

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09640

研究課題名(和文) 直接誘導骨芽細胞の疾患モデル動物への応用

研究課題名(英文) Application of directly converted osteoblasts to disease model animals

研究代表者

滝沢 茂太 (Takizawa, Shigeta)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70793082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、線維芽細胞から目的細胞へ直接誘導する技術が報告されており、我々もこれまでに線維芽細胞から骨芽細胞へのダイレクト・リプログラミングに成功してきている。しかし、単に誘導骨芽細胞を注入するだけでは、大規模な骨欠損に対しては十分な効果は得られないことが多い。そこで適切なスキャフォールドを開発し、そのスキャフォールド上で、骨芽細胞への3Dダイレクト・リプログラミングを行い、移植することで効果的な新規骨再生療法を開発することを目的とした。本研究の結果、シート型架橋ナノゲル上で線維芽細胞より骨芽細胞を直接誘導しえるとともに、骨欠損モデルマウスに移植することで顕著な骨再生を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性で治療方法が確立されていない大規模骨欠損および炎症性骨欠損障害が、患者の線維芽細胞を用いて体外で骨芽細胞移植によって再生し、治療効果が認められれば、有用である。

研究成果の概要(英文)：In recent years, techniques for direct reprogramming from fibroblasts to target cells have been reported, and we have succeeded in direct reprogramming from fibroblasts to osteoblasts. However, simply injecting induced osteoblasts is often not sufficient for large bone defects. Therefore, we aimed to develop a novel and effective bone regeneration therapy by developing an appropriate scaffold, performing 3D direct reprogramming of osteoblasts on the scaffold, and transplanting them.

The results of this study showed that osteoblasts could be induced directly from fibroblasts on a sheet-type cross-linked nanogel, and that significant bone regeneration was observed when transplanted into a bone defect model mice.

研究分野：歯科口腔科学

キーワード：ダイレクト・リプログラミング 骨芽細胞 スキャフォールド 再生療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顎骨腫瘍手術後の大規模骨欠損や歯周病に伴う歯槽骨吸収による歯牙喪失は、QOL (quality of life) を著しく低下させる。近年、線維芽細胞から目的細胞へ直接誘導する技術 (ダイレクト・リプログラミング) が報告され、申請者らのグループも、これまでにヒト線維芽細胞から機能的な骨芽細胞への直接誘導を報告してきている。

しかしながら、実際に再生医療を必要とするような骨疾患では、大規模骨欠損であることが多く、その場合誘導した骨芽細胞を移植するだけでは不十分だと考えられ、骨芽細胞と一緒に移植可能な適切なスキャフォールドの開発が望まれる。

上記の骨再生治療により骨欠損部の回復が認められれば、歯科分野の枠を超えて、関節リウマチなどの炎症性の骨疾患や大規模骨欠損に対して大きなインパクトを与えたと考えた。

2. 研究の目的

ダイレクト・リプログラミング技術を用いて誘導した骨芽細胞を用いて大規模骨欠損にも対応しえる効果的な新規骨再生医療の確立を目指すことを本研究の目的とした。

その目的を達成するために、本研究では、我々の研究グループが独自に開発した架橋ナノゲルを足場として用い、その架橋ナノゲル上でヒト線維芽細胞から骨芽細胞へ 3D ダイレクト・コンバージョンを試みるとともに、その架橋ナノゲル誘導骨芽細胞複合体を人為的骨欠損モデルマウスに移植し、骨再生の評価を行った。

3. 研究の方法

：架橋ナノゲル上での遺伝子導入による骨芽細胞の 3D ダイレクト・リプログラミング

pMX puro ベクターに、骨芽細胞関連遺伝子およびリプログラミング関連遺伝子の cDNA をそれぞれ組み込んだコンストラクトを pCMV.VSV-G とともに p1at GP 細胞に導入する。そこから産生されるレトロウイルス粒子を線維芽細胞へ感染させ、架橋ナノゲル上に播種しなおした後に骨分化誘導培地で培養し、骨芽細胞への 3D ダイレクト・リプログラミングを図る。

架橋ナノゲル上での細胞増殖と細胞接着を WST assay およびアクチン染色にて評価する。そして得られた架橋ナノゲル誘導骨芽細胞複合体から RNA 抽出を行い、qPCR にて骨芽細胞関連遺伝子の発現を評価するとともに、架橋ナノゲル誘導骨芽細胞複合体の Alizarin Red S 染色を行い、骨芽細胞への誘導を評価する。

：上記架橋ナノゲル誘導骨芽細胞複合体の骨再生の評価

SCID ^{-/-} マウスの大腿骨を削合し、骨髄を除去して骨幹部の骨を欠損させる。この欠損部に、上記で得られた架橋ナノゲル誘導骨芽細胞複合体を移植する。対照群として、架橋ナノゲルのみ移植した群と、元の線維芽細胞を架橋ナノゲルに播種して移植した群を作成する。

移植後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と骨密度を評価する。また移植部の組織切片を作成して HE と Alizarin red S 染色を行う。

：シート型架橋ナノゲルの開発と小分子化合物を用いた骨芽細胞への 3D ダイレクト・リプログラミング

上記で作成した架橋ナノゲルはファイバー型であったが大規模骨欠損に対応するには、シート

型の架橋ナノゲルが望ましい。そこで新たにシート型の架橋ナノゲルを作成し、従来のファイバー型ナノゲルと比較評価を行う。また臨床応用を考慮した際には、遺伝子導入を用いない骨芽細胞の誘導が望ましい。そのため、我々が見出した骨芽細胞にダイレクト・リプログラミングしえる小分子化合物を用いて、ファイバー型およびシート型架橋ナノゲル上で芽細胞への3Dダイレクト・リプログラミングを図る。

ファイバー型およびシート型架橋ナノゲルに線維芽細胞を播種し、小分子化合物を含む骨芽細胞誘導培地で培養する。得られた架橋ナノゲル誘導骨芽細胞複合体からRNA抽出を行い、qPCRにて骨芽細胞関連遺伝子の発現を評価するとともに、架橋ナノゲル誘導骨芽細胞複合体のAlizarin Red S染色を行い、骨芽細胞への誘導を評価する。

4. 研究成果

本研究の結果、シート型架橋ナノゲル上で線維芽細胞より骨芽細胞を直接誘導しえるとともに、骨欠損モデルマウスに移植することで顕著な骨再生を認めた。本研究結果は、大規模骨欠損に対する効果的な治療法になる可能性を秘めていると期待される。

(研究方法に対する結果)

架橋ナノゲル上での遺伝子導入による骨芽細胞の3Dダイレクト・リプログラミング

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・ナノゲルを使用し、大規模骨欠損の回復を目的に検討を行った。ヒト線維芽細胞に遺伝子を導入し、多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲル孔内部に進展接着させた。

上記架橋ナノゲル誘導骨芽細胞複合体の骨再生の評価

カルセイン染色、アクチン-ヘキスト染色 Alizarin Red S 染色、RealtimeRT-PCR を行い、細胞との接着、骨分化および骨回復を確認した。

シート型架橋ナノゲルの開発と小分子化合物を用いた骨芽細胞への3Dダイレクト・リプログラミング

大規模骨欠損の回復を目的に、足場材料としてシート状の多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲルを新たに開発し、その上でヒト線維芽細胞から骨芽細胞への3Dケミカルダイレクト・コンバージョンを行い検討した。3種類の足場(シート状およびファイバー状多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲル、アテロコラーゲン)をラマン分光法解析した結果、分子構造の違いを認めた。各足場材料にヒト線維芽細胞をそれぞれ播種し、小分子化合物であるTGF- β 阻害剤(ALK5iII)を添加/非添加した骨分化誘導培地で3次元培養を行い、Alizarin Red S染色、Real time RT-PCR、ATR-FTIR解析を行い、多孔性架橋ハイブリッド・ナノゲル上での高い石灰化基質産生と骨分化、生体適合性の高い骨質形成を確認した。以上の結果より、本技術は、骨髄炎や骨腫瘍摘出後の骨欠損等に対する新規骨再生医療の基盤技術になり得ることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto T, Takizawa S, Otsubo M, Ema R, Oyabu M, Sato Y, Nakao E, Matsuzawa N, Adachi T, Adachi K, Oseko F, Yamamoto Y, Kanamura N.	4. 巻 29
2. 論文標題 Clinical study of anti-resorptive agents-related osteonecrosis of the jaw in prostate cancer patients using the bone-modifying agents injection in our hospital.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本有病者歯科医療学会雑誌	6. 最初と最後の頁 298-303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Sato Yoshiki, Yamamoto Kenta, Horiguchi Satoshi, Tahara Yoshiro, Nakai Kei, Kotani Shin-ichiro, Oseko Fumishige, Pezzotti Giuseppe, Yamamoto Toshiro, Kishida Tsunao, Kanamura Narisato, Akiyoshi Kazunari, Mazda Osam	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 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2019
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 Shigeta, Yamamoto Toshiro, Honjo Ken Ichi, Sato Yoshiki, Nakamura Koya, Yamamoto Kenta, Adachi Tetsuya, Uenishi Toshihiro, Oseko Fumishige, Amemiya Takeshi, Yamamoto Yoshiaki, Kumagai Wataru, Kita Masakazu, Kanamura Narisato	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 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 Nakai Kei, Yamamoto Kenta, Kishida Tsunao, Kotani Shin-ichiro, Sato Yoshiki, Horiguchi Satoshi, Yamanobe Hironaka, Adachi Tetsuya, Boschetto Francesco, Marin Elia, Zhu Wenliang, Akiyoshi Kazunari, Yamamoto Toshiro, Kanamura Narisato, Pezzotti Giuseppe, Mazda Osam	4. 巻 9
2. 論文標題 Osteogenic Response to Polysaccharide Nanogel Sheets of Human Fibroblasts After Conversion Into Functional Osteoblasts by Direct Phenotypic Cell Reprogramming	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 2021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2021.713932	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 滝沢茂太, 大迫文重, 中尾恵理子, 足立圭司, 山本俊郎 金村成智.
2. 発表標題 X線透視装置を用いて下顎骨異物除去を施行した1例.
3. 学会等名 第51回日本口腔外科学会近畿支部学術大会（京都）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 滝沢茂太, 大迫文重, 伊藤 大, 中尾恵理子, 足立圭司, 山本俊郎, 金村成智.
2. 発表標題 当大学附属病院における口腔ケア・ドライマウス外来の現状.
3. 学会等名 第65回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会（愛知）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中井 敬, 大迫文重, 佐藤良樹, 滝沢茂太, 足立圭司, 山本俊郎, 金村成智.
2. 発表標題 -クリプトキサンチンの口腔粘膜由来線維芽細胞への抗細胞障害作用の検討.
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会総会・学術大会（新潟）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩井浩明, 山本俊郎, 伊藤 大, 高松美香, 佐藤良樹, 白杉迪洋, 滝沢茂太, 足立圭司, 大迫文重, 金村成智
2. 発表標題 口腔内環境とHelicobacter pylori菌感染との関連.
3. 学会等名 第29回日本有病者歯科医療学会総会・学術大会（兵庫）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大迫文重, 山本俊郎, 宮垣有希, 大坪牧子, 滝沢茂太, 足立圭司, 西垣 勝, 雨宮 傑, 金村成智.
2. 発表標題 当科での周術期抗菌薬適正使用の取り組みについて.
3. 学会等名 第29回日本有病者歯科医療学会総会・学術大会(兵庫), 2020/7/18, 19.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 滝沢 茂太、山本 俊郎、足立 哲也、大迫 文重、雨宮 傑、金村 成智
2. 発表標題 ヒト羊膜上培養歯髓由来細胞シートの移植による新規骨再生医療の開発
3. 学会等名 日本炎症再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝沢茂太、大迫文重、中尾恵理子、足立圭司、山本俊郎、金村成智
2. 発表標題 歯牙腫摘出術を施行したNoonan 症候群の一例
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	足立 哲也 (Adachi Tetsuya) (10613573)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師 (24303)	
研究分担者	山本 俊郎 (Yamamoto Toshiro) (40347472)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師 (24303)	
研究分担者	佐藤 良樹 (Sato Yoshiki) (50808235)	京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医 (24303)	
研究分担者	金村 成智 (Kanamura Narisato) (70204542)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関