

アパタイトファイバースキャフォールドを用いて 3D 培養された骨芽細胞の増殖と分化

相澤 守¹・篠田洋紀²・内田 寛²・藤見峰彦²・神澤信行²・森末 光³・松本守雄³・戸山芳昭³
(明治大・理工¹, 上智大・理工², 慶大・医³)

Proliferation and differentiation of osteoblasts 3D-cultured using apatite-fiber scaffolds / M. Aizawa¹(Meiji Univ.), H. Shinoda², H. Uchida², I. Okada², T. J. Fujimii², N. Kanzawa² (Sophia Univ.), H. Morisue³, M. Matsumoto³, and Y. Toyama³ (Keio Univ.) / We have developed porous scaffold for tissue engineering of bone using the single-crystal apatite fibers. In order to clarify cellular responses, such as cell proliferation and differentiation, to the apatite-fiber scaffolds, the biological evaluations were performed using two kinds of cells: i) MC3T3-E1 cells and ii) rat bone marrow cells. The cells cultured in/on the scaffolds showed excellent cellular responses, such as good cell proliferation and enhanced differentiation into osteoblasts. We conclude that such scaffolds may be effective as a matrix of tissue engineered structures for promoting differentiation of osteoblasts.

【緒言】 現在、細胞・増殖因子・スキャフォールドを組み合わせる組織を再生させるティッシュエンジニアリングが脚光を浴びている。骨再生も例外ではなく、これまでに多くの研究報告がある。我々はこれまでに生体骨の無機成分と類似した組成をもつ長軸径 60-100 μm のアパタイト単結晶ファイバーの合成に成功している。我々の目的はこのアパタイトファイバー(AF)を用いて三次元培養が可能な新規なスキャフォールドを開発し、それを骨再生医療に応用することである。本報告では、我々が開発した細胞が内部にまで侵入できる新規なアパタイトファイバースキャフォールド(AFS)を用いて骨芽細胞を三次元培養した結果について述べる。

【実験方法】 AF は以前報告した方法により合成した[1]。この AF にカーボンビーズ(粒径 $\sim 150\text{ }\mu\text{m}$)を質量比で 20 倍添加した混合スラリー調製し、成形・焼成して AFS2000 を作製した[2]。なお、カーボンビーズを添加せずに作製したスキャフォールドを AFS0 とする。得られた AFS の生物学的評価は MC3T3-E1 細胞とラット骨髄間質細胞(RBMC)を使用した。まず、MC3T3-E1 細胞を AFS0, AFS2000 および Control に播種し、その初期付着率・増殖性・形態および逆転写遺伝子増幅法(RT-PCR)による骨芽細胞の分化マーカーの遺伝子発現について調べた。次に、RBMC を AFS に播種してデキサメタゾンなどを含む分化誘導培地を用いて培養し、その分化挙動を明らかにするため細胞の単位 DNA 当たりのアルカリフォスファターゼ(ALP)およびオステオカルシン(OC)の定量を行なった。また、アリザリンレッドによる石灰化の評価も行なった。

【結果と考察】 AF から作製した AFS は HAp 単一相であり、カーボンビーズ添加による組成の変化はみられなかった。SEM 観察から、AFS0 と比べて AFS2000 の細孔径は約 5 μm から約 250 μm まで拡大し、気孔同士は互いに連通していた。また、ファイバー同士が焼結によって結合し、ファイバー同士の絡み合いによる約 5 μm の微細な気孔も形成していた。このような構造は細胞がスキャフォールドの内部まで十分に侵入するため、三次元培養が可能である。図 1 に MC3T3-E1 を用いて行なった細胞増殖の結果を示す。1-7 日間の培養初期においては各試料間で有意な差は見受けられなかったが、7-21 日目の長期の培養条件において AFS2000 は AFS0 や Control と比べて良好な増殖性を示していた。このひとつの原因は AFS2000 で細胞が三次元的に培養されているためと考えられる。また、RBMC を用いた骨芽細胞の初期・中期の分化マーカーである ALP 活性の測定したところ、調べた培養期間(7, 14, 28 日間)のいずれにおいても AFS2000 が AFS0 や Control よりも有意に高い活性を示すことが明らかとなった。後期の分化マーカーについても同様な結果を得ている。さらに、培養 7 日間において Control では石灰化がほとんど見られなかったのに対し、AFS2000 ではカルシウム沈着が確認され、石灰化を誘導することが見いだされた。

以上の結果より、AFS はティッシュエンジニアリングの新規なスキャフォールドとして有効であると結論できる。

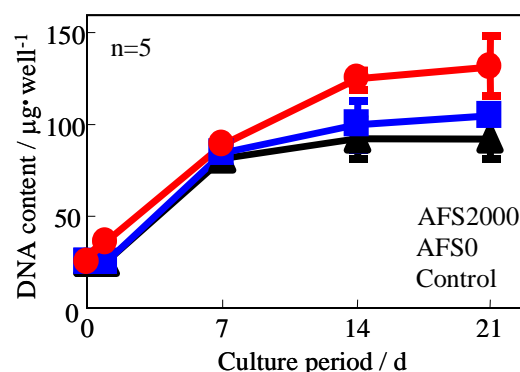


Fig.1 Proliferations of MC3T3-E1 cells cultured in/on the apatite-fiber scaffolds.

[1] M. Aizawa, K. Itatani, et al., *J. Ceram. Soc. Jpn.* **108**, 249-253(2000).

[2] M. Aizawa, H. Shinoda, M. Matsumoto, et al., *Key Engineer. Mater.* **240-242**, 647-650 (2003).