

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19577

研究課題名（和文）In situダイレクト・リプログラミングによる新規骨再生治療の開発

研究課題名（英文）Regenerative therapeutics of bone diseases by means of in situ direct reprogramming

研究代表者

松田 修（Mazda, Osam）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：00271164

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：骨粗しょう症、関節リウマチ、変形性関節症などの骨吸収性疾患に対して、骨再生治療が期待されている。我々はダイレクト・リプログラミング（DR）に着目し、機能的な骨芽細胞をヒト線維芽細胞からin vitro DRによって誘導することに成功した。この技術を骨再生医療に応用するためには、移植に適した3D培養骨組織を構築させられる足場材料の開発と、生体内の骨吸収性病変局所で骨芽細胞を他の体細胞から直接誘導する技術の確立等が必要となる。

本研究では、新規足場材料を用いた3D培養骨組織を開発するとともに、骨芽細胞の組織内DRに必要となる基盤技術の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗しょう症、関節リウマチ、変形性膝関節症などの骨吸収性疾患は、罹患者数が極めて多く、運動機能を著しく低下させて、健康寿命を短縮する疾患である。高齢化と相まって、医療資源の消費の観点からも大きな問題であり、有効な骨再生治療が求められている。機能的な骨芽細胞を骨欠損部位に直接供給することが出来れば、失われた骨組織の再生を促進し、種々の骨吸収性疾患に対する効果的な治療法となり得る。

本研究は、骨芽細胞の分化のエピジェネティック制御の分子レベルの理解につながり学術的な意義も大きい。上記のように骨吸収性疾患の治療法の開発に直結する基盤技術を提供する可能性があり、社会的な意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：Bone regenerative therapy may be useful for treatment of patients with bone resorptive diseases including osteoporosis, rheumatoid arthritis, and osteoarthritis. We previously succeeded in directly converting human fibroblasts into functional osteoblasts that may be applicable to novel bone regenerative therapy in the future. To realize effective bone regenerative therapy using the direct conversion (DC) technologies, however, it is also needed to develop a suitable scaffold that can support formation of cultured 3D bone tissue in combination with reprogrammed osteoblasts, as well as a novel technology to induce DC at a bone resorptive lesion.

In this study, we have developed a novel transplantable scaffold that enable directly converted osteoblasts to form 3D bone tissue in culture, while we also tried to obtain data for basic technology that are needed to directly induce osteoblasts from other somatic cells at a bone resorptive tissue.

研究分野：再生医学

キーワード：再生医療 骨疾患 ダイレクト・リプログラミング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨粗しょう症、関節リウマチ、変形性関節症などの骨吸収性疾患は、罹患者数が極めて多く、運動機能を著しく低下させ健康寿命を短縮する疾患である。また高齢化と相まって、医療資源の消費という観点からも大きな問題となっており、有効な骨再生治療が求められている。

間葉系幹細胞(MSC)を骨吸収性疾患の患者から採取して骨欠損部位に移植する細胞移植法は、重症例においても効果が認められると報告されているが、MSCの採取は患者に対する侵襲を伴い、得られる細胞数が不十分であったり骨芽細胞への分化能が低い症例もある。また移植に必要な数のMSCを得るために *in vitro* で培養を続けるうちに、MSCの stemness が低下する症例も多く認められる。そこで我々は、どんな患者からでも安全に採取でき、容易に培養し増殖できる線維芽細胞に特定の組み合わせの遺伝子を導入して、機能的な骨芽細胞へと直接誘導する技術を確立した(*in vitro* ダイレクト・リプログラミング)。また、より簡便な方法であり、移植しても腫瘍化しない細胞を得るために、特定の小分子化合物を添加して線維芽細胞を培養し、骨芽細胞へと誘導する技術も開発した(ケミカル・*in vitro* ダイレクト・リプログラミング)。

しかしながら、骨再生治療の実用化と普及のためには、高い効果に加えてより安全、安価な新技術が必要である。そして効果的な骨再生の実践には、細胞だけでなく、適切な移植用の scaffold も重要であり、その scaffold 上で骨芽細胞をヒト線維芽細胞よりケミカル・*in vitro* ダイレクト・リプログラミングし、得られた 3D 骨組織を直接骨欠損部位に移植することが出来れば効果的であると考えられる。一方で、細胞移植は手術を要し、さらに CPC での細胞培養と高度な品質管理が必要なために煩雑で長時間と高いコストを要することから、機能性細胞を外部で誘導して病変部位局所へ移植する代わりに、目的の細胞を生体内局所で線維芽細胞などから直接誘導することも出来ればさらに望ましいと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ダイレクト・リプログラミングで誘導された骨芽細胞に適した scaffold の開発ならびにこの scaffold を用いた 3D 骨組織の形成を目的とする。さらに *in situ* ダイレクト・リプログラミング技術を確立することを目指した。

本研究の成果は、種々の骨吸収性疾患に対する画期的新治療技術を提供し、多くの患者にベネフィットをもたらすとともに、今後 *in situ* ダイレクト・リプログラミングを骨芽細胞以外のさまざまな組織細胞にも広げるためのプラットフォーム技術を樹立することに繋がると期待される。

本研究で得られる知見は骨芽細胞分化のエピゲノム制御メカニズムの分子レベルでの理解にもつながり、学術的にも大きな意義を有する。また骨吸収性疾患の治療法の開発に直結する基盤技術を提供する可能性があり、社会的な意義も大きい。

3. 研究の方法

Cholesterol-bearing pullulan (CHP)にアクリロイル基を導入し、自己組織化させた CHOPA nanogel を架橋して Nano Click gel を作成した。架橋の際種々のテンプレートを用いることで、fiber type と sheet type の 2 種類の形状のものを作成した。凍結融解と凍結乾燥を行って Nano Clip-FD (Nano crosslinked porous freeze-dried) matrix とした。Fibronectin コーティング後、hydration して NanoClip-FD Gel とした。この 2 種類の Nano Clip-FD Gel および対照群とし

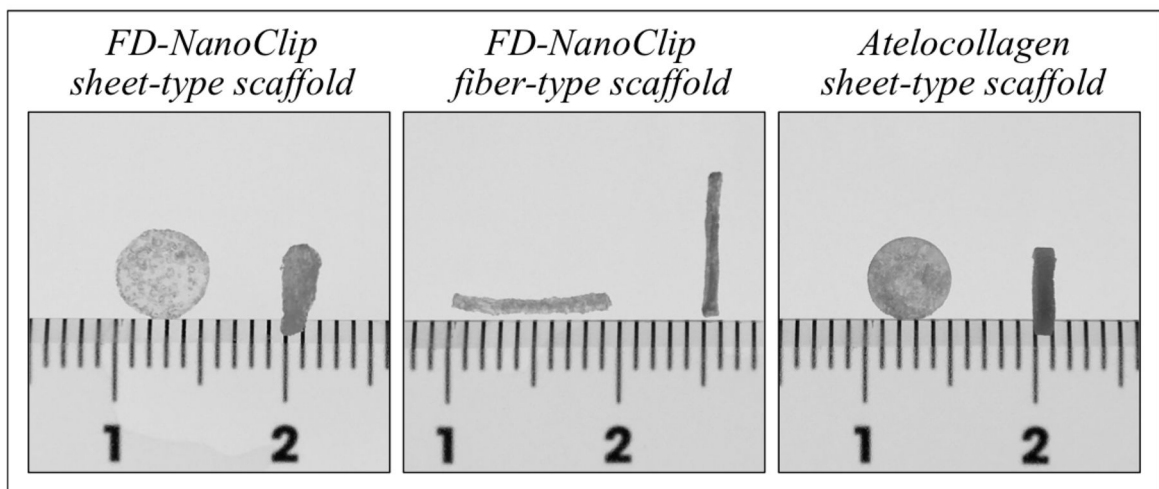
でのアテロコラーゲン上にヒト線維芽細胞を播種し、我々の見出した方法で、骨芽細胞へのケミカル・*in vitro* ダイレクト・リプログラミングを行った。得られたそれぞれの Scaffold-誘導骨芽細胞の複合体（それぞれ FD-NanoClip fiber-dOB 複合体、FD-NanoClip sheet-dOB 複合体、atelocollagen sheet-dOB 複合体）の骨基質形成を Alizarin Red S 染色で、骨質をフーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）を用いて解析した。

生体内局所の体細胞から骨芽細胞を誘導する技術に関する方法は、出願前の特許技術の新規性喪失につながる可能性があるため、現時点で公開できません。

4. 研究成果

既存の atelocollagen と同様な形態で fiber type と sheet type の Nano Clip-FD Gel を作成することが出来た（図 1）。また Alizarin Red S 染色の結果、2 種類の Nano Clip-FD Gel と atelocollagen のうちのいずれの scaffold を用いても我々の誘導手法により 3D 培養中で MEF より骨基質産生能を有する骨芽細胞を誘導可能であり、3D 骨組織複合体を形成することが出来ることが分かった（図 2）。中でも FD-NanoClip fiber-dOB 複合体が最も骨基質産生量が多く、FD-NanoClip sheet-dOB 複合体がこれに次いだ（図 2）。

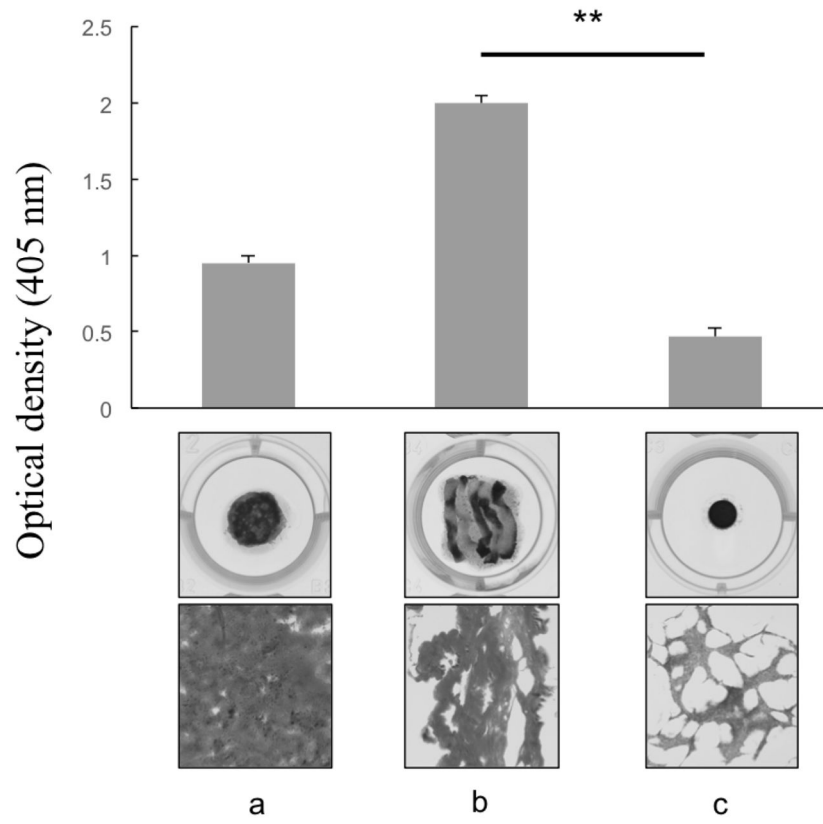
図1: Scaffoldの形状写真



次に得られた各 3D 骨組織複合体の骨質をフーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）を用いて解析した。その結果組織のミネラル化の程度を反映するミネラル対マトリックス比は、FD-NanoClip fiber-dOB 複合体では 0.32、FD-NanoClip sheet-dOB 複合体では 0.2、atelocollagen sheet-dOB 複合体では 0.14 であった。また骨質のもう 1 つのパラメーターである炭酸塩対リン酸塩比は、FD-NanoClip fiber-dOB 複合体では 0.7、FD-NanoClip sheet-dOB 複合体では 1.0、atelocollagen sheet-dOB 複合体では 1.2 であり、これらの結果より FD-NanoClip fiber-dOB 複合体が最も強固な骨基質組成を示し、FD-NanoClip sheet-dOB 複合体がこれに次いだ。Atelocollagen sheet-dOB 複合体は最も脆弱な骨基質組成を示した。

生体内局所の体細胞から骨芽細胞を誘導する技術に関する結果は、出願前の特許技術の新規性喪失につながる可能性があるため、現時点で公開できません。

図2: Alizarin Red S染色



- a: FD-NanoClip sheet-dOB複合体
- b: FD-NanoClip fiber-dOB複合体
- c: atelocollagen sheet-dOB複合体

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Sawai Seiji, Kishida Tsunao, Kotani Shin-ichiro, Tsuchida Shinji, Oda Ryo, Fujiwara Hiroyoshi, Takahashi Kenji, Mazda Osam, Sowa Yoshihiro | 4. 巻 2021 |
| 2. 論文標題 ALK5 i II Accelerates Induction of Adipose-Derived Stem Cells toward Schwann Cells through a Non-Smad Signaling Pathway | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cells International | 6. 最初と最後の頁 1~11 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/8307797 | 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 Sowa Yoshihiro, Kishida Tsunao, Louis Fiona, Sawai Seiji, Seki Makoto, Numajiri Toshiaki, Takahashi Kenji, Mazda Osam | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Direct Conversion of Human Fibroblasts into Adipocytes Using a Novel Small Molecular Compound: Implications for Regenerative Therapy for Adipose Tissue Defects | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cells | 6. 最初と最後の頁 605~605 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10030605 | 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 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 713932~713932 |
| 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kamada Yoichiro, Toyama Shogo, Arai Yuji, Inoue Hiroaki, Nakagawa Shuji, Fujii Yuta, Kaihara Kenta, Kishida Tsunao, Mazda Osam, Takahashi Kenji | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 Treadmill running prevents atrophy differently in fast- versus slow-twitch muscles in a rat model of rheumatoid arthritis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Muscle Research and Cell Motility | 6. 最初と最後の頁 429~441 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10974-021-09610-0 | 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 Shimomura Seiji, Inoue Hiroaki, Arai Yuji, Nakagawa Shuji, Fujii Yuta, Kishida Tsunao, Shin-Ya Masaharu, Ichimaru Shohei, Tsuchida Shinji, Mazda Osam, Takahashi Kenji | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 Mechanical stimulation of chondrocytes regulates HIF-1 under hypoxic conditions | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Tissue and Cell | 6. 最初と最後の頁 101574 ~ 101574 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tice.2021.101574 | 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0件

〔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 | 山本 健太 (Yamamoto Kenta) (00636160) | 京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医 (24303) | |
| 研究分担者 | 新井 祐志 (Yuji Arai) (50347449) | 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 |
|---------|---------|
| | |