

生命機能マテリアルによる次世代再生医療技術の構築および垂直統合型研究拠点形成

2012年度研究経過報告

相澤 守・長嶋比呂志・吉村英恭・渡邊友亮・平岡和佳子・竹中麻子・深澤倫子・神澤信行・
本田みちよ・松本守雄・石井 賢・松本秀男・二木康夫・江本 精・松浦知和

Development of Next-generation Regenerative Medicine Process Using Biomaterials with Life Function on the Basis of Vertical Integration System

M. Aizawa, H. Nagashima, H. Yoshimura, T. Watanabe, W. Hiraoka, A. Takenaka, T. Fukazawa,
N. Kanzawa, M. Honda, M. Matsumoto, K. Ishii, H. Matsumoto, Y. Niki, M. Emoto and T. Matsuura

1. はじめに：

再生医療は組織を形成する細胞、その細胞の足場となる材料(スキャフォールド)および細胞の成長因子を巧みに組み合わせることで組織を再生する技術である。他の先進諸国に先駆けて、超高齢社会に突入した我が国においては、「再生医療」は多くの方々の生活の質(Quality of Life; QOL)の向上を約束する医工学融合技術といえる。本研究では、「生命機能マテリアル」を用いて血管形成を含む機能的な三次元組織を再生させる技術を確立する。なお、本年度(2012年度)はプロジェクト開始の二年目であり、前年度の導入した設備などを有効に活用しながら研究を推進した。

2. サブプロジェクトと担当者：

本研究では、血管形成を含む機能的な三次元組織を再生させる技術を確立することを目的としているが、これを達成するためには、4つの要素技術：i) 三次元的な組織構築のためのスキャフォールド、ii) 三次元組織を構築する培養方法の確立、iii) 血管の導入、iv) 評価系の構築を確立する必要がある。そこで、これらの4つの要素技術を確立するとともに、最終的にこれらを統合して次世代を見据えた「再生医療技術」を構築する。これまでの類似研究は、医療あるいは工学サイドで独自で展開されている場合が多く、組織再生に必要なスキャフォールドの創製から三次元組織の再生、生体内試験までを川上から川下まで一貫して研究する組織はほとんどなかった。本プロジェクトでは、密接な医工連携により次世代再生医療のための「垂直統合型研究拠点」を形成することも目的としている。

そこで、本研究プロジェクトのメンバーを、

- 1) 材料創製とその機能評価を行なう研究者 (研究者カテゴリー#1)
- 2) 創製した材料を生物学的な視点で評価・解析できる研究者 (研究者カテゴリー#2)

3) 創製した材料の実際の病態に即した臨床的研究を行なえる研究者 (研究者カテゴリー#3)

から構成し、それらが互いに有機的に連携した研究組織を構築した。現在、「医工連携」がひとつの潮流であるが、本研究ではそれに生物学的な要素も加えた「医理農工」による連携体制で研究に臨んでいる。

また、本プロジェクトでは、より効率的に研究成果をあげるため、チームを次の4つの部門に分類し、そのチームで以下のサブプロジェクトを推進している。なお、担当者の **Bold** は本学メンバーで、*斜体*は外部機関のメンバーである。

a) 生命機能マテリアルによる次世代スキャフォールドの創出

我々が独自に開発したアパタイトファイバースキャフォールド(AFS)などを「生命機能マテリアル」のモデル物質として使用し、次世代再生医療に貢献する新規なスキャフォールドを開発する。

[担当者：相澤・吉村・渡邊・深澤・本田]

b) 三次元組織の構築と機能

a)で開発したスキャフォールドを高密度三次元培養を可能にするラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)に装填し、三次元的な組織構築を指向した「三次元培養条件の最適化」を行う。より具体的には、未分化間葉系幹細胞などを利用して、その細胞の増殖と分化を調査する。再生する組織としては、骨・軟骨・肝の3つの組織を対象とする。

[担当者：相澤・竹中・神澤・松本(守)・石井・松本(秀)・二木・松浦]

c) 血管形成の制御

再生組織をより長期間にわたって機能させるには、血管を備えた骨組織や肝組織を構築する必要がある。ここでは、再生組織への血管導入を踏

また基礎研究を行い、その知見を b) にフィードバックすることで、当該プロジェクトの後半時期に「血管を備えた組織再生」を目指した研究を展開する。

[担当者：相澤・長嶋・神澤・江本・松浦]

d) *In vitro*→*in vivo* 評価系の構築

「再生組織」の生命機能の発現とそのメカニズムを検証するには、適切な評価系を構築する必要がある。まず、細胞を利用した *in vitro* 系で生命機能を評価する系を確立し、ついで実際の病態に即した評価ができるように *in vivo* 系で生命機能を評価する系を確立する。

[担当者：長嶋・相澤・平岡・本田]

上記の4つのサブプロジェクトは、これまで行ってきた共同研究の実績をふまえ、ある一定の期間内で優れた成果を挙げ、さらに本プロジェクトを世界レベルの研究拠点として発展させるため、以下の研究機関との共同研究体制で推進している。

- ① 慶應義塾大学医学部（整形外科教室）（研究者カテゴリー#3, 研究部門b)
- ② 東京慈恵会医科大学（臨床医学講座）（研究者カテゴリー#3, 研究部門b, c)
- ③ 国際医療福祉大学（研究者カテゴリー#3, 研究部門c)
- ④ 上智大学理工学部（物質生命理工学科）（研究者カテゴリー#2, 研究部門b, c)
- ⑤ 神奈川科学技術アカデミー（研究者カテゴリー#2, 研究部門d)

なお、これらのサブプロジェクトは代表者の相澤が統括するが、各サブプロジェクトにリーダーを設け（上記、担当者の下線）、十分にコミュニケーションをとりながら研究を遂行している。

3. 成果概要(2012年度) :

今年度は、プロジェクト2年目であり、前年度に整備した研究基盤体制を活用して研究を推進した。また、メンバー間での学際的交流を推進するため、概ね3-4ヶ月に1度の割合で、本学において勉強会を4回開催した。そのうちの一回は、「国際公開シンポジウム」とし、関連分野の外国人研究者(Dr. Saksit Chanthai, Khon Kaen University, Thailand)を招へいし、”QuEChERS : A Primer Mean for Sample Preparation Optimization and Analytical Techniques in Food Safety and Quality, and Various Featured Applications”と題する講演会を開催した。

本プロジェクトの概略と計画（マイルストーン）を以下に示す。まず、最初の3年間を「phase



I] と位置付け、三次元的な骨・軟骨・肝組織の再生と血管新生に係わる基礎研究を推進する。ついで、後半の2年間を「phase II」と位置付け、複数組織の同時再生を目指す応用的な研究を実施する。

以下、簡単に各サブプロジェクトの成果を記載する。

1) 生命機能マテリアルによる次世代スキャフォールドの創出 (相澤・吉村・渡邊・深澤・本田)

従来のアパタイトファイバースキャフォールド (Apatite-fiber scaffold; AFS) の作製方法を見直し、気孔形成剤であるカーボンビーズを粒径が 20 μm および 150 μm のものを 1 : 1 の割合 (質量比) で原料であるアパタイトファイバーに対して 100, 300, 500, 700 mass% 添加し、さらに一軸加圧成形を施すことにより、気孔率を制御した高強度化 AFS の創製に成功した。これらの高強度化 AFS を長嶋らが作出したクサビラオレンジ遺伝子導入ブタ (huKO ブタ; H. Matsunari, H. Nagashima et al., *Cloning Stem Cells*, **10**, 313-323 (2008).) の脛骨・筋・脂肪組織にインプラントして、気孔内での骨形成を評価した。脛骨へのインプラント実験では、気孔内部への旺盛な骨侵入が認められ、さらに AFS 自体の生体内での吸収性も確認されている。また、骨芽細胞の存在しない筋組織へのインプラント実験においても気孔内で骨形成が確認された。これは本来骨を形成しない部位での骨形成であり、当該 AFS は「骨誘導能」を備えていることが分かった。これは骨再生のためのスキャフォールドとして極めて有効な特性である。

また、ケイ素 (Si) が骨形成を促進させる元素であることから、Si を含有したアパタイトファイバーを用いて骨形成能を向上させた新しいスキャフォールド (Si-AFS) も開発し、Si を添加した AFS が優れた細胞増殖性などを有していることを明らかにしている。なお、この研究は「第 16 回生体関連セラミックス討論会」において「The Division 賞」を受賞している。

2) 三次元組織の構築と機能 (相澤・竹中・神澤・松本(守)・石井・松本(秀)・二木・松浦)

「骨再生」において、前記した従来型アパタイトファイバースキャフォールド(AFS)を直径15 mm、高さ18 mmの円筒状に加工して、これを三次元循環培養が可能なラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)に装填し、ラット骨髄間質系幹細胞を播種して、骨芽細胞への分化誘導をかけながら所定の期間培養した。このとき、培地の循環速度を0.4, 1.3, 6.3, 11.5 および 16.5 $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ に設定して5種類の再生培養骨を構築し、そのAFS内の骨芽細胞の分化レベルを調べたところ、6.3 $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ の流速のときに最も骨芽細胞の分化が誘導されることが分かった。これは細胞に対する適切なシヤストレスが分化を促進することを示している。なお、この研究は昨年度に引き続き「日本セラミックス協会第25回秋季シンポジウム特定セッション学生優秀発表賞(2012)」に採択されている。

また、「肝再生」においても上記の技術を利用し、アルブミン産生能やアンモニア解毒作用を備えたバイオ人工肝の構築に成功し、3か月もの長期培養にも成功している。なお、この研究は「第22回無機リン化学討論会」で「若手優秀研究発表賞」を受賞している。

3) 血管形成の制御 (相澤・長嶋・神澤・江本・松浦)

1)のAFSへの血管新生の制御を指向し、前記した高強度化AFSへの血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の担持方法を確立し、その薬剤徐放性について明らかにしている。実際、血管内皮細胞モデルであるM1細胞(分担研究者:松浦らにより樹立)を播種し、VEGF担持の有無でVEGFを担持させたAFSの方がより高い細胞増殖性を示すことを明らかにしている。また、ブタ脛骨および筋・脂肪へのインプラント実験も行なっており、現在、組織学的評価を進めているところである。また、AFS内への血管新生を定量化するため、ヒト血管内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVEC)モデルを利用して、AFS内への内皮細胞の侵入性を評価している。

4) *In vitro*→*in vivo* 評価系の構築 (長嶋・相澤・平岡・本田)

人工骨などの*in vivo* 評価には、ウサギやイス(ビーグル)などが実験動物として広く用いられているが、これらの動物の骨形成速度は人間より

も早く、人間に適用した時との相関が取れないことがある。そこで、骨形成速度が人間と比較的近いブタやヒツジなどの大型動物を用いて行う*in vivo* 評価は、人間に適用した時との相関を考える上で非常に貴重なデータとなる。

長嶋らにより作出されたhuKOブタは、臓器、筋肉、血管、皮膚をはじめ、脳神経細胞、血球、組織幹細胞に至るまで全身性に赤色蛍光を発現することから、臓器移植・再生や細胞移植治療の研究に有用な大型動物となり得ると期待されている。本研究では、huKOの胎児の頭蓋骨を細胞ソースとして利用し、コラゲナーゼ消化法により骨芽細胞を単離することに成功し、この細胞が蛍光化で赤く光ることも確認している。この蛍光下で赤く光る骨芽細胞をケイ素を含有したアパタイトセラミックス上に播種し、その増殖と分化について検証し、バイオイメージングのツールとして有効であることを明らかにしている。今後は、この細胞の三次元培養などを進めていく。

4. 成果報告(2012年度分; 研究代表者分のみ記載): *論文投稿(査読つき Proceedings 含む)

1) M. Miura, J. Fukasawa, Y. Yasutomi, H. Maehashi, T. Matsuura, and M. Aizawa, "Reconstruction of tissue-engineered bone using an apatite-fiber scaffold, rat bone marrow cells and radial-flow bioreactor: optimization of flow rate in circulating medium", *Key Engineering Materials*, **529-530**, 397-401(2013).

2) M. Honda, K. Kikushima, Y. Kawanobe, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, "Enhanced early osteogenic differentiation by silicon-substituted hydroxyapatite ceramics fabricated via ultrasonic spray pyrolysis route", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **23**, 2923-2932 (2012).

3) T. Ganmoto, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, H. Matsunari, Y. Takeuchi, H. Nagashima and M. Aizawa, "In vivo biocompatibility of apatite-fiber scaffold with enhanced mechanical property using pig model by implanting into tibia", *Phosphorus Res. Bull.*, **26**, 1-3(2012).ほか16件

*著書

T. Matsuura, and M. Aizawa, "26 Bioceramics for development of bioartificial liver", *Polymeric Biomaterials: Medicinal and Pharmaceutical Applications*, Volume 2 (2012) pp. 691-713.

*学会発表(国内・国際会議)

1) 三浦舞子・深澤潤・安富由美子・前橋はるか・松浦知和・相澤守、「アパタイトファイバースキャフォールドを装填したラジアルフロー型バイオリアクターによるラット骨髄細胞からの再生培養骨の構築—培地循環速度の最適化—」、日本セラミックス協会 第25回秋季シンポジウム(2012) (特定セッション学生優秀発表賞)

2) 安生絵利奈・藤見峰彦・前橋はるか・松浦知和・相澤守、「アパタイトファイバースキャフォールドを用いた長期三次元循環培養による再生肝オルガノイドの構築とその機能」、第22回無機リン化学討論会「神戸大会」、神戸大学六甲台キャンパス 瀧川記念学術交流会館、日本無機リン化学会、2012.9.25-26 (若手優秀研究発表賞) ほか18件