

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11849

研究課題名(和文) 足場とドラッグデリバリー機能を持つハイブリッドナノゲルを用いた顎骨再生と臨床応用

研究課題名(英文) Bone regeneration and clinical application using the hybrid nanogel scaffolds

研究代表者

山本 俊郎 (Toshiro, Yamamoto)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40347472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞と足場材料を用いた骨再生治療が期待されてきている。骨再生医療を確実に行うには、硬さとしなやかさを兼ねそろえた良質の骨組織を構築し、移植する必要がある。しかしながら、これまでの骨再生治療は、再生骨組織の骨質についてはあまり着目されてこなかった。また、良質の骨再生を形成するには骨基質タンパク質や石灰化の起点となる基質小胞を効率的に集積することが重要である。本研究は、ハイドロキシアパタイトの配向性を制御できるような新規足場材料“多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲル”を開発し、さらに骨質を様々な分光学的手法により評価することで、新たな骨再生医療の基盤技術の開発を目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲル(Nano CliP gel: nanogel-cross linked-porous freeze-dried gel)はその表面の化学的性状により、カルシウムやリンイオンを吸着することで、力学機能を発揮するc軸方向へHAP結晶の成長を促していることが明らかとなった。Nano CliPゲルはアテロコラーゲンと比較して、結晶配向性の高い剛性と弾性を併せ持つ再生骨組織を構築することから、骨質の低下した骨疾患患者や高齢者に対して、良質の骨組織を提供する新たな骨再生医療の基盤技術になり得る。

研究成果の概要(英文)：Because of coming super-ageing-society, for alveolar bone loss due to ageing and periodontal disease, it has been expected to conduct regenerative remedies of periodontal tissue, utilizing scaffold and mesenchymal stem cell (MSC). So, regeneration of periodontal tissue is very important in improving QOL. In existing treatment for bone loss, the quality of regenerated bone tissue has not been promising. In this study, we developed new scaffold “FD-NanoCliP-gel” that enable us to regulate the orientation of Hydroxy-Apatite (HAp) and the distribution of the Matrix vesicles and analyzed bone quality of regenerated bone tissue, for the purpose of development of core manufacturing technology in newly bone regenerative medicine.

研究分野：口腔外科

キーワード：ナノゲル 骨再生 ラマン分光法 多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲル 間葉系幹細胞 配向性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎える我が国では、歯周病による歯槽骨吸収に対して間葉系幹細胞と足場材料を用いた歯周組織再生治療が期待されてきている。骨再生医療を確実に行うには、硬さとしなやかさを兼ねそろえた良質の骨組織を構築し、移植する必要がある。しかし、これまでの骨再生治療は、再生骨組織の骨質（生体アパタイトの配向性や結晶性）についてはあまり着目されてこなかった。また、良質の骨再生を形成するには骨基質タンパク質や石灰化の起点となる基質小胞を効率的に集積することが重要である。本研究は、ハイドロキシアパタイト（HAP）の配向性を制御できるような新規足場材料“多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲル”を開発し、さらに骨質を様々な分光学的手法により評価することで、新たな骨再生医療の基盤技術の開発を目的とする。

2. 研究の目的

本研究はドラッグデリバリー機能を有する足場材料多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲルを用いた新規顎骨再生療法の開発を行うことを目的とする。近年、組織工学の発展により、生体外で生体組織構築し、移植する試みが行われている。多分化能を有する間葉系幹細胞（MSCs）の3次元培養には、培養基板の弾性により細胞分化の成熟度が制御されることから、組織培養には、培養液以外に足場の性状も考慮する必要がある。さらに、MSCsは足場材料上で3次元培養することで、2次元培養では得られない、成長因子や細胞外小胞を産生することが知られている。MSCの3次元培養は、細胞自身の分化を促進するだけでなく、再生因子を含む液性因子の産生を促すことで、母床組織の再生に寄与すると考えられる。そのため、適切な足場材料を選択することは組織培養において非常に重要である。

申請者らのグループはナノキャリアであるナノゲルをPEGで架橋することで新規足場材料多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲルを作製した。多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲルを用いた構築した培養骨組織の骨質を分光学的解析することで、新規骨再生療法になり得るかを検証した。

3. 研究の方法

これまでに、多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲル（以下、Nano Clip ゲル）上でヒト線維芽細胞から骨芽細胞へ直接転換することで、培養3次元骨組織の構築に成功している。さらに *in vivo* の系において、Nano Clip ゲルと直接転換骨芽細胞より構築した培養3次元骨組織をマウス骨欠損部に移植することで、骨再生を促すことを実証した。（Sato Y et al. Sci Rep. 2018）。本研究では、マウス間葉系幹細胞株 KUSA-A1 を Nano Clip ゲルおよび市販のウシ皮由来の Atelocollagen 中に播種し、骨誘導条件にて3次元培養した（図1）。1週間後、足場材料の石灰化の状態を評価するため、様々な分光学的解析（ラマン分光解析、カソードルミネッセンス解析、エネルギー分散X線解析）を行った。また、骨基質タンパク質オステオカルシンの発現を免疫染色およびELISAで行った。

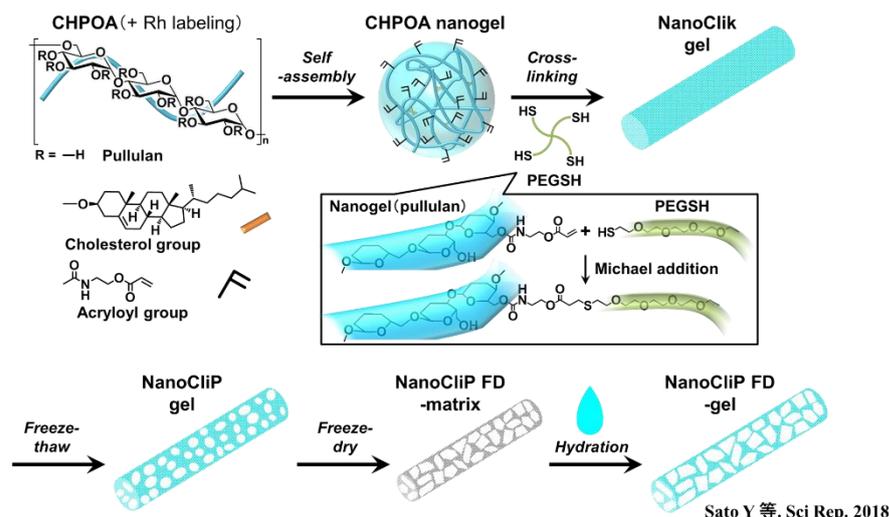
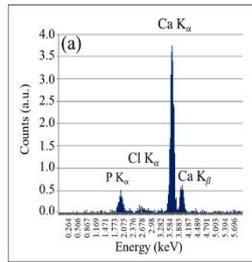


図1. コレステロール置換プルラン(CHP)ナノゲルを架橋することで、多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲル(Nano Clip FD gel: nanogel-cross linked-porous freeze-dried gel)を開発した。

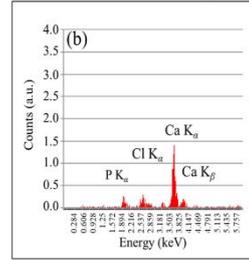
4. 研究成果

エネルギー分散X線解析では、Nano Clip ゲル上では Atelocollagen よりも高い Ca と P のピー

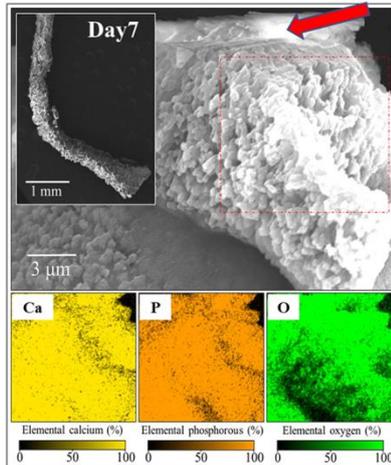
Nano CliP



Atelocollagen



Nano CliP



Atelocollagen

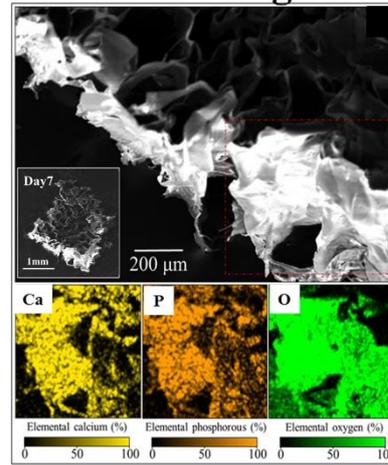
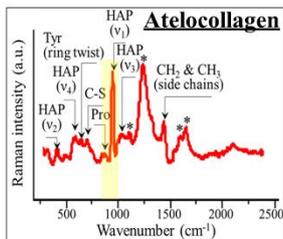
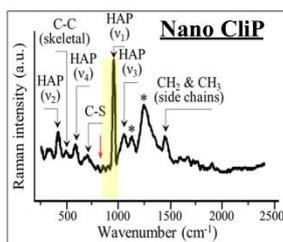


図2.SEM/EDXでは、Nano CliP FD gel上ではAtelocollagenよりもCaとPの高いピークが普遍的に検出された。

クが普遍的に検出された (図 2)。カソードルミネッセンス解析により、Nano CliP ゲル上では配向性を有する六方晶系の生体アパタイトが構築されることを確認した。またラマン分光法では、分子レベルで結晶性の高い HAP のピーク (960 cm^{-1}) が確認され、Nano CliP ゲルは Atelocollagen と比較して結晶性の高い HAP を構築できることが示された (図 3)。

Nano CliP ゲルはその表面の化学的性状により、強い力学機能を発揮する c 軸方向へ HAP 結晶の成長を促していると考えられる (図 4)。また、骨基質タンパク質オステオカルシンはゲル

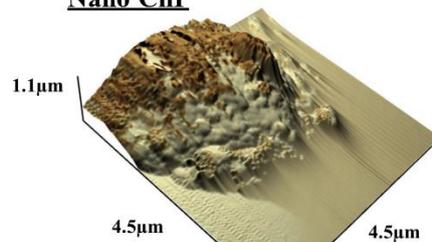
Raman analysis



Hydroxyapatite: HAP

SPM

Nano CliP



Cathodoluminescence

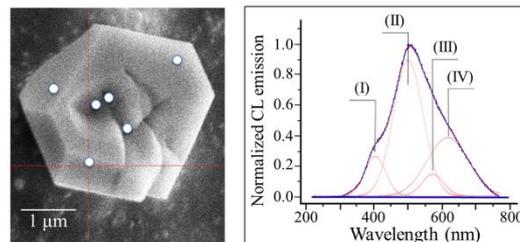
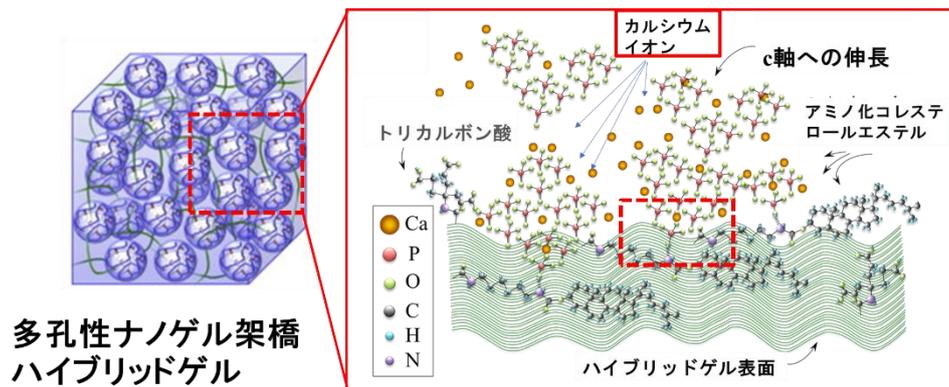


図3.ラマン分光分析では、Nano CliP FD gelにおいて960 cm^{-1} 付近に HAP 由来の鋭いピーク認められた。また、カソードルミネッセンスにおいて、Nano CliP-FD gelでは結晶性の高い六方晶系の HAP を認めた。

内部に取り込まれていることが明らかになった。

Nano Clip ゲルは Atelocollagen と比較して、結晶配向性の高い剛性と弾性を併せ持つ再生骨組織を構築することから、骨質の低下した骨疾患患者や高齢者に対して、良質の骨組織を提供する新たな骨再生医療の基盤技術になり得る。



多孔性ナノゲル架橋
ハイブリッドゲル

図4. Nano Clip FD ゲル上で起こる分子の動的挙動。Nano Clipゲルに基質小胞(カルシウムイオン)が集積し、配向性を有する六方晶のアパタイトが形成される。

参考文献

1. Horiguchi S. et al. Mater. Sci. Eng. C. 99:1325-1340, 2019.
2. Sato Y. et al. Sci Repo.8:15824.2018.
2. Hashimoto Y. et al. Biomaterials.37:107-115.2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Sato Y, Yamamoto K, Horiguchi S, Tahara Y, Nakai K, Kotani SI, Oseko F, Pezzotti G, Yamamoto T, Kishida T, Kanamura N, Akiyoshi K, Mazda O. | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Nanogel tectonic porous 3D scaffold for direct reprogramming fibroblasts into osteoblasts and bone regeneration. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep | 6. 最初と最後の頁 15824 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-33892-z. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yamamoto K, Kishida T, Nakai K, Sato Y, Kotani SI, Nishizawa, Yamamoto T, Kanamura N, Mazda O. | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Direct phenotypic conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts triggered by a blockade of the transforming growth factor- signal. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep | 6. 最初と最後の頁 8463 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26745-2. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Pezzotti G, Adachi T, Gasparutti I, Vincini G, Zhu W, Boffelli M, Rondinella A, Marin E, Ichioka H, Yamamoto T, Marunaka Y, Kanamura N | 4. 巻 173 |
| 2. 論文標題 Vibrational monitor of early demineralization in tooth enamel after in vitro exposure to phosphoric liquid | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Spectrochimica Acta Part A | 6. 最初と最後の頁 19-33 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.saa.2016.08.036. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Shirasugi M, Nishioka K, Yamamoto T, Nakaya T, Kanamura N | 4. 巻 482 |
| 2. 論文標題 Normal human gingival fibroblasts undergo cytoostasis and apoptosis after long-term exposure to butyric acid | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun | 6. 最初と最後の頁 1122-1128 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.11.168 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Sasamoto K, Marunaka R, Niisato N, Sun H, Taruno A, Pezzotti G, Yamamoto T, Kanamura N, Zhu W, Nishio K, Inui T, Eaton DC, Marunaka Y | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 Analysis of Aprotinin, a Protease Inhibitor, Action on the Trafficking of Epithelial Na ⁺ Channels (ENaC) in Renal Epithelial Cells Using a Mathematical Model. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Cell Physiol Biochem | 6. 最初と最後の頁 1865-1880 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000471934. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Marunaka Y, Marunaka R, Sun H, Yamamoto T, Kanamura N, Inui T, Taruno A | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Molecules | 6. 最初と最後の頁 E209 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules22020209. | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Boschetto F, Adachi T, Horiguchi S, Marin E, Paccotti N, Asai T, Zhu W, McEntire BJ., Yamamoto T, Kanamura N, Mazda O, Ohgitani E, Pezzotti G | 4. 巻 223 |
| 2. 論文標題 In situ molecular vibration insights into the antibacterial behavior of silicon nitride bioceramic versus gram-negative Escherichia coli | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy | 6. 最初と最後の頁 117299 ~ 117299 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.saa.2019.117299 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Horiguchi S, Adachi T, Rondinella A, Boschetto F, Marin E, Zhu W, Tahara Y, Yamamoto T, Kanamura N, Akiyoshi K, Pezzotti G, Mazda O | 4. 巻 99 |
| 2. 論文標題 Osteogenic response of mesenchymal progenitor cells to natural polysaccharide nanogel and atelocollagen scaffolds: A spectroscopic study | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C | 6. 最初と最後の頁 1325 ~ 1340 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2019.02.043 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Takizawa S, Yamamoto T, Honjo K, Sato Y, Nakamura K, Yamamoto K, Adachi T, Uenishi T, Oseko F, Amemiya T, Yamamoto Yi, Kumagai W, Kita M, Kanamura N | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 Transplantation of dental pulp derived cell sheets cultured on human amniotic membrane induced to differentiate into bone | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Oral Diseases | 6. 最初と最後の頁 1352 ~ 1362 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13096 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Pezzotti G, Marin E, Zanocco M, Boschetto F, Zhu W, McEntire BJ., Bal BS, Adachi T, Yamamoto T, Mazda O | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Osteogenic Enhancement of Zirconia-Toughened Alumina with Silicon Nitride and Bioglass? | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Ceramics | 6. 最初と最後の頁 554 ~ 567 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ceramics2040043 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 7件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sato Y, Yamamoto K, Nakai K, Oseko F, Hasegawa A, Kishida T, Mazda O, Yamamoto T, Kanamura N. |
| 2. 発表標題 Osteoblast-like cells transplantation treatment of large scale bone defect using direct reprogramming technique and 3D scaffold. |
| 3. 学会等名 13th Asian Congress of Oral & Maxillofacial Surgery (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yamamoto T, Adachi T, Horiguchi S, Pezzotti G, Kanamura N. |
| 2. 発表標題 Fast and highly spatially resolved detection of early dental caries by spectrally resolved Raman spectroscopy for Special Needs Patients. |
| 3. 学会等名 24th International Association for Disability and Oral Health Congress, 31 August-2 September 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yamamoto T, Adachi T, Horiguchi S, Rondinella A, Boschetto F, Marin E, McEntire BJ, Bock R, Mazda O, Kanamura N, Pezzotti G. |
| 2. 発表標題 Development of a SiYAlON glaze for improved osteoconductivity of dental implants. |
| 3. 学会等名 96th General Session & Exhibition 2018 of the IADR (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Adachi T, Horiguchi S, Amemiya T, Yamamoto T, Kanamura N, Pezzotti G. |
| 2. 発表標題 Detection of early dental caries by spectrally resolved Raman spectroscopy. |
| 3. 学会等名 96th General Session & Exhibition 2018 of the IADR (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sato Y, Yamamoto K, Nakai K, Oseko F, Kishida T, Mazda O, Yamamoto T, Kanamura N. |
| 2. 発表標題 Establishment of bone regeneration therapy by direct conversion using rat fibroblasts. |
| 3. 学会等名 40TH Asia Pacific Dental Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 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. |
| 2. 発表標題 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. |
| 3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Adachi T, Yamamoto T, Amemiya T, McEntire BJ, Bal BS, Mazda O, Kanamura N, Pezzotti G. |
| 2. 発表標題 Application of Silicon Nitride Ceramics Stimulate Bone Regeneration in Dental Implants. |
| 3. 学会等名 The 2017 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Amemiya T, Adachi T, Asai T, Adachi K, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N |
| 2. 発表標題 Human Periosteal-derived Cell Sheets Cultured on Amniotic Membrane Substrate |
| 3. 学会等名 The 2017 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 松田 修 (Mazda Osam) (00271164) | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303) | |
| 研究分担者 | 足立 哲也 (Adachi Tetsuya) (10613573) | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303) | |
| 研究分担者 | P E Z Z O T T I G . (Pezzotti Giuseppe) (70262962) | 京都工芸繊維大学・材料化学系・教授 (14303) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|--|---|----|
| 研究 分担者 | 金村 成智 (KANAMUR Narisato) (70204542) | 京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授 (24303) | |
| 研究 協力者 | 秋吉 一成 (Akiyoshi Kazunari) (90201285) | 京都大学・工学研究科・教授 (14301) | |