

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03059

研究課題名（和文）機能性オルガノイド作製・局所送達プラットフォーム構築による運動器再生法の創出

研究課題名（英文）Development of Musculoskeletal Regeneration Techniques through the Construction of a Platform for Functional Organoid Fabrication and Local Delivery

研究代表者

内田 健太郎（Uchida, Kentaro）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：50547578

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、機能性幹細胞オルガノイドの創生・送達プラットフォームの構築を目指し、確研究を行った。その結果、局所硬化ゲルを用いてBMP-2を導入した人工骨を移植することで骨形成が促進されること、オルガノイドサイズに応じて特定の栄養因子遺伝子の発現が増加することを明らかにした。さらにも、コラーゲン結合親和性が高く、細胞増殖活性を有するbFGF pep-cCMPの作製に成功した。さらに、オルガノイド/bFGF複合体は新生骨形成を有意に増加させ、オルガノイドとbFGFの相互作用が骨形成を促進することを明らかにした。これらのシーズは運動器再生に有用な新しい治療法になるかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、運動器再生治療のための新しいアプローチを確立し、局所硬化ゲルとオルガノイド技術を組み合わせることで骨形成を促進する方法を開発した。さらに、オルガノイドのサイズによる栄養因子産生の増加を明らかにし、幹細胞オルガノイドの有効な送達プラットフォームを確立した。本技術は、外傷や骨折による運動器障害に対する新しい治療法となる可能性を秘めており、患者のQOL向上や早期の社会復帰に大きく役立つと考えられる。また、治療期間の短縮や医療費の削減が可能となり、医療経済的にも大きなメリットをもたらすと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to construct a platform for the creation and delivery of functional stem cell organoids. As a result, we demonstrated that bone formation is promoted by implanting artificial bone with BMP-2 introduced via a local hardening gel. We also clarified that the expression of specific nutrient factor genes increases according to the size of the organoids. Additionally, we successfully developed bFGF pep-cCMP, which has high collagen binding affinity and cell proliferation activity. Furthermore, the organoid/bFGF complex significantly increased new bone formation, revealing that the interaction between the organoid and bFGF promotes bone formation. These findings suggest that these seeds may become new therapeutic methods useful for musculoskeletal regeneration.

研究分野：整形外科

キーワード：オルガノイド 環状コラーゲン結合ペプチド 運動器再生 成長因子 局所送達

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷による骨折、関節機能の破綻、末梢神経障害は日常動作、生活の質の低下のみならず精神的苦痛を与える。従って、早期かつ確実性の高い運動器再建法は患者 QOL 上昇、早期離床、社会復帰に必須である。申請者は塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)と細菌性コラーゲナーゼの基質結合ドメイン(CBD)の融合タンパク質(bFGF-CBD)とコラーゲン材料を組み合わせることで間葉系幹細胞による骨形成を促進できることを明らかにした。さらに、Arkansas 大学との国際共同研究を展開し、tandem CBD (CBD-CBD)と bFGF のコンジュゲート(bFGF-CBD-CBD)を作製することでコラーゲン親和性と骨形成促進能を向上させることに成功した。さらに、間葉系幹細胞(MSC)をコラーゲンシート上で積層させることで栄養因子 (bFGF, BMP-2, VEGF)の発現が向上すること、bFGF-CBD を結合させることで骨形成を促進できることを示した。しかしシーズ実用化に向けては融合タンパクのコラーゲン結合性の向上と徐放特性の改善が必須であると考えられた。また、シート状の MSC は移植する際に傷害部局所の展開が必要であった。

他方、共同研究者はオルガノイド作製技術を確立し、種々の細胞を組み合わせることで唾液腺、肝組織を *in vitro* で構築することに成功した。また、コラーゲンミメティックペプチド (CMP) の分子デザインを改変することにより tandem CBD の解離定数が $10 \mu\text{mol}$ オーダーであるのに対し 10nmol オーダーという高い親和性でコラーゲンと結合する環状コラーゲンミメティックペプチド(cCMP)の作製に成功した。さらに、局所投与可能なゲル状材料の利点と局所滞留性に優れるシート状材料の利点を併せ持つ新規材料を開発すべく産学連携で研究開発を行った結果、種々の材料(ヒアルロン酸、デキストラン、ヘパリン、プルラン)に天然由来架橋基を導入後、酵素試薬と混合することで局所投与後に骨欠損部で硬化する新規ゲル剤の開発に成功した。しかし、運動器再生シーズとしての有用性は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では上記技術を統合して機能性幹細胞オルガノイドの創生・送達プラットフォームを作製する。運動器傷害モデルに供することにより、従来シーズを凌駕する運動器再生治療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 局所硬化ゲルの最適化

9 週齢雄性 C57BL/6J マウスの大腿骨骨幹部を骨切りし、ステンレス釘で逆行性髄内固定したあと、骨折部を中心に 3mm 幅にわたってパイポラー型電気メスで骨膜を焼灼することで、難治性骨折モデルを作成した。ハイドロキシパタイト(Hap)を BMP-2 溶液に浸漬後、骨折部に投与する群 (BMP-2/Hap)、ヒアルロン酸を主骨格、チラミンを架橋基とし、過酸化水素水と混和することで硬化する局所硬化ゲル(HyA)を用いて BMP-2 を導入した Hap を投与した群 (BMP-2/HyA/Hap) を作製した。骨折部に何も投与しない群をコントロールとして用いた。パタイト)のみを投与した群 (HA 群)、BMP-2 を含有 ($2 \mu\text{g}$) させた局所硬化ヒアルロン酸ゲルを投与した群 (HA+BMP-2 群) を作成した。骨折後 4 週で屠殺して大腿骨を採取後 micro CT を撮影し、骨折部を中心とした 3mm 幅における新生骨量 (BV)、骨塩量 (BMC) を測定した。また、骨折部の骨癒合率を評価した。また、ヘマトキシリンエオジン染色による組織学検討を行った。また、bFGF との親和性が高い局所硬化ゲルを開発するために、局所硬化ゼラチンゲルを作製し、その作用を検討した。

3-2. 最適なオルガノイド培養条件の検討

オルガノイドサイズによる栄養因子産生増加を明らかにするために、MSC を細胞非接着性プレートに播種、培養後、RNA-Seq を施行した。また、また、MSC を細胞非接着性プレートに 5×10^4 (S 群)、 5×10^5 (M 群)、 5×10^5 個播種し、オルガノイドサイズが栄養因子発現に及ぼす影響を検討した。

3-3. 次世代 cCMP の開発

これまで開発した cCMP (cCMP7(S-S))は一本鎖 CMP と比較し 100 倍程度の変性コラーゲン結合性を有していたが、S-S が還元条件下で開裂しやすく、塩基性培養液中で不安定であった。また、N 末端を化学的に安定なアミド結合によって架橋した cCMP(Glu)は 37 では、変性コラーゲンに対する結合親和性が低下するという問題点があった。そこで cCMP(Glu)の変性コラーゲンに対する結合親和性の改善するために図 1 の構造を有する次世代 cCMP を作製し、変性コラーゲンに対する結合能を ELISA 法を用いて評価した。また、高い結合能を有していた cCMP7(SA)と bFGF 模倣ペプチド(bFGF-pep)とのコンジュゲートを作製し、その活性を細胞増殖試験により評価した。

4-2. オルガノイドサイズが栄養因子発現に及ぼす影響

RNA-Seq を用いて単層培養とオルガノイド培養の間で発現レベルを比較したところ、2140 の遺伝子が差異を示し、そのうち 1047 が KUM10 スフェロイドでアップレギュレーションされ、1093 がダウンレギュレーションされていた。これらの中で、12 のアップレギュレートされた遺伝子 (Bmp2, Fgf9, Fgf18, Ngf, Pdgfa, Pdgfb, Tgfb1, Vegfa, Vegfc, Wnt4, Wnt5a, Wnt10a) は分泌性成長因子に関連していた。このうち、Fgf9, Fgf18, Vegfa および Vegfc の発現は L 群で上昇し、Pdgfb および Tgfb1 の発現は S 群で上昇していた (図 4)。

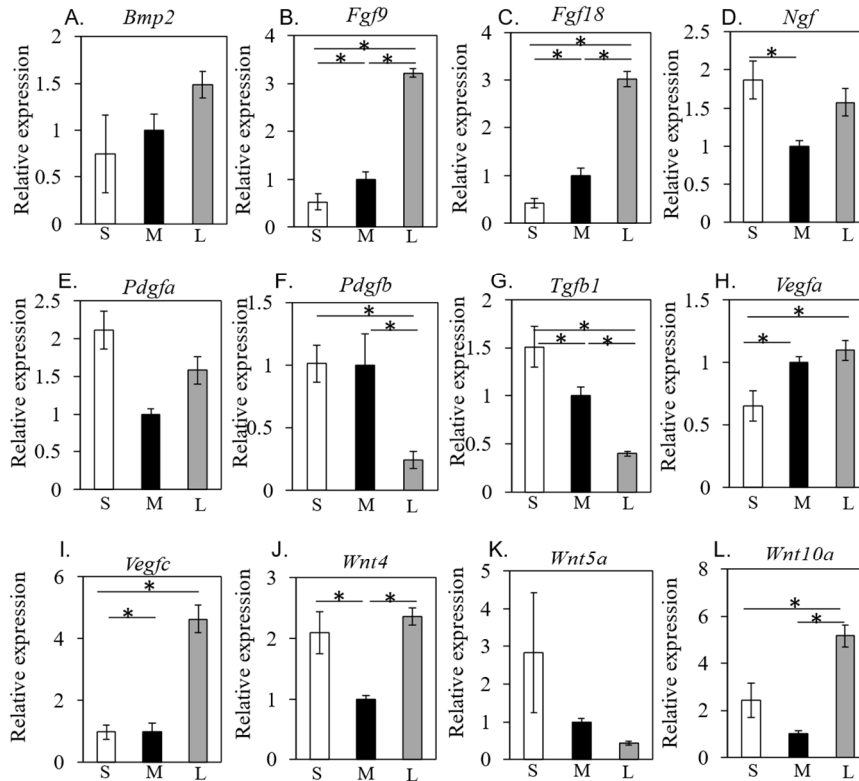


図 4 オルガノイドサイズが栄養因子の発現に及ぼす影響

4-3. 次世代 cCMP の変性コラーゲン結合活性と細胞増殖促進能

cCMP7(SA)はcCMP(Glu)から結合親和性が大きく改善し、cCMP(S-S)と同等になった(図5)。そこで cCMP7(SA)と bFGF pep とのコンジュゲートを作製し、増殖試験を行った。その結果、bFGF pep-cCMP7(SA)は細胞増殖促進活性を示した (図 6)

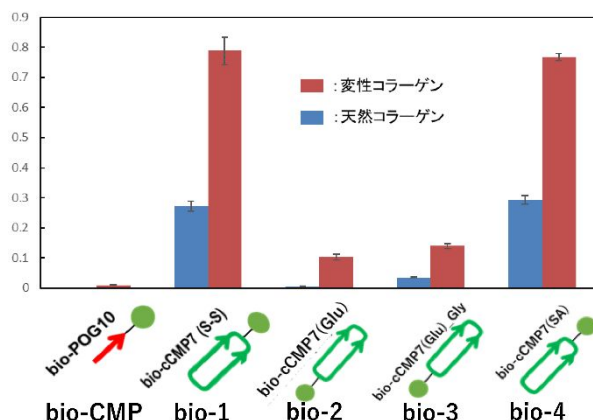


図 5. 変性コラーゲンに対する次世代 cCMP の結合性

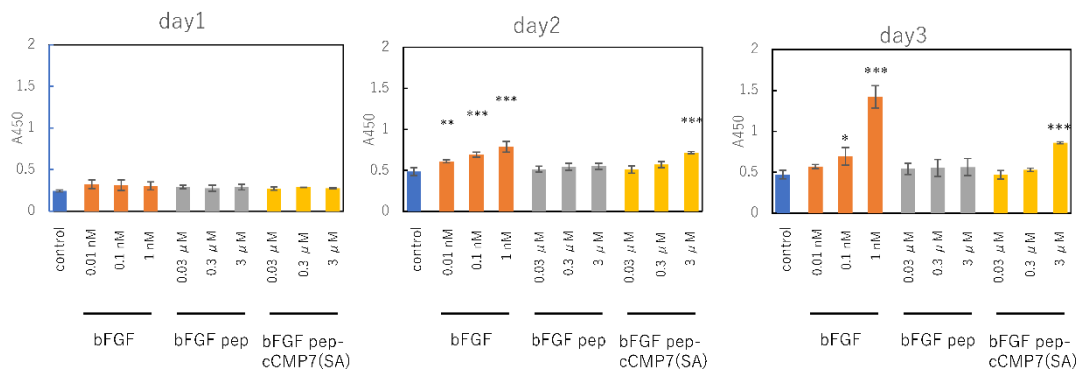


図 6. bFGF pep-cCMP7(SA)の細胞増殖促進活性

3-4. オルガノイド/bFGF 複合体の骨形成作用

Org-bFGF群はコントロール群に比べ有意に新生骨量が多かった(図7)。その骨量増加効果はbFGF群、d-Org群では認められなかった。このことから、Orgが産生する液成因子とbFGFの相互作用により骨形成が促進されるものと考えられた。

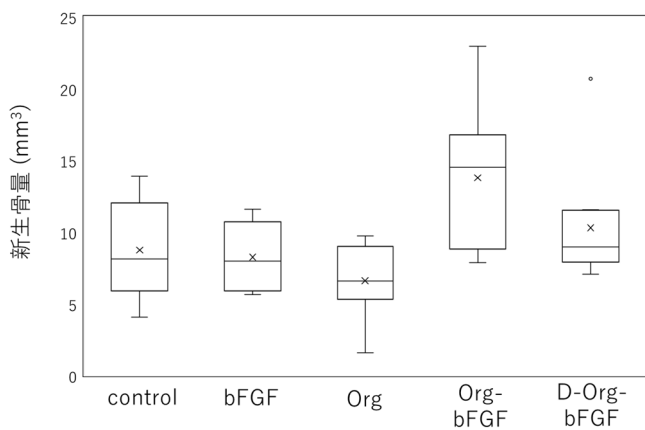


図 7. オルガノイド/bFGF 複合体の骨形成作用

機能性幹細胞オルガノイドの創生・送達プラットフォームの作製に成功した。本シーズは運動器再生に有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Shoji S, Uchida K, Tazawa R, Saito W, Kuroda A, Sekiguchi H, Ishii D, Inoue S, Inoue G, Takaso M	4. 巻 32
2. 論文標題 Acceleration of bone formation using in situ-formed hyaluronan-hydrogel containing bone morphogenetic protein-2 in a mouse critical size bone defect model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio-Med Mater Eng	6. 最初と最後の頁 207-215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/BME-201172	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 Saito H, Shoji S, Kuroda A, Inoue G, Tazawa R, Sekiguchi H, Fukushima K, Miyagi M, Takaso M	4. 巻 34
2. 論文標題 In situ-formed hyaluronan gel/BMP-2/hydroxyapatite composite promotes bone union in refractory fracture model mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bio-Med Mater Eng	6. 最初と最後の頁 537-544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/BME-230021	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 Kuroda A, Mineo A, Shoji S, Inoue G, Saito W, Sekiguchi H, Takaso M, Uchida K.	4. 巻 34
2. 論文標題 Effect of spheroid size on gene expression profiles of a mouse mesenchymal stem cell line in spheroid culture	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bio-Med Mater Eng	6. 最初と最後の頁 67-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/BME-221406	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤 広樹, 内田 健太郎, 黒田 晃義, 庄司 真太郎, 宮城 正行, 齋藤 亘, 関口 裕之, 井上 玄, 高相 晶士
2. 発表標題 局所硬化ゲルを用いた人工骨へのBMP-2導入法を用いた難治性骨折治療の有用性に関する検討
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒田 晃義, 内田 健太郎, 峰尾 歩, 庄司 真太郎, 関口 裕之, 齋藤 亘, 井上 玄, 高相 晶士
2. 発表標題 スフェロイドサイズが間葉系幹細胞の栄養因子発現に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 庄司 真太郎, 内田 健太郎, 田澤 諒, 関口 裕之, 井上 玄, 齋藤 亘, 宮城 正行, 黒田 晃義, 高相 晶士
2. 発表標題 BMP-2含有局所硬化ヒアルロン酸ゲルを用いた広範囲骨欠損修復法の有用性
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021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	大鳥 精司 (Ohtori Seiji) (40361430)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	馬淵 洋 (Mabuchi Yo) (50424172)	順天堂大学・大学院医学研究科・特任准教授 (32620)	
研究分担者	小出 隆規 (Koide Takaki) (70322253)	早稲田大学・理工学術院・教授 (32689)	

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	井上 玄 (Inoue Gen) (80594209)	北里大学・医学部・准教授 (32607)	
研究分担者	関口 裕之 (Sekiguchi Hiroyuki) (90547233)	湘南医療大学・臨床医学研究所・研究員 (32728)	
研究分担者	高野 昇太郎 (Takano Shotaro) (10596505)	北里大学・医学部・助教 (32607)	
研究分担者	廣澤 直也 (Hirosawa Naoya) (10882748)	千葉大学・大学院医学研究院・特任助教 (12501)	

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
---------	---------