

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03116

研究課題名(和文) 類骨オルガノイドを用いた革新的造骨再生医療実用化のための研究基盤構築

研究課題名(英文) Development of Osteoid organoid technology for bone regeneration therapy

研究代表者

齋藤 正寛 (Saito, Masahiro)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：40215562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、骨造成を目的とした骨補填材の開発が進み、小規模骨欠損がこの材料で治すことが可能になったが、大型の骨欠損は未だに未解決の状態となっている。研究代表者の開発したヒト歯槽骨から確立したヒト未分化骨芽細胞様細胞(HAOB)は生体内で造骨能力を有していることを報告してきた。そこで本課題では臨床応用を視野にいれた開発を行うため、トレーサビリティーを有する原材料を用いたHAOBの採取プロトコルを開発した。またHAOBはコラーゲンとアパタイトを組み合わせた3次元構造体と組み合わせることで、立体的な造骨を誘導することを見出した。この結果よりHAOBは骨再生医療等製品として開発できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、急速に進歩を遂げた幹細胞・発生生物学の知見を駆使することで、様々な疾患に対する再生医療の実用化が可能になった。歯科領域においても間葉系幹細胞移植により垂直性骨欠損の再生医療の治療効果は既に確認されている。しかし現存の技術では水平性骨欠損を含む大型の骨欠損の再生には、従来技術における宿主の自己再生能力に期待する技術では困難であり、垂直方向に骨造成するための革新的な再生医療の技術開発が必要になる。本課題ではHAOBを用いた臨床応用可能な造骨細胞一足場材の複合体の形成に成功し、また早期に水平性骨欠損部位に垂直方向への造骨を可能にする再生医療等製品として開発される可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In recent years, significant advancements have been made in the development of bone replacement materials for osteogenesis, allowing for the healing of small bone defects. However, large bone defects remain a challenge. Human undifferentiated osteoblast-like cells (HAOB), established from human alveolar bone by the principal investigator, have demonstrated osteogenic potential in vivo.

In this project, we developed a protocol for collecting HAOBs using traceable raw materials, with the aim of progressing towards clinical application. Additionally, we discovered that HAOBs induce three-dimensional osteogenesis when combined with a three-dimensional structure of collagen and apatite. Our results indicate that HAOBs hold significant potential as a bone regenerative medicine product.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：再生医療 骨芽細胞 組織工学 骨生物学 移植治療

1. 研究開始当初の背景

再生医療の概念が 1995 年に提唱されてから 30 年以上経過しているが、大型の骨欠損を再生する医療技術は未だに開発されていない。これまで骨再生医療には骨髓あるいは脂肪組織由来の間葉系幹細胞が用いられてきた。これらの多くは足場に間葉系幹細胞を定着させ骨芽細胞分化誘導を行い移植して造骨を期待する技術開発である。このような間葉系幹細胞を用いた組織工学により垂直性骨欠損に対して早期に治癒を誘導する事は明らかとなり、臨床研究も既に開始されている。また間葉系細胞は免疫反応を調節する抗炎症効果による創傷治癒の促進効果があるため、移植手術における侵襲と骨欠損部位における抗炎症効果で骨再生を導くと考えられている。このように間葉系幹細胞の有用性は示されているもの、この技術では歯科領域において長きに渡り待ち望まれている垂直方向の造骨、すなわち水平性骨欠損における再生効果は認められていない。その理由として造骨には間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化誘導が必要であるが、十分な誘導が出来ていないことが示されており、効率的な分化誘導法、骨芽細胞密度をあげる手法の開発が望まれている。この問題は、近年臨床応用の高まる iPS 細胞、ES 細胞を用いた骨再生医療の実用化研究の足かにもなっている。

そこで研究代表者は水平性骨欠損治療を可能にする骨再生材料の開発を目指して研究開発を行っている。研究代表者の開発した HAOB は自家移植の環境のみで骨形成を誘導し、異種移植、他家移植では骨形成を誘導できないことから、骨芽細胞は間葉系幹細胞と異なり免疫寛容能力はなく、炎症や免疫学的拒絶から隔離した状態で骨形成に必要な環境を整える必要があると推察している。我々はこの HAOB の持つ骨形成能を活かし、自ら積極的に骨造成が出来る移植材料の開発を目指している。

一方、産業技術総合研究所(産総研)マルチマテリアル研究部門の稲垣らは、ポリ乳酸系素材を綿状に加工した生体吸収性移植材料(綿状 PLLA)の開発に成功しており、すでに小規模欠損部位への綿状 PLLA の移植により骨再生が起こることを確認している。我々は綿状 PLLA の持つ骨伝導能と、HAOB が有する造骨能を組み合わせることにより、これまでに成功していない、水平性骨欠損の治療が可能な材料の開発を目指している。

これまでの研究で、HAOB は -TCP と混合し、フィブリン糊で固定した状態で、免疫不全マウスの背部皮下に移植すると異所性骨形成を起こすことが確認されている(Aino et al., Expert Opin Biol Ther, 2014)。しかしながら綿状 PLLA 内に単に増殖させた HAOB を播種した材料では、綿状 PLLA 単独に対して優位に造骨させることは出来ていない。これらの経験から、我々は HAOB を用いて骨形成の原基である類骨を形成させ、移植に用いることで HAOB による造骨促進効果を得られるのではないかと考え、3次元オルガノイド培養法を用いて HAOB を in vitro で細胞凝集体にし、類骨に分化誘導した状態で移植に用いることを考案した。

2. 研究の目的

水平性骨欠損の再生を誘導するために、本研究では膜性骨化を人為的に再現する技術開発計画を立案した。本目的を達成するためには、骨芽細胞に運命決定された細胞の凝集体を形成し、骨芽細胞へ分化後に I 型コラーゲンを中心とする類骨を形成し、石灰化して骨を形成する過程を再現する組織工学技術が必要になる。類骨は骨形成初期に産生される有機質成分であり、骨芽細胞前駆体が骨形成に必要とされる I 型コラーゲンとグライサアミノグリカンを中心とする細胞外マトリックスおよびサイトカインから構成されている。骨芽細胞へ分化すると石灰化を誘導して骨基質を構築し、その後骨細胞、血管新生を誘導し、破骨細胞を動員して骨代謝を起こすと考えられている。類骨の骨に占める割合は 25% であり、骨芽細胞分化が傷害を受けると類骨の形成不全が骨、軟骨の石灰化不全を起こす軟骨形成不全(クル病など)を発症することから、正常な類骨形成が骨再生に重要な役割を果たすと考えられる。そこで本研究では類骨形成までの発生過程を人為的に再現するために、オルガノイドに着目した。オルガノイドは多細胞性の 3次元構造帯で、幹細胞、前駆体細胞を in vitro にて in vivo に近い流れで自発的に組織化を誘導できる培養技術である。この技術はオルガノイド組織工学と呼ばれ、多数のオルガノイドを融合させ、臓器機能不全にも対応できるまでの大きさを作成できるようになっている。この技術を応用し、HAOB を用いて in vitro で類骨まで形成し、移植後に早期に類骨の石灰化を誘導して造骨を図る計画を考えた。

これまで骨芽細胞の研究は主に単相培養で行われてきており、骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスターゼ活性および石灰化、骨芽細胞分化マーカーの発現まで誘導出来る事が報告されている。しかしこの手法で分化誘導した細胞が直接生体内で骨基質を産生した事象は確認できていない。この問題を解決するため、生体内での造骨の起点となる骨化中心となる類骨を HAOB とオルガノイド組織工学を応用して開発し、立体的な造骨を可能にする骨再生医療等製品の開発研究を立案した。本研究は従来の組織工学では不可能であった大型骨欠損に対する革新的な再生医療技術として発展するばかりでなく、これまで不明であった類骨形成を制御する自己組織化機構を中心とする骨の発生学、骨軟化症を含む様々な骨系統疾患の病態機構の解明を in vitro で可能にする新規研究領域として貢献する。

3. 研究の方法

本研究課題では、HAOB を用いた類骨オルガノイドを形成する技術開発を行うために期間内に以下の研究を実施する。

(1) 類骨オルガノイド作製技術の開発

HAOB を用いて類骨形成を誘導できる類骨オルガノイド作製技術の開発と生体内での骨再生能力を確認する。

(2) レギュラトリーサイエンスの確立

類骨オルガノイド再生療法の医師主導治験を目指すため、HAOB の品質管理技術を確立する。具体的には、HAOB の表面マーカーの決定とオルガノイドの規格設定を決定する。

(3) 類骨オルガノイド組織工学の確立

水平性骨欠損における造骨を可能にする類骨オルガノイドに最適な足場材を開発する。

(4) 水平性骨欠損再生医療に対する非臨床proof of conceptの獲得

大型動物であるマイクロミニブタの水平性骨欠損モデルに3で開発した類骨オルガノイド-足場材の複合体を移植し、垂直方向への造骨能力を評価し、非臨床 proof of concept (POC) を獲得する。

4. 研究成果

研究代表者の開発したヒト歯槽骨から確立したヒト未分化骨芽細胞様細胞(HAOB)は生体内で造骨能力を有していることを報告してきた。この研究では免疫不全動物の皮下移植で行って来たが、PLLA との組み合わせで骨形成は見られなかった。そこで現在承認済の材料と組み合わせ HAOB の骨形成を誘導できる材料との組み合わせを解析した。承認されている骨伝導能力を有する補填材について炭酸アパタイト(サイトランス)、ウシ脱灰骨(Bio-Oss)、-TCP(オスフェリオン、セラソルプ)、ハイドロキシアパタイト(ネオボーン)およびポンジ状構造で立体的な造骨を可能にするリフィットデンタルとポナークとHAOBを組み合わせで骨形成を確認した。その結果、HAOB とポナークの組み合わせで骨形成を誘導することができた。しかしこの研究では皮下移植だったため、十分な骨形成を誘導することが出来なかった。そこ効率よく骨形成を誘導できる腎被膜移植でHAOB-ポナークの効果を解析したところ、ポナーク全体に骨形成を誘導することが出来た。

並行してレギュラトリーサイエンスの研究を進めるため、HAOB の臨床応用を視野にいれた細胞培養技術について、トレーサビリティを有する原材料を用いたHAOBの採取プロトコルの作成を行った。その結果、すべて目的に合う材料で作製した培地に関して、再生医療の対象となる40歳以上の10名の患者よりHAOBを採取出来ることを確認した。

これらの結果よりまたHAOBはコラーゲンとアパタイトを組み合わせたスポンジ状の足場と組み合わせることで、立体的な造骨を誘導することを見出し、またHAOBの調整に関しても将来GMP準拠で使用可能な培地で製造できる基盤技術の開発を行うことが出来た。これらの結果よりHAOBは再生医療等製品として開発できる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sato Akiko, Suzuki Shigeki, Yuan Hang, Fahreza Rahmad Rifqi, Wang Xiuting, Nemoto Eiji, Saito Masahiro, Yamada Satoru	4. 巻 24
2. 論文標題 Pharmacological Activation of YAP/TAZ by Targeting LATS1/2 Enhances Periodontal Tissue Regeneration in a Murine Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 970 ~ 970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24020970	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 Umezawa Kouta, Kajiwara Takako, Ishii Kyoko, Hasegawa Tatsuya, Suzuki Shigeto, Nakano Masato, Sawaguchi Mayu, Venkataiah Venkata Suresh, Yahata Yoshio, Ito Koki, Saiki Yoshikatsu, Saito Masahiro	4. 巻 22
2. 論文標題 A case series describing the risk of periodontal disease in Marfan syndrome patients harboring a possible aortic aneurysm or dissection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12903-022-02361-5	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 Takedachi Masahide, Sawada Keigo, Sakura Kazuma, Morimoto Chiaki, Hirai Asae, Iwayama Tomoaki, Shimomura Junpei, Kawasaki Kohsuke, Fujihara Chiharu, Kashiwagi Yoichiro, Miyake Akimitsu, Yamada Tomomi, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Saito Masahiro, Kitamura Masahiro, Murakami Shinya	4. 巻 12
2. 論文標題 Periodontal tissue regeneration by transplantation of autologous adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-11986-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 Nagahashi Taiji, Yahata Yoshio, Handa Keisuke, Nakano Masato, Suzuki Shigeto, Kakiuchi Yusuke, Tanaka Toshinori, Kanehira Masafumi, Suresh Venkataiah Venkata, Saito Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Er:YAG laser-induced cavitation can activate irrigation for the removal of intraradicular biofilm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08963-x	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 Suzuki Shigeto, Venkataiah Venkata Suresh, Yahata Yoshio, Kitagawa Akira, Inagaki Masahiko, Njuguna Mary M, Nozawa Risako, Kakiuchi Yusuke, Nakano Masato, Handa Keisuke, Yamada Masahiro, Egusa Hiroshi, Saito Masahiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Correction of large jawbone defect in the mouse using immature osteoblast-like cells and a 3D polylactic acid scaffold	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgac151	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 Venkataiah Venkata Suresh, Yahata Yoshio, Kitagawa Akira, Inagaki Masahiko, Kakiuchi Yusuke, Nakano Masato, Suzuki Shigeto, Handa Keisuke, Saito Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical Applications of Cell-Scaffold Constructs for Bone Regeneration Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2687 ~ 2687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10102687	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 Yahata Yoshio, Handa Keisuke, Ohkura Naoto, Okamoto Motoki, Ohshima Jun, Itoh Shusaku, Kawashima Nobuyuki, Tanaka Toshinori, Sato Nobuya, Noiri Yuichiro, Hayashi Mikako, Okiji Takashi, Saito Masahiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Autologous concentrated growth factor mediated accelerated bone healing in root-end microsurgery: A multicenter randomized clinical trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 377 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2023.08.006	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Venkataiah Venkata Sureshasa
2. 発表標題 未分化骨芽細胞と三次元高分子足場を用いた再生医療等製品の開発
3. 学会等名 2022年度秋季学術大会 (第157回)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Saito
2. 発表標題 Regeneration of large jaw bone defect in mice using complex of immature osteoblast like cells and three dimensional polylactic acid scaffold with nanoscale architecture
3. 学会等名 STOVITIMDEX (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤正寛
2. 発表標題 ヒト歯槽骨由来未分化骨芽細胞および3次元ポリ乳酸足場材を用いた新規骨再生医療技術の開発
3. 学会等名 日本歯科基礎医学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

骨細胞と足場材による大型顎骨欠損の再生に成功. 新しい骨再生医療技術の開発 https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2022/08/press20220825-02-mcob.html
--

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	稲垣 雅彦 (Inagaki masahiko) (10356488)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員 (82626)	

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	八幡 祥生 (yahata yoshio) (30549944)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	山田 聡 (yamada satoru) (40359849)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	田中 志典 (tanaka yu kinori) (60637958)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

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