

奨励金No.1546

骨再生医療の実用化：多能性幹細胞を用いた 3次元ペレット培養モデルの構築

キム ジョンヒョン
名古屋大学 助教

Practical application of bone regenerative medicine: Construction of 3D pellet culture model using pluripotent stem cells

Kim Jeonghyun,
Nagoya University, Assistant Professor



骨再生医療の実用化を目指し、従来の直径約 100 μm のスフェロイドをスケールアップし、直径 500 μm のペレットを作製し、マウス皮下移植実験を行った。U 底細胞低接着プレートを用い、マウス骨芽細胞様細胞由来ペレットを作製しました。培養期間が長くなるとペレットの形状が球状に近づき、直径が小さくなることが観察された。ペレットは移植 2 日後に周囲の組織とスムーズに統合したことから生体移植可能である可能性が示唆された。

In pursuit of practical applications in bone regeneration therapy, we scaled up conventional spheroids of approximately 100 μm in diameter to produce pellets with a diameter of 500 μm and conducted subcutaneous transplantation experiments in mice. Using U-bottom cell-repellent plates, we prepared pellets derived from mouse osteoblast precursor cells. It was observed that with longer culture periods, the shape of the pellets became more spherical and their diameter decreased. The smooth integration of the pellets with surrounding tissues 2 days post-transplantation suggested their potential viability for biological transplantation for bone regeneration therapy.

1. 研究内容

1.1 目的

基礎研究や創薬研究の分野において、臓器を試験管内で再現するオルガノイドが注目を集めている。しかし、未だ効果的な骨細胞分化法が見つかっておらず、骨オルガノイドは実現されていない。しかし、期待される手段としてスキャフォールド (scaffold) などの足場を必要としない 3 次元細胞凝集体であるスフェロイド (spheroid) を用いる方法があり、骨芽細胞及び間葉系幹細胞のスフェロイド培養は 2 次元培養に比べて骨細胞分化マーカーが多く発現することが報告されている。本研究では、スフェロイドの骨再生医療への応用

に向け、直径 100 μm ほどのスフェロイドをスケールアップし、直径 500 μm ほどのペレット (pellet) を作製する方法を確立するとともに、これをマウス皮下に移植し、後で回収し、評価する方法を確立することを目的とする。そして、移植後のペレットならびに周辺組織の変化を調べた。

1.2 方法

試料細胞としてマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を用いた。培養は MEM α (Minimum Essential Medium α , 和光純薬) に、ウシ胎児血清 (Gibco) を 10%、ペニシリン・ストレプトマイシン (ナカライ・テスク) を 1% 加えたものを使用

し、37℃、湿度100%、5% CO₂、95% Airの環境で細胞を培養し、3-4日に1回継代した。

ペレットの作製にはU底細胞低接着プレート（174929, Thermo Fisher Scientific）を用い、1つのウェルに100 μlあたり 2.0×10^5 個の細胞が含まれるように細胞懸濁液を用意し、100 μlを96ウェルプレートに入れた。数時間静置すると細胞が重力で下に落ちU底プレート面に接着することなく細胞凝集塊を自己形成する。こうして得られた凝集塊をペレットとした。2日以上培養する場合はウェル内の培地が200 μlになるように調節し、培地交換は150 μlだけピペットで吸い出し、新しい培地を150 μl追加することで行った。

生体移植実験には、Slc:ddY 8週齢、オスのマウス（日本エス・エル・シー）を用いた。イソフルランガスの吸引による麻酔下にマウスの背面の皮膚を10 mmほど切開し、露出した皮下の筋肉上に内径6 mm、外径8 mm、厚さ1 mmのサージカルステンレス製リング（RIN）を置き、その内側に2日間培養した細胞数 2.0×10^5 個のペレット15個を置いた後、単結節により3箇所縫合した。サージカルステンレスは不導体被膜で覆われており腐食しにくく、金属イオンが溶け出しにくいいためアレルギー反応が起きにくいというメリットがある。2日後、マウスを炭酸ガスで屠殺し、周囲の組織ごと摘出した。

摘出した試料及び作製したペレットを10%ホルマリン（ナカライ・テスク）に4℃で24時間、30%スクロースに4℃で24時間漬け、Tissue-Tek O.C.T. compound（サクラ）で包埋し凍結切片をクライオスタット（CM3050S, Leica）で作製、剥離防止スライドガラス（MAS-GP コートスライドガラス、松浪硝子）に貼付した。HE染色は、試料に水道水を滴下しO.C.T. compoundを除去するため1分洗浄し、マイヤーヘマトキシリン（和光純薬）溶液を滴下し30秒染色、水道水を滴下し1分洗浄した。1%エオジンY溶液（和光純薬）を滴下10秒染色し、90%エタノールを滴下し1分脱水

した。99.5%エタノールを滴下し1分脱水し、Entellan® New（Merck）をに封入し、カバーガラス（C015001、松浪硝子）を被せ保存した。

1.3 結果

96ウェルに100 μlの細胞懸濁液を入れ培養し、2日経過すると直径約500 μmのペレットが形成された。2日、7日間培養したペレットは、培養期間が長くなるほど球状に近づき直径が小さくなる様子が確認できた。

ペレットと思われるものを周囲の組織ごと摘出し、HE染色した。直径約500 μmの球状ペレットの断面が観察された。この結果から、ペレット表面が周囲の組織からスムーズに移行しているように観察された。

1.4 まとめ

本研究では、U底細胞低接着プレートを用い直径500 μmほどのマウス骨芽細胞様細胞由来ペレットを作製することができた。形態としては作製できたが、内部の細胞が生理的活性を有しているのか、また長期に互って形態が保たれるのかなど不明な点が多い。今後は、長期間の培養に伴う形態変化、内部の細胞の生死判定などを行う必要がある。

また、ペレットの移植法に関しては、リングを用いた手術方法を構築した。皮下移植では、アレルギー反応が起きにくいサージカルステンレス製リングを用いることにより、ペレットや生体への影響を減らしつつ、マウスの体動などによりペレットが移動してしまうことを防ぎ、移植後ペレットを見失わない手術法を構築した。また、移植後のHE染色画像からペレット表面が周囲の組織からスムーズに移行しているように見られることから、炎症などの拒絶反応は起きていないと考えられ、少なくとも2日間はペレットが生体移植可能である可能性が示唆された。

2. 発表（研究成果の発表）

- [1] Jeonghyun Kim, Taiji Adachi, Takeo Matsumoto. *Actin filaments in response to chemical osteogenesis supplements alter the multicellular behavior of osteocytic spheroids*, Poster presentation (169) delivered at the 28th Congress of the European Society of Biomechanics, Maastricht (Netherlands), Jul 2023.
- [2] Jeonghyun Kim, Takashi Inagaki, Eijiro Maeda, Taiji Adachi, Takeo Matsumoto. *Biomechanical analysis of osteocytic spheroids for bone tissue engineering applications*, Invited oral presentation (W4-FJ3) delivered at focus session, the International Conference on Precision Engineering and Sustainable Manufacturing 2023 (PRESM2023), Okinawa (Japan), Jul 2023.
- [3] 鈴木理恵、キム・ジョンヒョン、前田英次郎、松本健郎、骨再生医療に向けたマウス骨芽細胞様細胞由来ペレットの作製法と皮下移植法の確立、日本機械学会東海支部 第55回学生員卒業研究発表講演会 TOKAI ENGINEERING COMPLEX 2024 (TEC24)、口頭発表 (4F2)、大同大学（名古屋）、2024/3