

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 後藤 亮真
論文題目  GelMA を応用した新規骨芽細胞移植法による骨再生療法 法の基礎研究	

## I. 緒言

ティッシュエンジニアリングの重要な3つの要素は細胞、成長因子、足場の3つである。その中で、細胞が成長するのに適切な3次元の環境が必要であり、特に足場は細胞が生体外で接着し、コロニーを形成するために重要である。足場の主な機能は、細胞の増殖、分化、生合成の助力をする生体の細胞外マトリックスの作用と類似していることが挙げられる。さらに、再生誘導部位に置かれた足場は、不必要な細胞が作用部位に侵入することを防ぐこともできる。ティッシュエンジニアリングにおいて足場はとても重要な構成要素であることから、本研究では足場材料として用途が高く比較的安価で安全性の高い光重合可能な材料の、Gelatin methacryloyl (以下 GelMA) に着目した。GelMA は、ゼラチンにアミン含有のメタクリレート基を組み込むことによって形成された、ゼラチンベースの光架橋性のハイドロゲルである。GelMA は光重合開始剤存在下で、紫外線 (以下 UV) に曝露されると共有結合し、不可逆的に架橋したハイドロゲルを形成することができる。以上の理由から、GelMA ハイドロゲルは3次元培養における細胞増殖、細胞遊走、細胞拡散を促す有用な材料であると報告されている。骨再生において、生体を模倣した3次元環境での骨の微細構造は、細胞の配列および分化を促進する。GelMA ハイドロゲルは3次元環境で生体幹細胞の骨形成分化を促し、McBeth らは、外因性の骨形成因子がない場合でも、初代培養ヒト骨芽細胞の石灰化物の沈着を引き起こすことが可能であると実証した。多くの研究で用いられている GelMA ハイドロゲルは一般的に UV によって光感受性物質の存在下で励起され硬化する。しかしながら、GelMA 溶液を硬化させる際の UV 照射は、DNA の損傷や、細胞の老化の促進、ガンの発症など、正常な細胞に損傷を引き起こす可能性がある。そこで UV 照射による細胞に対する為害作用を減少させるため、本研究では、可視光線によって励起される光感受性物質のリボフラビン (以下 RF) に着目した。ビタミン B<sub>2</sub> としても知られる RF は光重合開始剤として使用できる物質であり、様々な生物医学的用途があると考えられている (シスプラチンの副作用を軽減する化学療法剤、血小板凝集能、円錐角膜治療における角膜内のコラーゲンの架橋作用など)。また、RF は UV 領域 (222、266、373nm) の範囲内、及び可視光線領域長 (445nm) で吸収極大波長を持つ。つまり、RF は UV 波長領域外にて GelMA を光重合することができる有用な光重合開始剤である。本研究の目的は、骨欠損へ骨芽細胞を移植する際に、足場としての安全で理想的な環境を明らかにすることであり、*in vitro* で骨欠損に対する移植用の骨芽細胞の足場として、光重合開始剤の RF を用い硬化する新しい GelMA ハイドロゲルの作成方法及び骨芽細胞の分化誘導に与える影響を検討した。

## II. 材料と方法

### 1. GelMA 溶液の作製

GelMA 溶液は Nichol らの作製方法に従い作製した。豚の皮膚から抽出した A 型ゼラチンを、60℃ の PBS (Sigma-Aldrich、ウィスコンシン、米国) に混合し、完全に溶解するまで攪拌し 10% (w/v) 溶液を作製した。メタクリ酸水和物 (Methacrylic anhydride: 以下 MA) を 50℃ に保った状態の GelMA 溶液に 0.5 ml/分の速度で加え、その後 1 時間反応させた。次に 40℃ の PBS を 5 倍量入れ、反応を停止した後、未反応の塩基類とメタクリ酸を取り除くため 12~14kDa の浸透圧のフィルムに混合液を入れ 40℃ の蒸留水で 1 週間濾過した。濾過した溶液を凍結乾燥機にさらに 1 週間かけ、白色の多孔質フォームを作製し、その後使用するまで -80℃ にて保存した。Dulbecco's modified eagle medium (DMEM、ライフテクノロジーズジャパン株式会社、東京) 培地を加えた GelMA 溶液に、4mM の光感

受性物質であるイルガキュア 2959 (以下 IR、Sigma-Aldrich、ウィスコンシン州、米国)、4mM のリボフラビン (以下 RF、Sigma-Aldrich、ウィスコンシン州、米国)、4M のトリエタノールアミン (Sigma-Aldrich、ウィスコンシン州、米国) を、それぞれ加え、37°C で 20% (w/v) GelMA-RF 溶液と GelMA-IR 溶液を作成した。

## 2. GelMA ハイドロゲルの作製

IR は 276nm の波長帯で UV に吸収され、365nm に最小吸収がある。20% (w/v) GelMA-IR 溶液 20  $\mu$ L を、直径 8mm、高さ 0.8mm のシリコンモールドに流し込み UV 照射器 (365 nm、UV-LED 光源、林レピック株式会社、東京、日本) にて光重合を行った。照射は 8.5cm の距離で 20 秒間照射した。次に 20% (w/v) GelMA-RF 溶液を 20  $\mu$ L を、同じシリコンモールドに流し込み可視光線照射器 (395~480nm、VALO curing LED light、ULTRADENT JAPAN、東京、日本) で 20 秒、60 秒照射した。可視光線照射器による照射は 0.5cm の距離にて、エクストラパワーモードで光重合を行った。

## 3. 機械的安定性

GelMA ハイドロゲルの圧縮弾性率を、インストロン万能試験機 (Illinois Tool Works Inc、マサチューセッツ州ノーウッド、米国) を用いて細胞の非存在下で 1 分あたり 20% の変形速度で荷重を測定し、圧縮弾性率は 5~10% の変形領域の勾配から算出した。

## 4. 細胞培養および 2 次元環境における骨芽細胞分化誘導

細胞は KUSA-A1 細胞 (RIKEN BRC Cell Bank、筑波、日本) を用いた。KUSA-A1 細胞は DMEM 培地に 10% のウシ胎仔血清 (ライフテクノロジーズジャパン) および 100U/mL Penicilin-100ug/mL Streptomycin (ライフテクノロジーズジャパン) を添加し、細胞培養用のプラスチック平面プレートで 37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。細胞培養液は 2 日おきに交換した。骨芽細胞分化は、細胞がコンフルエントになるまで培養し、100nM dexamethasone、50  $\mu$ L/mL ascorbic、10mM の  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma、セントルイス、ミズーリ州、米国) を添加した DMEM 培地にて培養し骨分化誘導を行った。培地は 1 日置きに交換し、7 日間培養した。カルシウムの蓄積は、1%アリザリンレッド溶液で 5 分間染色し検出した。

## 5. 細胞内包と細胞生存率

20% (w/v) GelMA を DMEM 培地に混合し、60°C にて溶解した。そこに 4mM の IR あるいは 4mM の RF を加え、各々 GelMA-IR 溶液、GelMA-RF 溶液とした。作成した GelMA-IR 溶液、GelMA-RF 溶液に 20  $\mu$ L あたり  $3 \times 10^5$  個の KUSA-A1 細胞を懸濁し、シリコンモールドに流し込んだ。そして、GelMA-IR 溶液に対し UV 照射器 (10500mW/cm<sup>2</sup>、20 秒) で、GelMA-RF 溶液に対し可視光線照射器 (3200mW/cm<sup>2</sup>、60 秒) で、それぞれ光重合させた。光重合後、KUSA-A1 細胞を内包した GelMA-IR、GelMA-RF を DMEM 培地に浸漬し培養した。1 日培養後、細胞生存率を live/dead assay kit (Thermo Fisher Scientific、横浜、日本) を用いて調べた。任意の 3 つの場所を、ImageJ ソフトウェア (NIH、米国) を用いて計測し、全細胞数中の生細胞数の比率を算出し、細胞生存率とした。

## 6. GelMA ハイドロゲルに内包した骨芽細胞の骨分化誘導

GelMA-RF 溶液に  $20 \mu\text{l}$  あたり  $3 \times 10^5$  個の KUSA-A1 細胞を懸濁し、セルカルチャーインサート (ポアサイズ  $0.4 \mu\text{m}$ ; BD、ニュージャージー州、米国) に注ぎ入れ、可視光線照射器で 60 秒間照射し光重合させた。光重合後、DMEM 培地または分化誘導培地にて 1 週間培養した。

## 7. Real-time quantitative PCR (qPCR) 解析

7 日間培養した細胞の total RNA は Handa らの方法をに従い、ISOGEN (日本ジーン、東京、日本) を用いて抽出した。Total RNA の純度および濃度評価は Fluorospectrometer (NanoDrop® ND-1000、NanoDrop Technologies Inc、デラウェア州、アメリカ) を用いて A230/A260、A260/280 比を測定して評価した。cDNA は通法にしたがい  $1 \mu\text{g}$  の total RNA を、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO、大阪、日本) を用いて総量を  $20 \mu\text{L}$  に合成した。PCR は、StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems、カリフォルニア州、米国) を使用し、Taqman Universal Master Mix II (Applied Biosystems、カリフォルニア州、米国) および TaqMan Gene Expression Assays (Runx2 (Runt Related Transcription Factor2): Mm00501584\_m1、Osterix (Osx): Mm04209856\_m1、Bone Sialoprotein (Bsp): Mm00492555\_m1、Osteocalcin (Ocn): Mm03413826\_mH)) を用い、 $94^\circ\text{C}$  1 分間、 $60^\circ\text{C}$  30 秒間、 $72^\circ\text{C}$  30 秒間の 40 サイクルで反応させた。データ解析は  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法を用いた。内在性コントロールとして 18S rRNA 特異的プライマーを用い、Runx2、Osx、Bsp、Ocn の遺伝子発現を解析した。

## 8. 統計分析

全てのデータは、平均値±標準偏差で表した。統計学的解析には統計解析ソフト SPSS ver. 18 (SPSS Japan Inc.、東京、日本) を用いた。検定には、one-way ANOVA と Bonferroni multiple comparison test を用い、危険率は  $p < 0.05$  をもって有意とした。

## III. 結果

### 1. GelMA-IR、GelMA-RF ハイドロゲルの物理的及び機械的性質

可視光線照射器にて 20 秒間照射した 20% (w/v) GelMA-RF ハイドロゲルはやや黄色味がかっており、未重合の RF が残存していると考えられ、シリコンモールドから取り外すことができず、実験に供与できなかった。また、GelMA-RF を 10~15% (w/v) の濃度で作製し 60 秒間照射しても、シリコンモールドから取り外すことができず、ゲル化を確認できなかった。GelMA-RF 溶液の濃度を 20% (w/v)、照射時間を 60 秒間に設定することで完全に透明になり、実験に供与できる条件を見出した。そこで設定した条件の GelMA-RF ハイドロゲルと前述した条件で作製した GelMA-IR ハイドロゲルの圧縮弾性率をそれぞれ 5 サンプルずつ測定したところ圧縮弾性率に有意な差は見られなかった。

### 2. UV/可視光線照射による GelMA ハイドロゲルに内包した細胞生存率

GelMA ハイドロゲル内に KUSA-A1 細胞を内包し UV にて 20 秒間、可視光線にて 60 秒間照射し光重合

させ、1日培養後の細胞生存率の結果、GelMA-RF ハイドロゲルに内包された KUSA-A1 細胞は、GelMA-IR ハイドロゲルに内包した KUSA-A1 細胞より有意に高い細胞生存率を示した。

### 3. 2次元環境における KUSA-A1 細胞の骨分化能の評価

KUSA-A1 細胞を分化誘導培地にて7日間培養後、アリザリンレッド染色を行った。その結果、分化誘導培地で7日間培養後のカルシウム沈着は劇的に増加した。次に、7日間培養後の KUSA-A1 細胞の骨形成関連遺伝子の発現を調べるために qPCR 解析を行った。その結果、2次元環境下で分化誘導した KUSA-A1 細胞は、DMEM 培地のみで培養した場合と比較し、骨形成関連遺伝子の発現が優位に上昇した。その中でも、Bsp の発現が著しく高かった。

### 4. GelMA ハイドロゲルに内包した KUSA-A1 細胞の骨形成関連遺伝子の発現

2D (KUSA-A1 細胞をプラスチックプレート上で分化誘導なしで培養)、2D+(KUSA-A1 細胞をプラスチックプレートで分化誘導培地にて培養)、3D(GelMA-RF ハイドロゲルに KUSA-A1 細胞を充填後、分化誘導なしで培養)、3D+(GelMA-RF ハイドロゲルに KUSA-A1 細胞を充填後、分化誘導培地にて培養)条件下で培養した KUSA-A1 細胞の細胞形態の変化を比較した。KUSA-A1 細胞を7日間分化誘導培地にて培養後、石灰化沈着が見られた。さらに、GelMA-RF ハイドロゲル内で培養した KUSA-A1 細胞は、凝集しスフェロイド様を呈していた。7日間培養後の 3D+条件下における KUSA-A1 細胞は、3D条件下で培養した KUSA-A1 細胞の骨形成関連遺伝子と比較すると Ocn の発現が劇的に上昇していた。さらに、骨分化早期のステージで発現が見られる Runx2、Osx は 3D+条件下では減少していた。

## IV. 考察

骨再生には、骨形成分化能を有しかつ、増殖能を有するセルソースが必要である。その細胞は、周囲組織の刺激による移動、自家骨移植、他家骨移植、組織工学で作られた人工骨の移植によって欠損部位に送達される。また、新しい骨組織の合成、組織化、および再構築を担う骨形成細胞と各種足場材料を組み合わせた、多くの骨組織工学アプローチによって盛んに研究されている。その足場材料としてのハイドロゲルは、組織工学や再生医療で幅広く使われてきた。近年光重合可能な GelMA が組織工学の分野で大きく注目されておりその GelMA の優れた特徴の1つとして、微小管構造を模倣し幹細胞の発育を促すことであることも報告されている。間葉系幹細胞 (以下 MSC) は、骨再生治療の領域に、最も使用されている細胞である。特に、骨髄由来の MSC は、組織工学細胞療法として、科学および医学的効果があると知られている。MSC は、*in vitro* で軟骨細胞、骨芽細胞と脂肪細胞と少なくとも3種類の中胚葉由来の細胞に分化することができるが、MSC がどのように分化するかは、3次元培養時の足場の硬さに依存する。Engler らは、MSC が適切な硬さのゲル内で軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞に分化することを証明した。25~40 kPa の硬さのゲル上で、MSC は骨形成マーカー (MyoD、オステオカルシン、CBFa1) を発現すること; 11~30kPa の硬さのゲル内で、7日後には骨芽細胞に成熟分化することが報告されている。これらの研究は、ハイドロゲルの弾性が細胞分化に直接的に作用していることを示している。本研究で使用した 20%GelMA-RF ハイドロゲルの圧縮弾性率は、約 16kPa (n=5) で、骨芽細胞の分化に適した硬さであったと考えられる。圧縮弾性率だけでなく、さらなる物理的・

機械的性質(位相差顕微鏡：SEM 画像、分解性、吸収率)が必要であると考えられる。前述の通り、過去の研究に使われている GelMA ハイドロゲルは、UV 照射による光重合で作製されるものが大部分である。対照的に可視光線照射による光重合では、細胞損傷が少ないという報告がある。UV 照射と比較し、可視光線照射は細胞生存率が優位に高かった。RF、IR は生体に悪影響を及ぼさない物質であることから、本研究結果は可視光線照射による光重合は骨芽細胞に対して細胞為害性が少ないことが示唆される。本研究で用いた KUSA-A1 細胞は、高度に骨細胞分化に指向したマウス骨髄由来の間葉系幹細胞株の骨芽細胞である。Huang らの研究では、骨芽細胞の分化培養時に Runx2 と Osx が初期段階の骨芽細胞で高度に発現したことを報告しており、これと対照的に、Bsp と Ocn は骨分化の後期の段階で発現することが報告されている。GelMA-RF ハイドロゲルに内包された KUSA-A1 細胞を分化誘導培地にて培養したところ Bsp、Ocn の遺伝子発現が特に高く認められた。興味深いことに、GelMA-RF ハイドロゲルに内包し分化誘導培地で培養した KUSA-A1 細胞は、Runx2 と Osx の mRNA は発現が低かった。また、GelMA-RF ハイドロゲル内で培養された KUSA-A1 細胞は、日を迫うごとに凝集しスフェロイド状を示した。これより GelMA-RF ハイドロゲルで培養された骨芽細胞は、強力に分化しかつ、成熟した可能性が示唆された。本研究において、GelMA-RF ハイドロゲルでの細胞培養は、*in vitro* において骨芽細胞の骨形成を促すのに適していることが明らかになった。

#### V. まとめ

GelMA-RF ハイドロゲルは、骨組織再生のための極めて有用な足場材料として使用できる可能性が示唆された。