

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24240069

研究課題名(和文)骨誘導型人工骨の創製

研究課題名(英文)Development of bone-inducing artificial bone

研究代表者

鄭 雄一 (Chung, Ung-il)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30345053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨が欠損・変形した際の治療に使う、人工骨の必要が高まっているが、その機能を高めるために、骨を形成するのに必要なシグナルネットワークを明らかにし、組み合わせることとした。その結果、試験管の中で、血清もタンパク質も遺伝子も用いず、4つの低分子化合物だけで骨の細胞をインビトロで誘導することに成功した。この化合物を人工の骨に搭載してその放出を制御し、骨が欠損した動物モデルに投与することで、短期間で治療効果を出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：In order to treat bone defect and deformity, we need to use artificial bone. We attempted to enhance its performance by clarifying signaling network for bone formation and integrating it with artificial bone. As a result, we succeeded in differentiating pluripotent stem cell into osteoblastic cells in vitro using 4 small-molecule compounds without using serum, protein or gene. By loading these compounds onto artificial bone and controlling their release, we also succeeded in treating bone defect model in animals within a short period.

研究分野：バイオマテリアル工学

キーワード：生体材料 トランスレーショナルリサーチ 人工骨

## 1. 研究開始当初の背景

骨は、物理的支持・造血・カルシウム代謝に重要な役割を担っているが、少子高齢化に伴い、骨の欠損や変形をもたらす骨粗鬆症や歯周病などの疾患が、急速に増加している。骨は、運動や容貌に大きな役割を果たしているために、骨の欠損や変形は、患者のQOLに深刻なダメージを及ぼす。

現在、骨組織欠損・変形に対する治療としては、自家骨移植・他家骨移植・人工骨移植の三種類が行われている (PLoS Medicine 4:260-269, 2007)。自家骨移植は患者自身の健全な骨から採取し、欠損部形状に徒手成形して患部に移植する。自家組織は生きた細胞や成長因子を含むため、吸収置換・力学的強度・再生誘導能に優れるが、健全部に侵襲を加え、採取・成形に時間を要し、しかも採取量制限があり外部形状が不十分であるという欠点がある。他家骨移植は死体等から採取・保存した他人の組織を移植するもので、吸収置換・力学的強度は自家組織に次ぎ、患者侵襲は低い一方、感染の危険があり再生誘導能は低いという欠点があり、日本では普及していない。このように、骨移植は、形状・術中操作性・侵襲・安全性に問題があり、これらを克服した人工骨が切望されている。

## 2. 研究の目的

(1) 骨形成性低分子化合物の最適化と作用機序解析

(2) 低分子化合物と第一世代人工骨との相互作用制御

(3) 動物実験での検証

## 3. 研究の方法

(1) 骨形成性低分子化合物の最適化と作用機序解析：未分化間葉系の細胞株・プライマリー細胞を用いて、骨分化マーカーを指標に、初期分化から後期分化までを切れ目無く促進する低分子化合物(の組合せ)を同定し、処方最適化する。同定された低分子化合物について、分子細胞生物学的な作用メカニズムを明らかにする。

(2) 低分子化合物と第一世代人工骨との相互作用制御：上記低分子化合物を搭載した人工骨を上記細胞と共培養して、骨分化マーカーを指標に、骨形成性低分子化合物の活性と徐放効果を検討し、1週間~2週間で徐放するように条件を最適化する。

(3) 動物実験での検証：臨床応用を睨んだ骨欠損・変形動物モデルを樹立、低分子化合物を搭載した人工骨を試作して埋植し、骨形成誘導能を放射線学的・組織学的、免疫組織学的に評価する。

## 4. 研究成果

(1) 骨形成性低分子化合物の最適化と作用機序解析：

【低分子化合物の最適化】骨分化を初期分化から後期分化までを切れ目無く促進する低

分子化合物として、ヘッジホッグシグナルのアゴニストであるSAGと、独自に単離した化合物であるTHの組み合わせを同定した。

【骨器官培養による確認】よりインビボに近い条件である骨の器官培養を利用し、胎生15.5日齢のマウスの中足骨を顕微鏡下で採取して、通常メディウム中にSAGとTHを添加したところ、著明な骨形成促進作用が観察された。

【分子作用機序の解析】レポーターアッセイにより、SAGは予想通りヘッジホッグシグナルを刺激し、THはRunx2シグナルを刺激することが明らかになった。

最適化した化合物結合型ナノ磁性ビーズを用いて、LC/MSによる同定を行い、同定した分子の精製タンパク質を用いて低分子化合物との結合を確認した。同定分子が、化合物の骨分化促進作用に寄与するか検証するため、遺伝子発現系を用いた機能獲得実験、siRNAを用いた機能喪失実験を行い、その作用機序を明らかにした。

発現と局在を検討した転写因子群(Runx2、オステリックス、Sox9)について、低分子化合物処理によるゲノムへの結合プロファイル追跡を行い、未分化間葉系細胞を骨形成性低分子化合物に曝露し、4日、7日、10日でクロマチンを回収して各転写因子に対するクロマチン免疫沈降・シーケンス法を行った。同様に、トランスクリプトーム及び、プロテオーム解析を行った。低分子化合物を作用させた未分化間葉系細胞からRNAを回収し逆転写反応後、cDNAマイクロアレイを行い、遺伝子発現プロファイルを取得した。プロテオーム解析においては、低分子化合物を作用させた細胞からタンパク質を抽出し、プロテインアレイ、二次元電気泳動およびLC/MSを用いて、タンパク質のリン酸化プロファイルを取得した。低分子化合物による分化誘導過程において、各転写因子の特異的抗体を用いた転写複体のアフィニティー精製と、LC/MSによる、複合体構成タンパク質の解析を行った。

以上のデータをバイオインフォマティクスの手法により統合して解析し、化合物によって活性化される細胞内シグナル経路・転写因子群のゲノム上への結合部位・それらの標的遺伝子を一元化して明らかにした。

(2) 低分子化合物と第一世代人工骨との相互作用制御：

【低分子化合物搭載方法の検討】SAGとTHを、リン酸三カルシウム素材に搭載し、乾燥させたところ、SAGが12日間、THが35日間徐放された。SAGとTHの活性は、エチレンオキサイドガス滅菌後も保たれた。

化合物を長期間担持して、徐放できるようなインターフェースとなるハイドロゲルの開発を行った。低濃度で膨潤しないクリティカルゲル、高分子鎖自体が膨潤しないゲル、水中で繰り返しの負荷にも破壊しないリラ

イアブルゲル、分解性の制御に関して、基本設計と試作に成功した。

(3) 動物実験での検証:

【骨欠損・変形動物モデルの樹立】今後の臨床展開を考え、手足の骨での骨欠損・変形モデルを樹立した。まず、ラットの長管骨に、2 mm程度の穴をドリルで開け、ここに微小テトラポッド型的人工骨を10-20個埋植し、放射線学的(単純X線、マイクロCTなど)、組織学的(HE染色、フォンコッサ染色、テトラサイクリンラベリングなど)、免疫組織学的(I型コラーゲン、BSP、オステオカルシン、BrdUなど)に評価した。その結果、2週間程度では皮質骨は自然治癒しない骨欠損モデルが確立された。

【低分子化合物搭載人工骨の試作と埋植】第一世代人工骨は以下のように製造した。

テトラポッド型微小人工骨: -TCP粉体を流動剤とともに微小射出成形して、焼結することで、高さ1mmのテトラポッド型微小人工骨を量産に成功した。

オーダーメイド型人工骨の製造: 骨欠損部のCTデータを画像処理ソフトに取り込み3次元化し、立体造形用フォーマット(STLフォーマット)で保存した。続いてSTLフォーマットを画像編集ソフトに取り込み、再建・再生すべき骨欠損部の3次元形状を描出し、また細胞進入を促進する内部構造等を新たに付与した。このデータをインクジェット式粉体積層造形装置 Z406 3D Printer (Z-Corporation、バーリントン、マサチューセッツ州、米国)に出力し、インクヘッドからコンドロイチン硫酸ナトリウム水溶液を-TCP粉体に噴射し硬化(水和反応)させることで、欠損部に一致する外部構造と自由に制御した内部構造を持つ生体適合性人工骨ができた。このようにして作製した第一世代人工骨に対し、2で最適化した方法で低分子化合物を搭載し、これを樹立したモデルに埋植した。移植後、1, 2, 3, 4週間後にラットを安楽殺して、骨を採取し、放射線学的(単純X線、マイクロCTなど)、組織学的(HE染色、フォンコッサ染色、テトラサイクリンラベリングなど)、免疫組織学的(I型コラーゲン、BSP、オステオカルシン、BrdUなど)に評価を行い、骨形成の機序を明らかにした。

【低分子化合物搭載人工骨による骨再生機序の解明】Col1a1-GFPマウス及び、Runx2-GFPマウスにおいて、骨欠損・変形モデルを作製し、低分子化合物搭載人工骨を埋植した。各マーカー遺伝子の発現を継続的に観察し、低分子化合物搭載人工骨による骨再生過程において出現する細胞の性質と、その出現の時間的・空間的パターンを明らかにした。

骨再生機序をin vivoで明らかにするために、バイオマーカーを用いたバイオイメージング方法を開発した。マウスに骨欠損モデルを作成し、このバイオイメージング方法で評価したところ、低分子化合物により良好な骨

再生が見られ、リアルタイム、非侵襲で再生過程を追うことができた。

これらの成果を、下記の19編の論文にまとめ、報告した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計19件)

Kondo S, Hiroi T, Han Y, Kim M, Shibayama M, Chung U, Sakai T. Reliable hydrogel with mechanical 'fuse link' in an aqueous environment. *Adv Mater* 27:7407-7411, 2015.

<http://10.1002/adma.201503130>

Kamata H, Li X, Chung U, Sakai T. Design of Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv Healthcare Mater* 4:2360-2374, 2015.

<http://10.1002/adhm.201500076>

Hojo H, Ohba S, Chung U. Signaling pathways regulating the specification and differentiation of the osteoblast lineage. *Regenerative Therapy* 1:57-62, 2015.

<http://10.1016/j.reth.2014.10.002>

Uryu T, Matsumoto N, Namaki S, Mashimo T, Tamagawa T, Yasumitsu T, Okudera M, Komiyama K, Chung U, Honda K, Arai Y, Yonehara Y. Histochemical and Radiological Study of Bone Regeneration by the Combinatorial Use of Tetrapod-Shaped Artificial Bone and Collagen. *J Hard Tissue Biol* 24:199-210, 2015.

<http://10.2485/jhtb.24.199>

Iwata J, Namaki S, Mashimo T, Honda K, Chung U, Yonehara Y. Augmentation of flat bone area using tetrapod-shaped artificial bone in rats. *J Hard Tissue Biol* 24:69-76, 2015.

<http://10.2485/jhtb.24.69>

Kitaura Y, Hojo H, Komiyama Y, Takato T, Chung U, Ohba S. Gli1 haploinsufficiency leads to decreased bone mass with an uncoupling of bone metabolism in adult mice. *PLoS ONE* 9(10):e109597, 2014.

<http://10.1371/journal.pone.0109597>

Elgali I, Igawa K, Palmquist A, Lennerås M, Xia W, Choi S, Chung U, Omar O, Thomsen P. Molecular and structural patterns of bone regeneration in surgically created defects containing bone substitutes. *Biomaterials* 35:3229-3242, 2014.

<http://10.1016/j.biomaterials.2013>

12.084

Kanke K, Masaki H, Saito T, Komiyama Y, Hojo H, Nakauchi H, Lichtler AC, Takato T, Chung U, Ohba S. Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free condition. *Stem Cell Reports* 2:751-760, 2014.

<http://10.1016/j.stemcr.2014.04.016>

Choi S, Liu IL, Yamamoto K, Honnami M, Ohba S, Echigo R, Sakai T, Igawa K, Suzuki S, Nishimura R, Chung U, Sasaki N, Mochizuki M. Comparison of the long-term effects on rabbit bone defects between Tetrapod® and -tricalcium phosphate granules implantation. *J Artif Organ* 17:344-351, 2014.

<http://10.1007/s10047-014-0778-9>

Choi S, Liu I, Yamamoto K, Honnami M, Sakai T, Ohba S, Echigo R, Suzuki S, Nishimura R, Chung U, Sasaki N, Mochizuki M. Implantation of Tetrapod-shaped Granular Artificial Bones or -Tricalcium Phosphate Granules in a Canine Large Bone-Defect Model. *J Vet Med Sci* 76:229-235, 2014.

<http://jsvetsci.jp/jvms/>

Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina M, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung U. Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J Biol Chem* 288:9924-9932, 2013.

<http://10.1074/jbc.M112.409342>

Maeda Y, Hojo H, Shimohata N, Choi S, Yamamoto K, Takato T, Chung U, Ohba S. Bone healing by sterilizable calcium phosphate tetrapods eluting osteogenic molecules. *Biomaterials* 34:5530-5537, 2013.

<http://10.1016/j.biomaterials.2013.03.08942>

Yano F, Hojo H, Ohba S, Saito T, Honnami M, Mochizuki M, Takato T, Kawaguchi H, Chung U. Cell-sheet technology combined with a thienoinazole derivative small compound TD-198946 for cartilage regeneration. *Biomaterials* 34:5581-5587, 2013.

<http://10.1016/j.biomaterials.2013.04.008>

Honnami M, Choi S, Liu I, Kamimura W, Taguchi T, Ichimura M, Urushizaki Y,

Hojo H, Shimohata N, Ohba S, Amaya K, Koyama H, Nishimura R, Chung U, Sasaki N, Mochizuki M. Repair of rabbit segmental femoral defects by using a combination of tetrapod-shaped calcium phosphate granules and basic fibroblast growth factor-binding ion complex gel. *Biomaterials* 34:9056-9062, 2013.

<http://10.1016/j.biomaterials.2013.08.014>

Choi S, Lee J, Igawa K, Liu I, Honnami M, Suzuki S, Nishimura R, Chung U, Sasaki N, Mochizuki M. Changes in bone regeneration by trehalose coating and basic fibroblast growth factor after implantation of tailor-made bone implants in dogs. *J Vet Med Sci* 75:721-726, 2013.

<http://10.1292/jvms.12-0244>

Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung U. Gli1 participates in the hedgehog-mediated specification of the osteoblast lineage during endochondral ossification. *J Biol Chem* 287:17860-17869, 2012.

<http://10.1074/jbc.M112.347716>

Choi S, Liu I, Yamamoto K, Igawa K, Mochizuki M, Sakai T, Ryosuke E, Honnami M, Suzuki S, Chung U, Sasaki N. Development and evaluation of tetrapod-shaped granular artificial bones. *Acta Biomaterialia* 8:2340-2347, 2012.

<http://10.1016/j.actbio.2012.02.019>

Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Yano F, Ikeda T, Mabuchi A, Sapkota B, Akune T, Nishida N, Yoshimura N, Nakagawa T, Tokunaga K, Nakamura K, Chung U, Kawaguchi H. C/EBP and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 as the inducer in chondrocytes. *Hum Mol Genet* 21:1111-1123, 2012.

<http://10.1093/hmg/ddr540>

Yamamoto K, Hojo H, Koshima I, Chung U, Ohba S. Famotidine suppresses osteogenic differentiation of tendon cells in vitro and pathological calcification of tendon in vivo. *J Orthop Res* 30:1958-1962, 2012.

<http://10.1002/jor.22146>

[学会発表](計6件)

Aini H, Itaka K, Chung U, Ohba S. Introduction of messenger RNA into knee articular cartilages using polyplex nanomicelle. 2015 World

Congress on Osteoarthritis, April 30-May 3, 2015, Seattle, USA.  
Chang S, Kobayashi H, Okada K, Okuma T, Mori Y, Kawata M, Yano F, Kawaguchi H, Chung U, Tanaka S, Saito T. Gremlin1 induced by excessive mechanical stress loading enhances cartilage degradation. 2015 World Congress on Osteoarthritis, April 30-May 3, 2015, Seattle, USA.  
鄭 雄一、Development of high-performance structural biomaterials through controlling 3D shape、日本骨代謝学会学術集会、2014年7月24日～7月26日、大阪国際会議場(大阪府)  
Kanke K, Masaki H, Saito S, Komiyama Y, Hojo H, Lichtler AC, Nakauchi H, Takato T, Chung U, Ohba S. Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. International Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting, June 18-21, 2014, Vancouver, Canada.  
Chung U. The 4th Asian Biomaterials Congress: Development of implant devices for skeletal reconstruction by precise control of 3D shape. Hong Kong University of Science and Technology, June 26-29, 2013, Hong Kong.  
Yano F, Hosaka Y, Fukai A, Saito T, Hojo H, Ohba S, Kawaguchi H, Chung U. Prevention and repair of cartilage degeneration by a novel small thienindazole-derivative compound. 2012 World Congress on Osteoarthritis, April 26-29, 2012, Barcelona, Spain.

〔図書〕(計1件)

鄭雄一 「バイオマテリアルの三次元造形」(224-228頁) In:「細胞の3次元組織化 - その最先端技術と材料技術」田畑泰彦編(株式会社メディカルドゥ) 2014 (総ページ数 363)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:眼科治療用ゲル材料  
発明者:鄭雄一 他  
権利者:東京大学  
種類:特許  
番号:特願 2016 - 000913  
出願年月日:2016年1月6日  
国内外の別:国内

取得状況(計1件)

名称:人工骨製造方法及び当該方法によって

製造された人工骨

発明者:鄭雄一 他

権利者:東京大学、(株)松浦機械製作所

種類:特許

番号:ZL201010551969.X

取得年月日:2016年3月9日

国内外の別:国外(中国)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tetrapod.t.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鄭雄一(CHUNG, Ung-il)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号:30345053

(2)研究分担者

大庭伸介(OHBA, Shinsuke)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号:20466733

酒井崇匡(SAKAI, Takamasa)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号:70456151