

冷間等方圧技術を用いた骨髄特異的 ECM 組成を有する 3次元培養基材の開発

信州大学繊維学部応用生物科学科
根岸 淳

1. はじめに

ヒトの血液は、骨の内部にある海綿状組織の骨髄で産生されている。骨髄に含まれる造血幹細胞が赤血球や白血球などの種々の血液細胞に分化することを造血と呼び、疾患発生機序の解明や治療法の開発に向けた造血機構の研究が広く実施されている。

ヒトを含む哺乳類の骨髄は、造血幹細胞をもととする血液細胞と間葉系幹細胞をもととする骨髄間質細胞 (BMSC) および骨髄特異的な細胞外マトリックス (ECM) で構成されている (図 1. A)。また、BMSC と骨髄 ECM からなる造血ニッチによって造血が制御されることが知られている¹。現在、BMSC と造血幹細胞の共培養系やコラーゲンなどを足場とする 3次元培養系により、BMSC や 3次元環境による造血/血液細胞の増殖や分化の制御が明らかにされつつある。しかし、骨髄 ECM の造血機能への影響解析は進んでおらず、骨髄 ECM を有する培養基材の開発が行われている。ヒトや動物の骨髄から細胞を除去した脱細胞化骨髄は骨髄 ECM からなる材料であるが、播種された細胞が浸透しにくいことが課題となっている²。

当研究グループは、無機粉末のブロック化に用いられる冷間等方圧成型 (CIP) を応用し、種々の脱細胞化組織粉末をブロック化する技術を確認している³。また、NaCl を利用することで脱細胞化組織ブロックの多孔質化が可能であり、組織 ECM を有する培養基材への応用可能性を見出している。

本研究では、脱細胞化組織粉末のブロック化手法を用いた多孔質骨髄 ECM ブロック作製、BMSC と骨髄 ECM からなる新たな骨髄モデル開発に取り組んだ (図 1. B)。

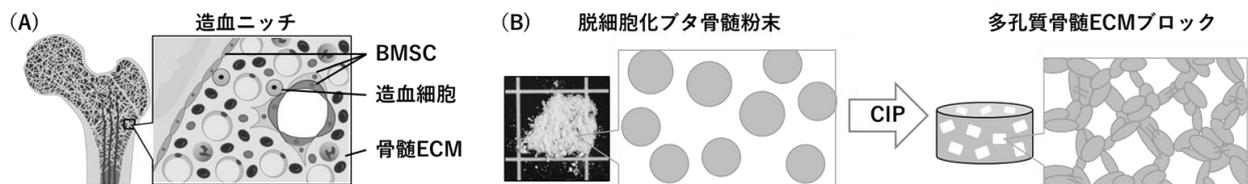


図 1. (A) 骨髄の構成と (B) 本研究の多孔質骨髄 ECM ブロックの作製工程

2. 実験方法

2-1. 脱細胞化ブタ骨髄粉末の作製

研究用成体ブタおよび胎児ブタの骨から採取した骨髄に高静水圧印加、核酸分解酵素とエタノールによる細胞残渣洗浄を行って脱細胞化ブタ骨髄を作製した。未処理ブタ骨髄と脱細胞化ブタ骨髄の H&E 染色と DNA 定量により細胞除去を評価し、続いて、凍結乾燥と粉碎処理により脱細胞化ブタ骨髄を粉末化した⁴。

2-2. CIP による脱細胞化ブタ骨髄粉末の多孔質ブロック化

脱細胞化胎児ブタ骨髄粉末、NaCl 粉末とタンパク質架橋酵素 (トランスグルタミナーゼ: TG) を混合して、シリコンモールドに充填した。粉末含有モールドに CIP 成型機を用いて 200 MPa の静水圧を 10 分間印加した。混合粉末のブロックを 37°C で 72 時間静置して TG によるタンパク質架橋反応を行った。続いて、リン酸緩衝液に混合ブロックを浸漬して NaCl および TG を除去し、凍結乾燥を行って多孔質胎児骨髄 ECM ブロックを作製した。

多孔質胎児骨髄 ECM ブロック、多孔質化していない胎児骨髄 ECM ブロックを白金コートし、走査型電子顕微鏡で観察して表面構造を評価した。

2-3. 多孔質胎児骨髄 ECM ブロックへの BMSC 播種

ヒト BMSC を 10% FBS 含有 RPMI に懸濁し、多孔質胎児骨髄 ECM ブロックに添加した。一定期間培養後に DAPI 染色と DNA 定量を行い、多孔質胎児骨髄 ECM ブロックへの BMSC の生着および増殖を評価した。

2-4. BMSC 含有多孔質胎児骨髄 ECM ブロックへのヒト造血前駆細胞(HPC)播種

BMSC を含有していない多孔質胎児骨髄 ECM ブロック、BMSC 含有多孔質胎児骨髄 ECM ブロックにヒト HPC 懸濁液を添加し、一定期間培養した。未処理の成体ブタ骨髄と HPC 播種後のブロックのギムザ染色を行い、ヒト HPC のブロックへの生着を評価した。

3. 実験結果と考察

3-1. 成体ブタと胎児ブタの脱細胞化骨髄粉末の作製

H&E 染色において、成体ブタと胎児ブタの未処理骨髄には細胞核の染色が認められた。一方、脱細胞化骨髄では、細胞核の染色は認められなかった(図 2. A-D)。また、未処理骨髄と比較して、脱細胞化骨髄では DNA 量の減少が確認され、高静水圧法により成体ブタおよび胎児ブタの骨髄から細胞が除去されたことが明らかになった(図 2. E)。

凍結乾燥と粉碎処理による脱細胞化骨髄の粉末化を行った。成体ブタの脱細胞化骨髄は粉末状ではなくペースト状になった。胎児ブタの脱細胞化骨髄は白い粉末になったため、今後の実験には脱細胞化胎児ブタ骨髄粉末を使用した。

哺乳類の骨髄は成長とともに脂肪細胞が増加することが知られており、成体ブタの脱細胞化骨髄には脂質が多く含まれたため、粉末化しかなかったと考えられる⁵。一方で、胎児ブタの脱細胞化骨髄は脂質が少なかったため、凍結乾燥および粉碎処理によって粉末化したと推察される。

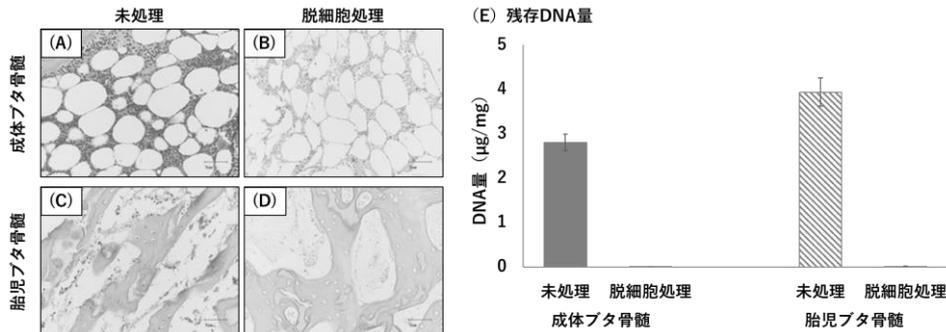


図 2. (A-D) 未処理および脱細胞化骨髄の H&E 染色と (E) DNA 量

3-2. 多孔質骨髄 ECM ブロックの作製と特性評価

CIP を用いて脱細胞化胎児ブタ骨髄粉末のブロック化を行った。NaCl を使用しないで作製した骨髄 ECM ブロックは表面に孔が認められず、粉末同士が接着した状態だった(図 3. A, B)。一方、NaCl を用いて作製した多孔質骨髄 ECM ブロック表面には多数の孔が認められた(図 3. C, D)。

CIP では、圧力によって変形した粉末間の接触面積が増加することでブロック化する⁶。NaCl なしでは、脱細胞化胎児ブタ骨髄粉末同士が密に接着したことで孔がないブロックが作製されたと考えられる。NaCl は水に可溶であり、脱細胞化胎児ブタ骨髄粉末は水に対して不溶である。NaCl を含有した骨髄 ECM ブロックを洗浄、凍結乾燥することで NaCl が除去された部分に孔が形成され、多孔質骨髄 ECM ブロックになったと考えられる。また、TG によって骨髄 ECM のタンパク質が架橋されたため、洗浄後も多孔質骨髄 ECM ブロックの形態が安定していたと考えられる。

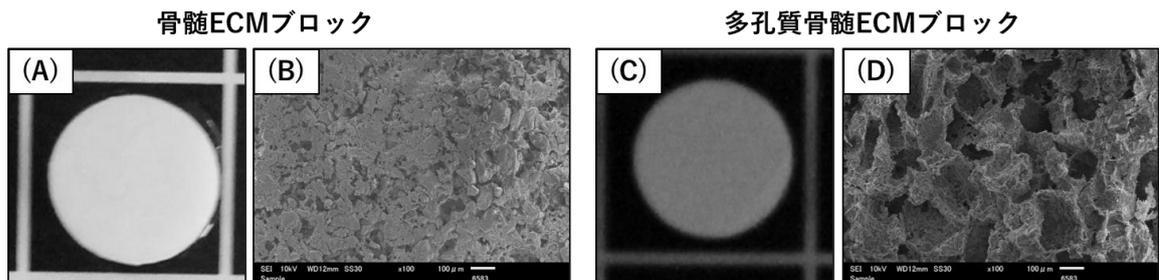


図 3. (A, B) 骨髄 ECM ブロック、(C, D) 多孔質骨髄 ECM ブロックの写真と SEM 画像

3-3. 多孔質胎児ブタ骨髄 ECM ブロックへのヒト BMSC 播種

ヒト BMSC を多孔質胎児ブタ骨髄 ECM ブロックに播種し、DAPI 染色と DNA 定量で細胞分布と増殖を評価した。播種 1 日後では、多孔質胎児骨髄 ECM ブロックの内部に細胞核が認められた (図 4. A)。播種 7 日後の DAPI 染色において、Day1 より多くの細胞核が多孔質胎児骨髄 ECM ブロック内部に認められ、DNA 量の増加も認められた (図 4. B, C)。

多孔質胎児ブタ骨髄 ECM ブロックは直径約 150 μm の孔を有したため、BMSC が内部まで浸透することが出来たと考えられる。また、BMSC は骨髄内の接着細胞であるため、骨髄 ECM からなるブロックに接着したと推察される。さらに、連通孔を介して酸素や栄養が多孔質胎児ブタ骨髄 ECM ブロック内に到達したため、ブロック内で BMSC が生存し増殖したと考えられる。

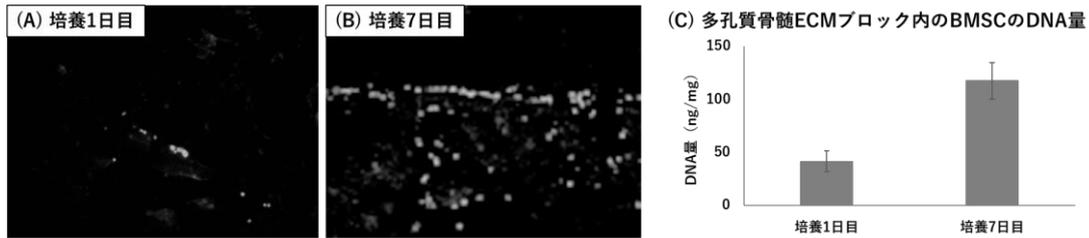


図 4. (A, B) BMSC 播種骨髄 ECM ブロックの DAPI 染色と (C) DNA 量

3-4. BMSC 含有多孔質胎児骨髄 ECM ブロックへの HPC 播種

BMSC を含まない多孔質胎児骨髄 ECM ブロックと BMSC 含有多孔質胎児骨髄 ECM ブロックにヒト HPC 懸濁液を添加して 3 日間培養した。ギムザ染色において、BMSC を含まない多孔質胎児骨髄 ECM ブロックでは、HPC が観察されなかった (図 5. B)。一方、BMSC 含有多孔質胎児骨髄 ECM ブロック内には HPC が認められた (図 5. C)。

HPC は浮遊細胞であり、体内では BMSC と相互作用することで骨髄に局在している⁷。BMSC がない多孔質胎児骨髄 ECM ブロックでは、HPC と骨髄 ECM の相互作用が弱かったため、HPC はブロック内に生着しなかったと考えられる。一方、BMSC 含有多孔質骨髄 ECM ブロックでは、ブロックに生着した BMSC によって、播種された HPC が多孔質胎児骨髄 ECM ブロックに留まったと考えられる。

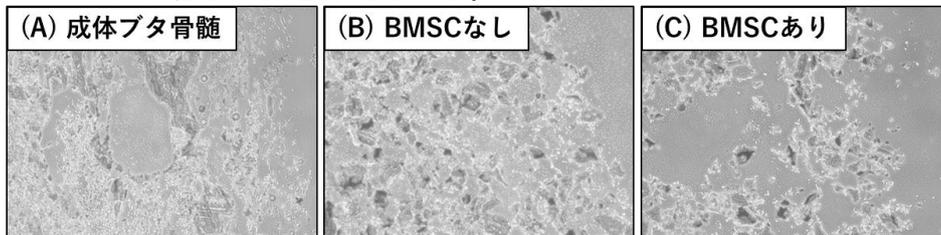


図 5. (A) 成体ブタ骨髄、(B) HPC を播種した BMSC 非含有骨髄 ECM ブロックと (C) HPC を播種した BMSC 含有骨髄 ECM ブロックのギムザ染色

4. まとめ

本研究では、CIP を利用して骨髄 ECM を有する培養基材および造血ニッチ模倣材料の作製に取り組んだ。脱細胞化胎児ブタ骨髄粉末から作製した多孔質骨髄 ECM ブロックは、BMSC の浸潤および接着が可能な基材であった。また、多孔質骨髄 ECM ブロック内の BMSC と HPC が相互作用することで、骨髄に類似した環境が再現され、骨髄モデルとしての応用可能性が見出された。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人天野工業技術研究所には多大なご支援を頂きました。ここに謝意を示します。また、実験作業は当時大学院生の山口文菜氏にご協力いただきました。ここに記し深く感謝を申し上げます。

6. 参考文献

1. Fröbel, J., Landspersky, T., Percin, G., Schreck, C., Rahmig, S., Ori, A., Nowak, D., Essers, M., Wascow, C., Oostendorp, R. A. (2021). The hematopoietic bone marrow niche ecosystem. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 705410.
2. Yamaguchi, A., Hashimoto, Y., Negishi, J. (2024). Fabrication of a cell culture scaffold that mimics the composition and structure of bone marrow extracellular matrix. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 138(1), 83-88.
3. Negishi, J., Yamaguchi, A., Tanaka, D., Hashimoto, Y., Zhang, Y., Funamoto, S. (2024). A method for fabricating tissue-specific extracellular matrix blocks from decellularized tissue powders. *Advanced Biology*, in press.
4. Negishi, J., Tanaka, D., Hashimoto, Y. (2024). Induction of osteogenic differentiation by the extracellular matrix of fetal bone tissues and adult cartilage. *Tissue and Cell*, in press.
5. Justesen, J., Stenderup, K., Ebbesen, E.N., Mosekilde, L.I., Steiniche, T., Kassem, M. (2021). Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2, 165–171.
6. Amat, N. F., Muchtar, A., Amril, M. S., Ghazali, M. J., Yahaya, N. (2018). Preparation of presintered zirconia blocks for dental restorations through colloidal dispersion and cold isostatic pressing. *Ceramics International*, 44(6), 6409-6416.
7. Comazzetto, S., Shen, B., Morrison, S. J. (2021). Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. *Deve*