

令和元年6月19日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07018

研究課題名(和文) 臨床応用にむけたテーラーメイド3D骨組織のナノ・ボトムアップ・ファブリケーション

研究課題名(英文) Nano / Bottom-Up / Fabrication of TaylorMade 3D Bone Tissue for Clinical Application

研究代表者

佐藤 良樹 (Yoshiki, Sato)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：50808235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯槽骨欠損などの骨疾患に対する骨再生治療の目的で、骨芽細胞が接着して骨基質を産生するスキャフォールドが望まれる。本研究ではナノゲルテクトニクス技術を用いて新規多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲルを開発した。誘導骨芽細胞を播種した結果、細胞接着と増殖、骨芽細胞への誘導と骨基質形成が支持され、生体内でも骨再生に貢献することが分かった。この多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲルは、骨芽細胞の培養に適切な足場として機能し安全性も高いため、骨再生療法のための新規スキャフォールドとして有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲルは、安全な自家骨細胞移植の足がかりとして大きな一歩となる。フリーズドライ処理を行うことで、3次元培養の精度が上がり、長期保存も可能となることから臨床応用可能な技術に近づいたといえる。本研究で多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲルとダイレクト・リプログラミングによる大量の骨芽細胞を接着させ、移植細胞の創部からの漏洩の問題を解決し、一塊として簡易な術式で組織移植が行えたことは臨床応用への術式簡素化という意味で意義がある。動物実験では、マイクロCTおよび組織切片にて移植部に機能的な骨再生が確認でき、臨床応用に向けた基礎データが得られた。

研究成果の概要(英文)：To treat patients with bone diseases including alveolar bone resorption by means of bone regenerative therapy, it should be important to devise a novel scaffold that allow efficient adhesion of and bone matrix production by osteoblasts. Here we established a novel porous cross-linked nanogel by means of the nanogel technics. This scaffold supported adhesion and proliferation of induced osteoblasts, as well as regeneration of injured bone tissue in vivo. This porous hybrid nanogel is adequate for transplantation therapy, due to its safety and functions.

研究分野：再生医療

キーワード：スキャホールド ナノゲル ダイレクト・リプログラミング 骨芽細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

多くの高齢者が罹患している歯周病は、歯槽骨欠損、歯牙の喪失へと進展することで、QOLの低下のみならず感染症、摂食障害、栄養不良、認知症等を生じさせる。このように重要性の高い高齢者の骨疾患に対して、骨再生治療の確立が期待される。骨再生治療には、骨を形成する骨芽細胞と、骨芽細胞に必要とされる立体形状の骨を作らせるための足場材料（スキャフォールド）が必要である。我々は最近、皮膚線維芽細胞から骨芽細胞へ直接転換する技術（ダイレクト・リプログラミング）を樹立し、骨芽細胞の大量供給を可能とした。一方でスキャフォールドとしては、自在に3D成型でき、骨芽細胞が接着して高品質な骨基質を産生し、安全で生体適合性を有することが必要とされるが、そのような理想的なスキャフォールドの開発は十分なされてきたとは言い難い。そこでナノゲルテクトニクス技術により開発された多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲルを使用した。本研究は極めて独創的で斬新なダイレクト・リプログラミング技術とナノゲルテクトニクス技術の融合により、臨床応用可能な新しい再生治療を生み出すと考えられ、その学術的および実用的な意義は大きい。また、骨芽細胞のダイレクト・リプログラミング技術と多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲルは、いずれも我々のグループだけが確立した独創的新技術であり、これらを融合させて理想的な骨再生治療の基盤技術を創生するところに本研究の特色と先進性がある。本研究の成果は、高齢化社会において極めて重要な骨疾患に対する新しい有効な治療法を提示するのみならず、将来的にバイオマテリアル開発と組織工学の発展にも大きな影響をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

ナノゲルテクトニクス技術を用いて新規多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲルを開発することを目的とした。上記の直接誘導骨芽細胞（dOBs）を播種して、骨再生医療のためのスキャフォールドとしての有用性を検証した。本研究で多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲルとダイレクト・リプログラミングによる大量の骨芽細胞を接着させ、移植細胞の創部からの漏洩の問題を解決し、一塊として簡易な術式で組織移植が行えたことは臨床応用への術式簡素化へむけて実験を進めていく。細胞移植の際には細胞を創部に留めておく為に足場材料が必要となるが、ナノゲルテクトニクス技術により開発された多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲルを使用した。多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲルにダイレクト・リプログラミングを用いて大量供給された骨芽細胞を接着させ、大規模骨欠損部へ移植することで骨回復させることを目的とした。

3. 研究の方法

新規多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲルとして、NanoClick gel (NanoClick gel) を作成した。すなわち、まず Hashimoto らの方法により、コレステロール基とアクリロイル基を導入した cholesterol-bearing pullulan (CHP) を自己組織化させて CHPOA nanogel とした。鋳型の中で PEGSH を加えて架橋し、NanoClick gel とした。これを凍結融解して NanoClick gel を得た。さらにこれを凍結乾燥させて NanoClick FD-matrix を作成した。また、ローダミン標識、fibronectin コーティング、RGDC ペプチドの結合を行った NanoClick-FD matrix もそれぞれ作成した。ヒト線維芽細胞に Osterix、Oct3/4、L-Myc (XOL) の 3 遺伝子をレトロウイルス・ベクターにて導入した。翌日、細胞をディッシュから剥がし、懸濁液を NanoClick-FD matrix に浸潤させて NanoClick-FD gel とした。骨芽細胞培地中で培養したのち、骨芽細胞が孔内部に進展接着して 3 次的に配向して増殖していることを確認するため、カルセイン染色、アクチン-ヘキスト染色とテトラゾリウム塩アッセイで評価した。染色後は共焦点顕微鏡を用いて細胞との接着を確認する。また骨基質形成を、Alizarin Red S 染色、osteo image assay、および real time RT-PCR による mRNA 発現解析で評価した。生体内での骨形成能を評価する目的で、In vivo では -/-マウスの大腿骨を削合し、骨髓を除去して骨幹部の骨を欠損させる。この欠損部に、上記の再生骨組織を移植する。移植後 21 日目にマウスを安楽死させて大腿骨を採取し、マイクロCT 撮像を行って骨再生を評価する。移植部の組織切片を作成して H・E 染色、Alizarin red S 染色を行う。

4. 研究成果

(1) NanoClip-FD gel の形状 (図1)

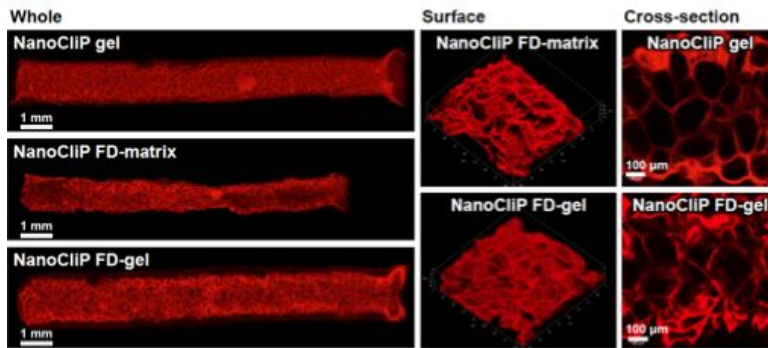


図1 NanoClip-FD gelの形状を共焦点顕微鏡像にて観察

既報の NanoClip gel は直径数百マイクロメートルの互いに結合した多くの孔を有するが、本研究で開発した NanoClip-FD gel はさらに大きな孔が不整に結合した構造であった。

(2) NanoClip-FD gel への直接誘導骨芽細胞の接着と増殖 (図2)

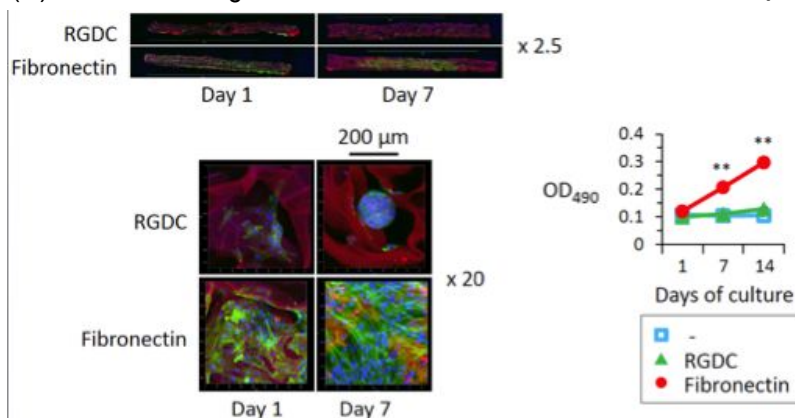


図2 NanoClip-FD gelへの直接誘導骨芽細胞の接着と増殖をアクチン-ヘキスト染色およびWST assayにて観察測定

Fibronectin-coated NanoClip-FD gel 中に播種した XOL 導入細胞は、多数が仮足を伸ばして孔壁に沿って接着し、経時的に増殖した。一方、RGDC ペプチドを結合した NanoClip-FD gel では、細胞はスフェロイド状に凝集し、明らかな増殖は認めなかった。

(3) NanoClip-FD gel 内での骨芽細胞誘導と骨基質形成 (図3)

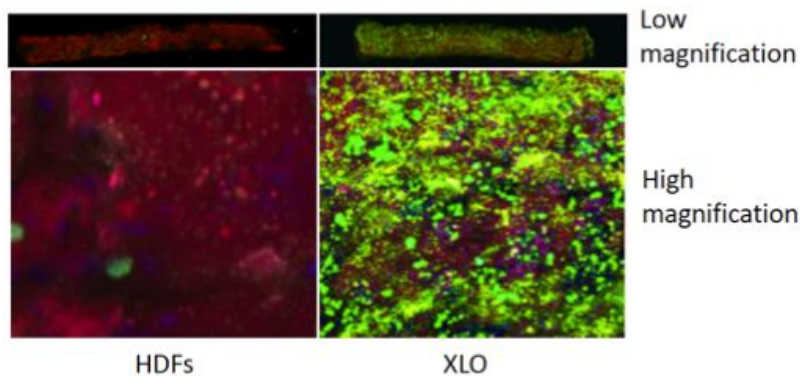
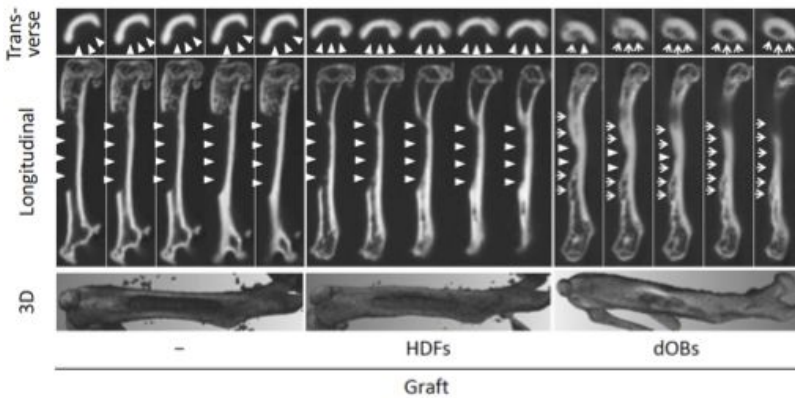


図3 NanoClip-FD gel内での骨芽細胞誘導と骨基質形成をOsteo image assayにて染色・共焦点顕微鏡にて観察

Fibronectin-coated NanoClip-FD gel 中で培養した XOL 導入細胞は、osteocalcin と osteopontin 遺伝子の発現が増強し、石灰化骨基質の産生とハイドロキシアパタイト結晶の沈着を誘導した。

(4) マウス大腿骨骨欠損部での骨再生 (図4)



XOL 導入細胞を播種した fibronectin-coated NanoClip-FD gel を移植したところ、著明な骨再生が認められ、約 70% の骨回復を認めた。線維芽細胞を播種したものの移植ではこのような骨再生は見られず、骨回復は約 30%であった。

図4 マウス大腿骨骨欠損部での骨再生をμCTにて撮影

(5)組織回復においては、細胞を単に移植するより 3D 培養し、得られた培養組織を移植することが望ましい。NanoClip-FD gel は、天然多糖プルランを主成分とするナノゲルを化学架橋により自在な 3D 形状に成型した多孔性架橋ハイブリッドゲルであり、生分解性で生体適合性が高い。架橋の条件によってさまざまな孔径と孔密度を有するものを作成でき、fibronectin コーティングや RGDC の結合も容易である。また任意の形状に成型できるので、患者ごとの病変部の形状に合わせたテーラーメイドの自家骨組織を提供できる可能性がある。また、異種タンパクを含まないので異種タンパクを主成分とする既存の足場材料よりも安全性が高いと考えられる。本研究の結果、fibronectin-coated NanoClip-FD gel が XOL 導入細胞の接着と増殖、骨芽細胞への誘導と骨基質形成を強く支持することが示された。

dOBs は、安全かつ低侵襲に採取できる自家細胞から多数誘導でき、均質で高機能であるため、間葉系幹細胞などに比してメリットがある。本研究の直接誘導骨芽細胞はレトロウイルス・ベクターを用い作製しているため、潜在的な造腫瘍性の問題はあがるが、最近我々は低分子化合物を添加することで線維芽細胞から骨芽細胞を誘導する技術も樹立したので、これと NanoClip-FD gel との組み合わせにより造腫瘍性の回避が期待できる。

以上の結果より、我々が今回開発した多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲルである NanoClip-FD gel は、骨芽細胞の培養に適切な足場として機能し、任意の形状の 3D 骨組織の形成を可能にするものであることが示された。さらに生体内に移植することで、細胞を欠損部位に留め骨再生を促進させたところから、骨再生療法のための新規スキャフォールドとして有用である可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Nanogel tectonic porous 3D scaffold for direct reprogramming fibroblasts into osteoblasts and bone regeneration.

Sato Y, Yamamoto K, Horiguchi S, Tahara Y, Nakai K, Kotani S, Oseko F, Pezzotti G, Yamamoto T, Kishida T, Kanamura N, Akiyoshi K, Mazda O.

Scientific Reports 8:15824

DOI:10.1038/s41598-018-26745-2

2018 年 10 月 [査読有り]

Direct phenotypic conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts triggered by a blockade of the transforming growth factor- β signal.

Yamamoto K, Kishida T, Nakai K, Sato Y, Kotani S, Nishigizawa Y, Yamamoto T, Kanamura N, Mazda O

Scientific Reports 8:8463

DOI:10.1038/s41598-018-26745-2

2018 年 5 月 [査読有り]

[学会発表](計 4 件)

Osteoblast transplantation treatment of large scale bone defect using direct reprogramming technique and 3D scaffold.

Sato Y, Yamamoto K, Nakai K, Oseko F, Hasegawa A, Kishida T, Mazda O, Yamamoto T, Kanamura N

13th Asian Congress on Oral & Maxillofacial Surgery (ACOMS) 2018 年 11 月

ダイレクト・コンバージョン技術を用いた新規骨再生療法の開発
中井 敬, 佐藤良樹, 山本健太, 足立哲也, 足立圭司, 大迫文重, 雨宮 傑, 山本俊郎, 金村成智.

第 61 回秋季日本歯周病学会学術大会 2018 年 10 月

Establishment of bone regeneration therapy by direct conversion using rat fibroblasts.

Sato Y, Yamamoto K, Nakai K, Oseko F, Kishida T, Mazda O, Yamamoto T, Kanamura N.

40th Asia Pacific Dental Congress (APDC) 2018 年 5 月

ダイレクト・リプログラミング技術を用いた新規骨再生療法の開発.

佐藤良樹, 山本健太, 中井敬, 堀口智史, 足立哲也, 足立圭司, 大迫文重, 雨宮傑, 坂下敦宏, 山本俊郎, 金村成智.

第 147 回日本歯科保存学会 2017 年 10 月

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称: 多孔質三次元細胞培養足場材料及びその製造方法

発明者: 佐藤良樹 堀口智史 山本健太 田原義朗 山本俊郎 岸田綱郎 松田修
秋吉一成

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-158931

取得年: 平成 30 年

国内外の別: 国内

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

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。