

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15834

研究課題名(和文)3Dプリンタによる4次元足場とiPS細胞を用いたフルカスタムメイド再生骨の開発

研究課題名(英文)Development of full custom made regenerative bone with 4 dimensional scaffold by 3D printer and iPS cells

研究代表者

松林 幸枝 (Matsubayashi, Yukie)

東京大学・医学部附属病院・病院診療医

研究者番号：80400513

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)：マウスiPS細胞の中胚葉系細胞分化を実施し、一部の細胞がin vitroで中胚葉系の成熟組織を形成したと示唆された。一方この分化方法は改善の余地が大きいと考えられた。そこで研究室でより多くの知見を有するヒトiPS細胞から中胚葉系細胞への分化、組織化と移植を行った。サンプルの解析を進めたところ、中胚葉系組織の残存と、再生骨の形成が観察された。並行して、三次元造形を施したTCPをアガロースモールドで三次元培養する検討に着手した。また、並行して三次元造形を施したTCPをマウス頭蓋骨欠損モデルに移植した。詳細は解析中であるが、概ね形状を維持しており、再生骨が形成されたことが示唆されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎顔面領域の骨欠損の修復には複雑な形態を求められることが多く、カスタムメイドな再生骨の作製が可能になればその恩恵は成人のみならず、十分な骨採取量の確保が困難な小児にも及ぶと考えられる。臨床応用の準備が着々と進んでいるヒトiPS細胞を活用することで顎顔面骨におけるメカニカルストレスに対応可能な強度を有する再生骨を大量に作製できる可能性が高まることが期待され、先天疾患に伴う歯列不正の治療方法の開発が一層発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We differentiated murine iPS cells to mesodermal cells and were successful in inducing very small fraction of cells into mesodermal tissue in vitro. On the other hand, there seemed a lot of room for improvement with the differentiation method. We consulted to the laboratory and decided to switch to human iPS cells and transplanted the differentiated mesodermal tissue. Histological analysis suggested the remaining of mesodermal tissue and formation of regenerative bone. In parallel, we started 3D culture with agarose mold and 3D fabricated TCP. Along with the 3D culture, we transplanted 3D fabricated TCP to murine cranial bone defect model. Although analysis is still in progress, the TCP mostly maintained its shape and formation of regenerative bone is suggested.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：iPS細胞 フルカスタムメイド 再生骨 歯科矯正学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域においては、骨が失われる原因は多岐にわたる。先天性疾患では口唇口蓋裂、ヘミフェイスルマイクロソミア、トリーチャーコリンズ症候群などがあり、顎裂閉鎖や顔面形成のために骨移植を行うことが多い。顎裂閉鎖は、近年施行時期が早まり5歳台に施行されることが多いが、小児期での骨採取は侵襲が大きい。また、複雑な形態を回復するための顔面形成においては骨を大量に必要とするため、小児期に行うことは困難である。

再建材料には、自家骨、人工骨、他家骨、異種骨等があるが、現行の治療では自家骨移植が標準である。自家骨移植では、骨採取部に大きな侵襲が及ぶばかりでなく、採取量に限界がある。人工骨は、種々の素材のものが販売されているが、現在のいかなる人工骨を用いても感染や露出の可能性もあり、大きな骨欠損部を再建することは困難である。

顎顔面領域は咀嚼に伴い、かなりの機械的負荷がかかるため、こうした領域の骨再建においては移植した素材が母骨と同化することが必須と考えられる。すなわち、移植される素材には骨細胞などが担持されることが大型の再建には好ましい。このため、大量の骨細胞を患者の身体的負担なく供給するシステムと、時間的および空間的に移植された大量の細胞や成長因子を担持できる4次元足場素材が必要と考えられた。

第1点の大量の細胞供給に関しては、近年iPS細胞の研究が進み、申請者らもすでにマウスおよびヒトiPS細胞の骨細胞への分化誘導に成功していた[Kanke et al. Stem Cell Reports 2014]。同時に、わが国を中心にHLAハプロタイプホモ型の健常者体細胞の供給により、免疫拒絶の可能性の非常に低いヒトiPS細胞のバンキング化および随時供給への体制が整いつつある。品質が高い安全なヒトiPS細胞がいつでも利用できるようになることが近い将来に想定され、ヒトiPS細胞利用への敷居が格段に低くなっている。

第2点の4次元足場に関しては、組織工学の技術の向上が近年目覚ましく、多くの足場素材の開発が報告されていた。また最新の3次元造形技術を活用することでカスタムメイド再生医療への敷居が大幅に下がってきていた[Itoh et al. PLOS ONE, 2015]。この中でも、申請者らがすでに保有している3DプリンタとTCPを用いたフルカスタムメイド人工骨において、申請者らは世界に先駆けて開発および臨床研究を行った[Saijo et al. Oral & Maxillofacial Surgery 2011]。3Dプリンタを用いることにより、さらに時間的、空間的に成長因子の傾斜的配置が可能になることが期待され、いわゆる4次元足場の創生が期待されていた。

2. 研究の目的

顎顔面領域においては、先天的および後天的な様々な原因により骨の低形成や、欠損を生じる。現行の治療においては、自家骨移植がゴールドスタンダードであるが、小児期に骨採取部に侵襲が及び患者の身体的負担は大きい。また、トリーチャーコリンズ症候群やヘミフェイスルマイクロソミアの患者においては、骨採取量の制限から小児期での再建は困難である。こうした顎顔面領域の形状は非常に複雑であり、さらに個々の症例によって欠損形状が異なる。これに対し、本研究ではマウスiPS細胞から作製した大量の骨細胞と、3Dプリンタを用いた4次元足場を用いて、顎顔面の複雑な骨欠損修復に対応可能であり、かつ、顎顔面骨におけるメカニカルストレスに対応可能な強度を有するフルカスタムメイドの3次元再生骨を創製することを目標とした。

3. 研究の方法

平成28年度は、マウスiPS細胞由来細胞をTCPへ浸透させ、天然骨に近い機械的特性を有し、自在に形状を制御することができる再生骨を作製するための検討を実施した。マウスiPS細胞の骨分化誘導の検討に先立ち、研究室で多くの知見を有する、iPS細胞の中胚葉系細胞分化誘導の検討を行うことで、長期にわたる分化誘導培養に適したマウスiPS細胞の無血清フィーダーフリー培養への馴化の方法を探索した。この検討にはnanogプロモータ領域にGFPタンパクを導入したマウスiPS細胞である、iPS-MEF-Ng-178B-5株を使用し、未分化性の維持ないし低下の判別を容易にした。

平成29年度は、前年度に培養・分化誘導した細胞について、mRNAの抽出、cDNAへの逆転写、およびリアルタイムPCR法による遺伝子発現の経時的推移の評価を行った。

平成30年度は、前年度までの検討によりマウスiPS細胞iPS-MEF-Ng-178B-5株を用いた中胚葉系細胞への分化誘導検討を進めた。並行して研究室でより多くの知見を有する、ヒトiPS細胞から中胚葉系細胞の分化誘導方法について検討した。研究室で有するプロトコルに則りヒトiPS細胞由来中胚葉系細胞に分化させたものをヌードマウス背部皮下に移植し、8週間の経過観

察を行った。

4．研究成果

長期にわたる分化誘導培養に適したマウス iPS 細胞の無血清フィーダーフリー培養への馴化の方法の探索では、凍結保存から一旦フィーダー細胞上に血清培地での培養をへてから、マトリゲルコート上に無血清培地での培養に馴化させることで、長期間の細胞培養が可能であることが明らかとなった。

無血清フィーダーフリーへ馴化した細胞を中胚葉系細胞分化誘導培地での培養を実施したところ、経時的に nanog プロモータの GFP 蛍光励起が徐々に減弱したことが観察された。この検討にて得られた細胞の遺伝子発現の解析をしたところ、多能性マーカーである nanog の発現は、分化誘導の後半になると減弱したことが示された。この結果は、細胞の培養時に観察された、nanog のプロモータに導入した GFP の蛍光励起が経時的に減弱したことと一致している。

また、初期中胚葉系のマーカーである brachyury の発現は培養期間中に亢進した時期がみられたことが示された。また、一部の細胞が *in vitro* で中胚葉系の成熟組織を形成したことが示唆された。

一方のこの組織の作出効率は大変低く分化誘導方法にさらなる改善の余地があることが考えられたため、研究室でより多くの知見を有するヒト iPS 細胞から中胚葉系細胞への分化誘導、組織化と *in vivo* への移植を行ったサンプルの解析を進めたところ、中胚葉系組織の残存と、再生骨の形成が観察された。並行して、三次元造形を施した TCP をアガロースモールドで三次元培養する検討に着手した。また、並行して三次元造形を施した TCP をマウス頭蓋骨欠損モデルに移植した。詳細は解析中であるが、概ね形状を維持しており、再生骨が形成されたことが示唆されている。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

井口 隆人, 大久保 和美, 岡安 麻里, 内野 夏子, 松林 幸枝, 丸岡 亮, 久保 迪, 林 婉テイ, 西條 英人, 須佐美 隆史, 星 和人: 片側性唇顎口蓋裂患者における口蓋形態と上顎骨発育との関連性. 第 77 回 日本矯正歯科学会学術大会 2018 年 10 月 30 日-11 月 1 日 パシフィコ横浜, (神奈川・横浜)

松林幸枝, 須佐美隆史, 大久保和美, 井口隆人, 岡安麻里, 内野夏子, 高橋直子, 上床喜和子, 阿部雅修, 安部貴大, 森良之, 高戸毅、顎関節強直症による小下顎症の 1 例、第 76 回日本矯正歯科学会大会、2017 年 10 月 18 日~20 日、さっぽろ芸文館、ロイトン札幌、札幌市教育文化会館、(北海道・札幌市)

上床喜和子, 須佐美隆史, 市ノ川義美, 兼古晃輔, 大久保和美, 井口隆人, 岡安麻里, 内野夏子, 高橋直子, 松林幸枝, 高戸毅、矯正歯科治療・顎矯正手術を行う Optiz 症候群の 1 例、第 27 回日本顎変形症学会総会・学術大会、2017 年 6 月 15 日~16 日、東京ビックサイト TFT、(東京・江東区)

岡安麻里, 須佐美隆史, 西條英人, 大久保和美, 井口隆人, 内野夏子, 高橋直子, 上床喜和子, 松林幸枝, 杉山円, 星和人, 高戸毅、乳歯列期における顎裂部骨移植後の上顎前歯部の矯正歯科治療、第 41 回 日本口蓋裂学会総会・学術集会、2017 年 5 月 18 日~19 日、ホテルオークラ東京、(東京・港区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大久保 和美
ローマ字氏名：(Ohkubo Kazumi)
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：講師
研究者番号（8桁）：10396715

研究分担者氏名：菅野 勇樹
ローマ字氏名：(Kanno Yuki)
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：80451813

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。