

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15746

研究課題名(和文) 骨芽細胞分化を可逆的に制御する生体材料の頭蓋縫合早期癒合症治療への応用

研究課題名(英文) Application of biomaterials for regulation of osteoblast differentiation to craniosynostosis

研究代表者

井関 祥子 (ISEKI, Sachiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80251544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋縫合早期癒合症では、活性化している骨芽細胞のため、頭蓋冠分離手術を行っても再癒合が認められることが多く、再手術が行われることが多い。すなわち、手術後に骨芽細胞の活性を抑制することができれば、再手術を防止できる可能性がある。

鎖状分子であるポリエチレングリコールにシクロデキストリン(CD)が貫通したポリロタキサン(PRX)は、貫通しているCDの数を変化させることで、表面の分子運動性の高低を変化させることができ、この分子運動性が間葉系幹細胞の分化指向性に影響を与えることが知られている。

本研究では、異なる分子運動性を持つPRX上で骨芽細胞系細胞を培養し、分化過程の制御が可能となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Craniosynostosis involves the premature bony closure of the cranial sutures, which is due to early and rapid ossification. The current treatment modality is surgical separation of the fused bones to create the space. However, since the osteoblasts are in very active state, repeated closure occurs, which requires repeated surgeries.

Polyrotaxane (PRX), one of biomaterials can regulate differentiation of mesenchymal stem cells by changing the mobility of PRX surface. We have intended to utilize this property to regulate osteoblast differentiation to development the treatment minimizing repeated surgeries.

We found that different molecular mobility of PRX affects proliferation, mineralization, cytoskeleton organization and YAP localization of different type of osteoblasts. We could utilize the molecular mobility of PRX to regulate osteogenesis for avoiding repeated surgeries.

研究分野：先天異常学、発生生物学、再生医療学

キーワード：craniosynostosis osteoblast differentiation polyrotaxane

### 1. 研究開始当初の背景

頭蓋縫合早期癒合症は、2,000~3,000 出生に 1 回の頻度で認められ、原因としては遺伝的要因が主であり、環境的要因も複合的に関係していると考えられる。現在までに原因遺伝子は 60 近く発見されているが、遺伝子変異確定の割合は患者全体の 30% に満たない。

頭蓋縫合早期癒合症では、治療として癒合した骨を分離する頭蓋形成術などを行なうが、低年齢で行われるための高い骨再生能力や疾患による骨芽細胞の分化亢進などによって骨の癒合傾向が続くので、頭蓋内圧の亢進や頭蓋の変形などの問題が起き、患者は複数回の手術を受けることが多い。これは身体への侵襲、輸血に伴う事故、および感染などの合併症の可能性を含んでいる。

よって、この問題を軽減する、もしくは解決する侵襲性の低い治療方法の開発が望まれており、ターゲットの一つとして骨芽細胞分化の制御が挙げられる。

### 2. 研究の目的

#### (1)

生体材料であるポリロタキサン(PRX)は、軸となる一本の鎖状分子に複数の環状分子が貫通し、この環状分子の離脱を防止するために両側にキャップがついた超分子骨格を有している。共同研究者由井は、鎖状分子がポリエチレングリコール、環状分子がシクロデキストリンから成る PRX の水中での表面分子運動性を変化させることで、PRX に接着した間葉系幹細胞の細胞骨格変化を伴う分化特性の制御が起きることを見いだした。

本研究では、PRX のこの性質を骨芽細胞の分化制御へと応用し、治療法への適用の実現性を検討することを目的としている。

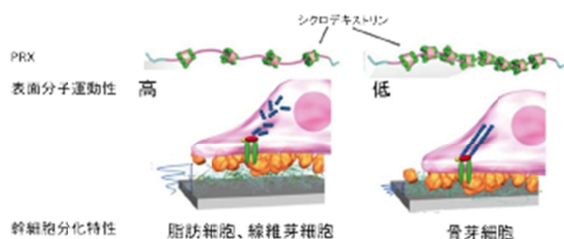


図1 ポリロタキサン(PRX)の表面分子運動性と幹細胞分化特性

#### (2)

幹細胞や未分化細胞の未分化状態の維持、分化の方向性の決定、もしくは分化を促進させるための研究についてはこれまで盛んに行われている。

本研究は、分化の方向性が決定した細胞の分化の進行の制御を目的としており、この制御が可能となると、頭蓋縫合早期癒合症を初めとした、骨芽細胞分化に異常がある疾患に対して治療ターゲットの基盤を提供する可

能性がある。また、本研究は PRX 表面の動的特性が接着細胞の細胞骨格を制御し、分化特性に結びつくことを応用するものであるが、この細胞骨格の変化が細胞の分化・増殖・遊走・アポトーシス・遺伝子発現などの細胞機能発現にどのように結びつくかを研究するためのツールとなる可能性もある。

### 3. 研究の方法

骨芽細胞様細胞株 KUSA-O 細胞やマウス頭蓋冠初代骨芽細胞を表面分子運動性の異なる PRX 上で培養し、分化の進行を検討する。また、表面分子運動性を解消した場合の分化の進行を検討し、分化抑制や促進の条件を決定する。

次にモデルマウスや頭蓋縫合早期癒合症患者から分離した骨芽細胞でも同様に骨芽細胞分化と PRX の表面分子運動性の関係を確認する。これらの結果に基づき、野生型および頭蓋縫合早期癒合症モデルマウスで、それぞれ閉鎖していない縫合部や癒合部を分離した部位に骨芽細胞分化を抑制する PRX を適用し、癒合が阻止されることを確認する。最終的に、癒合が阻止されている部位の PRX の表面分子運動性を解消させる分子を適用して骨形成を誘導し、閉鎖させる。

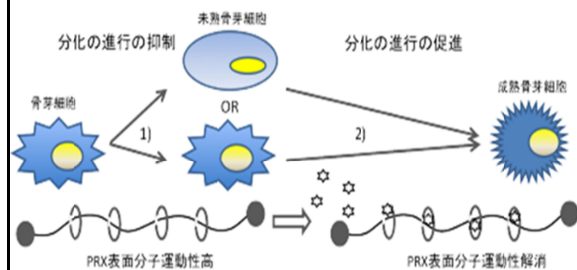


図2 表面分子運動性変化により予想される骨芽細胞分化 ☆ 脂肪族系の低分子、もしくは高分子

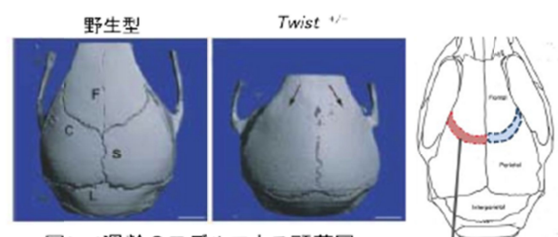


図3 6週齢のモデルマウス頭蓋冠  
矢印: 両側に癒合した冠状縫合 冠状縫合分離  
C: 冠状縫合、F: 前頭骨、L: ラムダ縫合、S: 矢状縫合

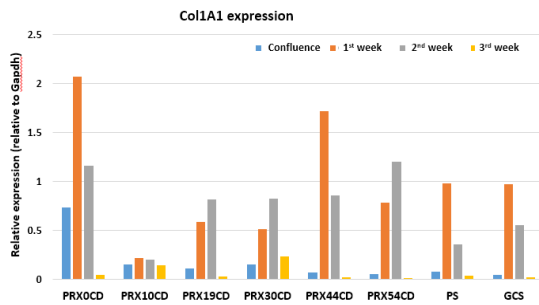
### 4. 研究成果

#### (1)

1 分子のポリエチレングリコールに貫通しているサイクロデキストリンの数を調整して、PRX0CD (軸分子のポリエチレングリコールのみ)、PRX10CD、PRX19CD、PRX30CD、PRX44CD、PRX54CD を作製した。コントロールとして、通常の細胞培養用プラスチックディッシュ (PS)、およびカバーグラス

(GCS)を用いた。PRXの数字が高いほど分子運動性は低くなることを意味する。

KUSA-O細胞を上記の分子運動性の異なるPRXでコーティングした培養ディッシュ上で培養し、グリセロール2-リン酸とアスコルビン酸を添加した石灰化誘導培地中で培養し、骨芽細胞分化マーカータイプIコラーゲン(*Col1A1*、下図)、*Runx2*転写因子、alkaline phosphatase(*Alp*)、bone sialoprotein (*Bsp*)の発現レベルをqRT-PCRによって検討した。その結果、これらマーカーの発現レベルがPRXの分子運動性の違いと関連して異なっている結果が得られ、PRXの分子運動性によって骨芽細胞の分化の促進や抑制を制御できる可能性が示唆された。

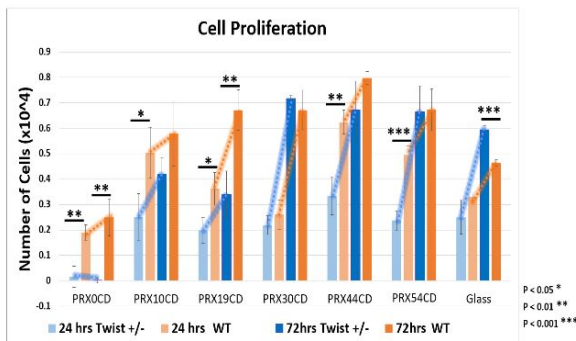


(2)

*TWIST1* 遺伝子のハプロ不全によって起きる頭蓋縫合早期癒合症であるSaethre-Chotzen症候群のモデルマウス *Twist1<sup>+/-</sup>* と野生型マウスの生後1日の頭蓋冠より初代骨芽細胞を分離した。

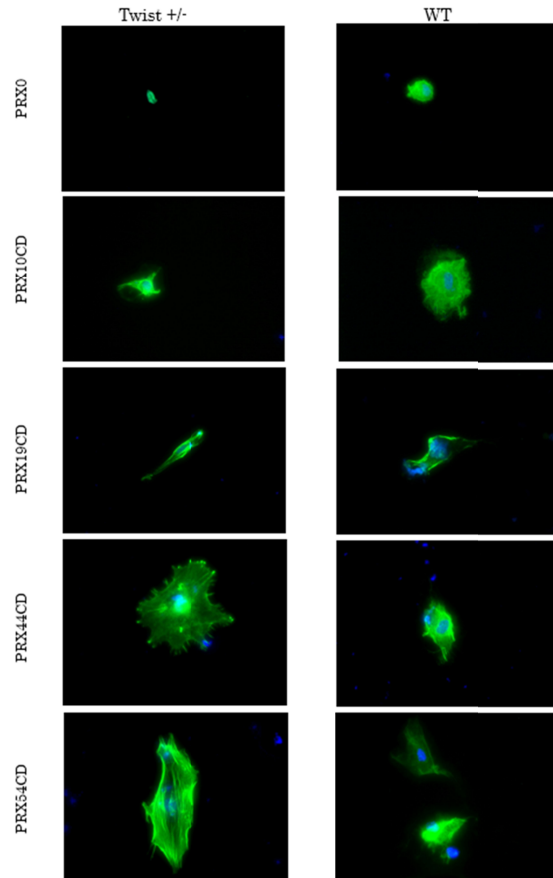
これらの初代骨芽細胞を分子運動性の異なるPRXでコーティングした培養ディッシュ上に同数の骨芽細胞を播種して培養した。

細胞播種後24時間の細胞数は、*Twist1<sup>+/-</sup>* 骨芽細胞が野生型骨芽細胞と比較してどの表面でも少ない傾向が認められた。24時間から72時間での細胞増殖については、分子運動性の高いPRX上では *Twist1<sup>+/-</sup>* 骨芽細胞の増殖能は野生型と比較して低かった。一方で、分子運動性の低いPRX上では、*Twist1<sup>+/-</sup>* 骨芽細胞の方が高い増殖能を示した。

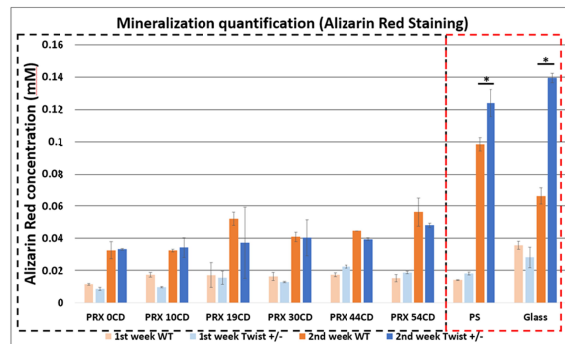


次に、異なる分子運動性を持つPRX上に細胞を播種して24時間後に細胞接着の様子について、アクチンを染色して細胞骨格形成を

検討した。*Twist1<sup>+/-</sup>* 骨芽細胞は、分子運動性が高いPRX上での接着伸展に乏しく、分子運動性が低いPRX上では接着後の接着斑形成が急速に起きていた。これより、*Twist1* が細胞骨格形成に影響を与えることが示唆された。



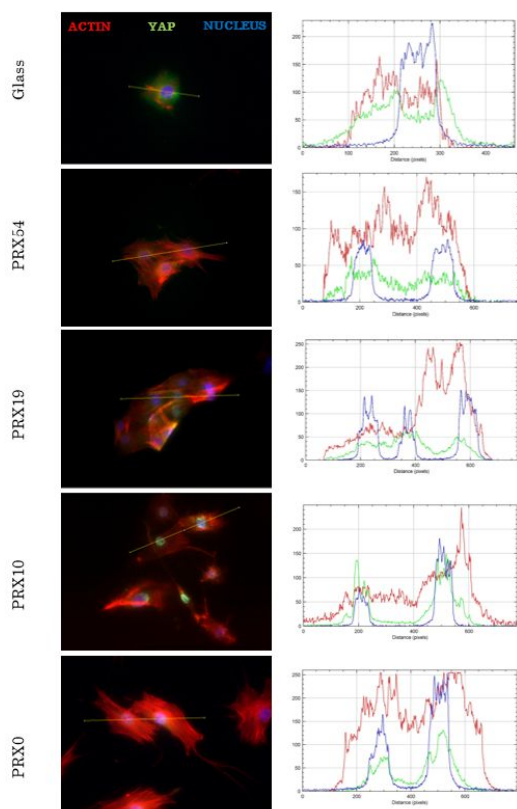
さらに、それぞれのPRX上で培養されている初代骨芽細胞に石灰化を誘導し、Alizarin Redで石灰化を検討したところ、異なるPRXおよび遺伝子型による影響はほぼ認められなかった。一方、コントロール群であるPSとGCS上での石灰化誘導では、2週目において、*Twist1<sup>+/-</sup>* 骨芽細胞で高い石灰化を示した。



(3)

通常の培地を用いて PRX 状で 48 時間培養した KUSA-O 細胞の YAP 発現を解析した。転写因子 YAP は、近年メカノトランスダクションのセンターもしくはメディエーターとして機能することが示唆されており、例えば硬い基質上で培養した細胞では YAP が核内に局在することが示されている。

分子運動性の高い PRX 上では YAP は細胞質に局在し、分子運動性の低い表面上では YAP の核移行が顕著に認められた。



以上の結果は、異なる分子運動性を示す PRX を用いることで、骨芽細胞分化の制御が可能であることが示唆された。

#### 引用文献

Seo et al. Adv Healthc Mater 2015 4:215-222.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

Rajendran AK, Arisaka Y, Yui N, Iseki S. Regulation of Osteogenic Differentiation by Utilizing Supramolecular Mobility of Polyrotaxanes for the Treatment of

Craniosynostosis. 第 13 回 Craniosynostosis 研究会石川県立音楽堂交流ホール、金沢 2017 年 7 月 8 日 口演

Sachiko Iseki: Application of biomaterials in osteogenesis The 6 Asian Biomaterials Congress along with APSAO 2017 meeting & 27<sup>th</sup> National Conference of SBAOI October 25-27, 2017 I Thiruvananthapuram, India

[その他]  
ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/emb/emb-J.htm>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

井関 祥子 (ISEKI, Sachiko)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：80251544

##### (2)研究分担者

上田 晃一 (UEDA, Koichi)  
大阪大学・医学部・教授  
研究者番号：90257858

由井 伸彦 (YUI, Nobuhiko)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授  
研究者番号：70182665

##### (3)連携研究者

Arun Kumar Rajendran  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・大学院生

##### (4)研究協力者

有坂 慶紀 (YOSHINORI, Arisaka)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教