

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月20日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659259

研究課題名（和文） 成育医療における骨・靭帯の生分解性足場材料の解析と  
融合蛋白質の創製研究課題名（英文） Custom-shaping system for bone regeneration by seeding  
marrow stromal cells

研究代表者

川北 敦夫（KAWAKITA ATSUO）

独立行政法人国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部 共同研究員

研究者番号：40338083

研究成果の概要（和文）：再生治療において細胞、培養担体および成長因子は組織再生のための必須要素である。このうち、培養担体は細胞が生着するための足場であるとともに、形態を維持するための骨格として重要な鍵となっている。生体吸収性材料である合成高分子に、細胞親和性に富むコラーゲンを複合化した培養担体を用いて骨再生治療に対する組織工学的アプローチを行った。特に細胞外マトリックスの代表的な細胞接着タンパクであるファイブロネクチンの持つコラーゲンへの高い結合性に注目しその有用性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cytokines have been shown to promote regeneration in tissues. In addition, scaffold is required to maintain tissue organization and keep cytokines at target sites. In this study, we generated biodegradable hybrid sheets (poly-DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) sheets) with collagen microsponges. PLGA skeleton facilitates the formation of the hybrid sheets into desired shapes, and the collagen microsponges promote adhesion of the chimeric protein that is composed of cytokines and collagen binding domain of fibronectin. The chimeric protein clearly functioned in vivo, implying that PLGA sheets with chimeric cytokines show promise for use as a tool for the development of therapeutic applications.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	600,000	0	600,000
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：成育医学

## 1. 研究開始当初の背景

骨組織の維持・再生に関する研究へ社会的注目が集まるようになって久しい。先天性・後天性の難治性骨欠損に加え加齢・閉経によ

る骨粗鬆症、炎症性疾患による骨形成能低下など骨組織の再生医療が待ち望まれている疾患が多々存在する。近年、再生医学研究より組織構成要素である細胞が治療材料となり

得る可能性が示されている。しかし、臨床応用のためには移植細胞のコントロール、移植方法の確立といった問題を解決する必要がある。

再生治療において細胞、培養担体および成長因子は組織再生のための必須要素である。このうち、培養担体は細胞が生着するための足場であるとともに、形態を維持するための骨格として重要な鍵となっている。我々はこれまでに骨髄中に存在する骨髄間質細胞の秘めた多分化能を明らかとし、生体吸収性材料である合成高分子に細胞親和性に富むコラーゲンを複合化した培養担体を用いて骨再生治療に対する組織工学的アプローチの提言を行ってきた。この培養担体は高い細胞保持性を有し、かつ生体内における形状保持性を有している優れたものではあるが、細胞の分化・成熟に必要なもうひとつの要素である成長因子は、外来よりの添加に頼らざるを得ない。

しかし、液性である成長因子を局所に止めることはできず、有効濃度を得るための大量投与はコストパフォーマンスが悪いばかりか望まない効果を誘発する可能性がある。この成長因子をいかに効率的に局所にとどめて薬物送達システムとして機能させることができるかが、再生医療成否のもうひとつの鍵である。我々は細胞外マトリックスの代表的な細胞接着タンパクであるファイブロネクチンの持つコラーゲンへの高い結合性に注目した。

## 2. 研究の目的

再生足場材料を用いた骨再生の研究は、1988年 Maniopoulos らは、デキサメタゾン等を含む培地でのラット骨髄細胞を培養することにより骨様組織が形成されることを報告したのが最初である。同組織に細胞外マトリックス産生、骨芽細胞活性を同定した。さらに無機人工骨とともに骨髄間質細胞を培養することにより人工骨内の多孔質内に培養骨が形成され、動物実験においても移植後1週間で有意な骨形成を生ずることを明らかにとした。ヒト骨髄間葉系細胞においても同様にヌードマウスへの移植において同様の骨形成能が検証されている。しかしながらヒト骨髄間葉系細胞は、現在までの方法では必要な量の細胞数を得るには至らず、広範な欠損に対する再建や骨粗鬆症、慢性関節リウマチに代表される自己の骨再生能の低下した患者に対する治療法としての限界があった。間葉系細胞を用いることで、目的の組織に関する機能を賦活させる再生誘導治療法は再生医療の一つと考えられている。間葉系細胞は高い増殖能・自己複製能と部分全能性の性質を合わせ持ち、細胞補充療法のための移植デバイスとしても注目されている。骨

疾患は日常生活を営む上で誰にでも起こりうるものである。インテリジェント骨再生足場材料を用いた細胞移植を行うことで、骨疾患が治癒する可能性を見出す本申請は、新規性が極めて高く、斬新性・チャレンジ性は極めて高い。

## 3. 研究の方法

### (1) コラーゲン複合化合成高分子シートの作製

生体吸収性合成高分子であるポリグリコール酸-ポリ乳酸共重合体(PLGA)からなるニットメッシュにアテロ化コラーゲンのマイクロスポンジを真空凍結乾燥法にて複合化させグルタルアルデヒド架橋を行う。メッシュの空隙をコラーゲンの網目で覆うことで細胞に対する親和性と表面積の増大を計る。

### (2) キメラタンパクの作製

ヒト正常細胞に発現するファイブロネクチンの mRNA を鋳型として増幅させた相補的 DNA 遺伝子配列の中から既知であるコラーゲン結合領域の遺伝子配列(約1000塩基)を酵素処理にて切り出す。同様に正常ヒト胎盤由来 mRNA を鋳型として骨形成タンパク BMP-4 の成熟型遺伝子配列(約400塩基)を抽出し、両者を連結したタンパク発現ベクターを作製する。大腸菌内に両遺伝子配列からキメラタンパクを合成させ抽出・精製を行う。

### (3) シートへの組み換えタンパク複合化

(1)にて作製したシートを、キメラタンパク溶液に浸漬することでコラーゲンマイクロスポンジ上へのタンパク複合化を得る。

## 4. 研究成果

本研究においてマウス骨髄から多分化能を有する細胞株を数種樹立した。樹立した細胞は、興味深い表現形質を示した。同細胞は、通常線維芽細胞の形態をとり増殖するが、誘導により骨細胞としての形質が明瞭となり *in vivo* にて骨を形成する。同細胞は従来報告されてきた骨芽細胞とは全く異なり、成熟した骨細胞へ分化しうる。その骨細胞への分化は不可逆的であり、再現性が高いシステムであることを証明した。またこの分化過程が誘導剤を必要としないこと、しかしながら誘導剤により骨組織としての機能的なマーカーの上昇が顕著になることを明確にした。骨形成のマスター遺伝子である転写因子の発現も認められ、骨細胞としての性質は明らかである。この KUSA-A1 細胞とともに本研究で用いる生分解性ポリマーを足場として、骨折、偽関節の細胞治療のマウスモデルを作成し良好な結果を得ることができた。同様に、ヒト骨髄間質から増殖能力の高い細胞を数種

分離培養に成功し、それらの細胞をヘリックス研究所との共同研究により全長 cDNA レベルでのプロファイルを明らかとした。また、シート上のキメラタンパク局在は生体外にて免疫組織学的に評価するとともに培養液中へのタンパク放出程度をファイブロネクチンの継時的な ELISA 法により推定した。キメラ化 BMP-4 の機能確認は培養未分化骨髄間質細胞へのキメラタンパクの添加および複合化シートへの細胞播種実験により、骨分化マーカー遺伝子の発現、alkaline phosphatase 活性の定量にて行った。さらにこの複合化シートを単独または未分化骨髄間質細胞を播種した状態で免疫不全マウス (NOD/SCID/IL-2 ノックアウトマウス) へ移植し、骨への分化、骨再生方法を検討した。最終的には骨髄間質細胞を開発した骨再生足場材料に播種し、疾患モデルマウスへ移植することで、疾患の治療に有効であるか評価を行った。今後の課題として、細胞および足場の製剤化を視野に、臨床応用に対して医薬品 GCP (平成 9 年厚生省令第 28 号「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」と等しいレベルでの科学性および倫理性を確保する検討を行い、臨床プロトコールの選択肢の一つとなるべく検討を重ねていく必要がある。

5. 主な発表論文等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川北 敦夫 (KAWAKITA ATSUO)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・  
生殖・細胞医療研究部・共同研究員  
研究者番号：40338083

### (2) 研究分担者

梅澤 明弘 (UMEZAWA AKIHIRO)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・  
生殖・細胞医療研究部・部長  
研究者番号：70213486

戸山 芳昭 (TOYAMA YOSHIAKI)  
慶應義塾大学・医学部・病院長 (教授)  
研究者番号：40129549  
(H21)

加藤 達夫 (KATO TATSUO)  
国立成育医療研究センター (研究所)・  
総長  
研究者番号：50051826  
(H21)

豊田 雅士 (TOYODA MASASHI)  
(地独) 東京都健康長寿医療センター・  
研究副部長  
研究者番号：50392486  
(H23)