細胞様細胞) は再生培養骨の表面に存在することが確認された一方で、「動的環境下」で構築した再生培養骨は、「静的環境下」で構築したものと比較して、ALP 陽性細胞の数が多かった。さらに、免疫蛍光染色の結果より、静的条件下で構築された再生培養骨よりも「動的環境下」で構築された再生培養骨の方が細胞数が全体的に多いことが分かった。また、「動的環境下」で構築した再生培養骨は OC を発現した細胞が観察されたが、「静的条件下」で構築したものは OC を発現した細胞は少なかった。したがって、RFB の培地の循環によって与えられる機械的刺激は、骨分化を促進した可能性があると考えられる。静的な環境では、足場材料の上部に細胞が集中してしまい、細胞の生育や代謝物の循環に不利な環境となる。一方で、RFB による循環培養は、細胞を足場材料に対して均一に分布させ、培地の循環を効率よく行なえるため、細胞増殖に好適な環境を提供でき、骨分化が促進した再生培養骨を構築できたと考えられる。

埋入 4 週間後に再生培養骨を埋入した試料は回収された。作製した凍結切片に対して HE および ALP 染色によって組織学的評価を実施した。HE 染色の結果から、細胞が AFS の内部にまで浸潤していたことが分かった。構築した再生培養骨を埋入した試料 (RFB-bone) と 対照群である AFS (Control) は軟部組織で覆われていた。さらに、試料片と皮下組織との界面に線維組織は観察されなかった。これらの結果は、本試験系でも AFS が炎症や免疫学的反応を誘発せず、*in vivo* 環境下で高い生体適合性を有することを示した。また、*in vivo* 環境下で再生培養骨の骨分化の進行レベルを検証するために、ALP 染色を行なった。RFB-bone では、対照群と比較してより多くの ALP 陽性細胞が観察された。さらに、各サンプルの DNA 量によって正規化された ALP 活性値は、対照群よりも RFB-bone の ALP 活性が有意に高いことを示した。さらに、免疫蛍光染色の結果から、*in vitro* 環境下で観察されたように、RFB-bone において OC の発現が確認された。 HE および ALP 染色、さらに OC の免疫蛍光染色の結果は、構築した再生培養骨が *in vivo* 環境下で骨形成能を有する可能性を示唆した。

第 4 章では、HAp の *a* 面が骨芽細胞に対してどのような影響を及ぼすかを調査した。既報に基づき、モデル材料として、*a*-HAp を作製した。次に、*a*-HAp 上でヒト骨肉腫由来骨芽細胞 (MG-63) を培養し、増殖性、初期付着性および骨分化促進能を調査した。電子線後方散乱回折法 (EBSD) を用いた結果から、作製した *a*-HAp は HAp の結晶面である *a* 面を多く露出していることが分かった。次に MG-63 を用いた試験から、いずれのセラミックス間においても細胞増殖性に差は少ないことが分かった。次に初期付着性を調べた試験では、太平化学産業製の HAp-100 粉体を使用したセラミックス (*i*-HAp) に比べて *a*-HAp の初期付着性は低い傾向にあることが分かった。しかし、骨分化進行具合を調査し

た ALP 染色の結果では、骨分化誘導の有無にかかわらず、*a*-HAp 上では *i*-HAp に比べて ALP 陽性細胞が多く観察された。ARS 染色の結果からも、*i*-HAp に比べて *a*-HAp 上で石灰化部位が多く観察された。細胞の発現したタンパク質を二次元電気泳動で調査を行なったところ、両セラミックス間で違いが見られた。セラミックスの溶解性の試験の結果から、*a*-HAp の溶解速度が速いことが分かった。この要因として、*a*-HAp から溶出される Ca^{2+}イオンが関与したと考えられる。培養環境全体だけでなく、セラミックスと細胞との界面の Ca^{2+}イオン濃度が上昇し、骨分化を進めた可能性も考えられる。中性環境下のイオン溶出は、培養開始後 1 週間で多かった。そのため、この播種後初期段階で、Ca^{2+}イオン濃度が上昇することが分化を促進する可能がある。また、*a*-HAp と *i*-HAp では、表面電位の違いから吸着するタンパク質も異なることが推察される。このような、複数の原因により骨芽細胞の骨分化が促進したと考えられる。よって、HAp の *a* 面は骨芽細胞の骨分化を促進することが示唆された。また、ALP 活性値の定量結果から、骨分化誘導環境下での培養を 1 週間および 2 週間行なった実験系ともに、*i*-HAp に比べて *a*-HAp の活性値は高い傾向であった。さらに、2 週間培養を行なった実験系では、その活性値は有意に高かった。よって、特に骨分化初期段階を速めることが示唆された。

第 5 章では、骨吸収に関わる破骨細胞に対して、HAp の *a*面がどのような影響を及ぼすかを調査した。モデルセラミックスは第 4 章で使用した *a*-HAp とした。対照群として、太平化学産業製の HAp-100粉体から作製したセラミックスである *i*-HAp を使用した。マウスの大腿骨より骨髄を得て、分離・分化誘導を経て得た前破骨細胞を各セラミックス上へ播種し、蛍光染色、組織学的評価等を実施した。また、破骨細胞の骨吸収能を調査するために、破骨細胞が形成したハウシップ窩を原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて調査した。また、破骨細胞の応答性の違いを検証するために、外部環境下に Ca^{2+}イオンおよび PO_4^{3-}イオンを添加して、その要因の調査を試みた。

a-HAp および *i*-HAp上において多核細胞が認められた。また、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色の結果から、どちらの細胞も TRAP陽性細胞であることが分かった。一方で、破骨細胞の細胞形態がセラミックス間では異なっていた。画像解析ソフトを用いてこの面積を計測し、統計ソフトで解析したところ、有意に *i*-HAp上の細胞面積が大きいことが分かった。また、AFM によるハウシップ窩の表面状態の測定結果を解析したところ、*a*-HAp上で形成されたハウシップ窩の表面粗さは、*i*-HAp のものより粗く、さらにその増加量は *a*-HAp のもので有意に高かった。さらに、本研究で定義するハウシップ窩の深さは、*a*-HAp のもののほうが有意に深かった。

この原因を究明するために、培養期間と同じ期間の溶解性試験を中性環境および酸性環境で行なった。その結果、酸性環境、中性環境ともに *a*-HAp の方が

溶出する Ca^{2+}イオンおよび PO_4^{3-}イオンが多いことが分かった。この両者のイオンが破骨細胞へどのような影響を与えるかを調査すべく、それぞれのイオン外部添加した環境を構築して調査した。その結果、Ca^{2+}イオンは ~10 mmol・dm^{-3} までは細胞の分化を促進する可能性があり、それ以上であると細胞の形態異常を発生する可能性があると示唆された。また、PO_4^{3-}イオンは特に 10 mmol・dm^{-3} 程度添加することで形態異常を引き起こす可能性が示唆された。よって、培養環境中の各イオン濃度の違いが、セラミックス上の破骨細胞の細胞面積に影響を与えた一因であると示唆される。特に、破骨細胞とセラミックス間の Ca^{2+}イオン濃度が起因している可能性が高く、また、破骨細胞自身が骨組織の吸収量を制御している可能性が示唆された。よって、HAp の *a* 面は破骨細胞の活性に影響を与えることが示唆され、*a* 面は破骨細胞の吸収を受けやすいことが分かった。

本論文の成果からは、AFS はティッシュエンジニアリングの足場材料として有用な生体材料であることを示している。また、骨形成に関わる細胞と HAp の異方性は密接な関係があることが示唆される。特に、生体骨と類似した結晶構造である *a*面を多く露出させることは骨芽細胞の分化を促進し、破骨細胞の分化に影響を与えたことが示された。これらのことから、HAp の *a*面を多く露出させることは、骨リモデリングプロセスに関与する細胞に影響を与えたことになる。本論文の結果から、骨リモデリングプロセスに関わる細胞と HAp の *a* 面の関係性について考察する。第 4 章および第 5 章から、HAp の *a*面は破骨細胞の吸収を受けやすく、それにともなって、基質を溶解することに起因する Ca^{2+}イオンが多く放出されると推察される。続いて、破骨細胞からのシグナルを受け取った骨芽細胞が骨形成を行なう。適切なCa^{2+}イオン濃度は、骨芽細胞の分化・骨形成能を促進すると報告されている。本研究で用いた *a*-HAp は、*a*面を多く露出したことに由来する材料自体の溶解性の高さと、破骨細胞に対する吸収性の高さから、セラミックスと骨芽細胞間および細胞外環境に Ca^{2+}イオンが多く存在しやすい環境を構築する。結果として、HAp の *a*面が骨芽細胞の分化を促進することに寄与すると考えられる。加えて、HAp の *a*面を多く露出した構造は、骨リモデリングプロセスを円滑化に寄与する可能性がある。さらに、第 2 章および第 3 章で得られた結果から、構築した再生培養骨は動的な環境かつ適切な気孔構造がある足場材料を用いたため、足場材料に均一かつ、骨分化が進んだ状態で再生培養骨が構築された。また、その再生培養骨は *a*面を多く露出した構造を有する足場材料である AFS で構築されているため、生体内でも骨リモデリングプロセスが維持されやすい環境であり、良好な骨形成環境を提供できたと推察する。

本論文では、適切な Ca^{2+}イオン濃度が骨芽細胞と破骨細胞の活性に作用している結論付けた。しかしながら、この要素以外にも影響する因子はあると考え

らる。例えば、材料界面のタンパク質の状態や立体構造、さらには異方性制御セラミックスに接着したことにより細胞が発現するタンパク質など、解明しなければならない因子も存在する。

本論文で示した知見は HAp の異方性制御技術を用いて、骨組織に関与する細胞の機能をより高める可能性を示しており、新規なバイオマテリアルの創製に寄与できる。