

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670847

研究課題名(和文) ステムセル・レザバーを具備した機能型再生骨の開発

研究課題名(英文) development of functional regenerative bone as a stem cell reserver

研究代表者

星 和人(HOSHI, Kazuto)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30344451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ステムセル・レザバーを具備する機能型再生骨を実現することを目的とし、まずrhBMP-2誘導再生骨に対し、間葉系幹細胞ならびに造血幹細胞を維持する因子およびその投与量を検討した。この条件に基づき、造血幹細胞維持因子を含有し、rhBMP-2を内包する機能型再生骨の試作をおこなった。さらに、マウス皮下移植モデルなどの動物実験モデルを通じて製造条件を確立し、機能型再生骨を作製した。

研究成果の概要(英文)：For development of functional regenerative bone as a stem cell reserver, we examined the factor to maintain a mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in rhBMP-2-induced regenerative bone, and its optimal dose. Based on this condition, we prepared a scaffold containing the factor to maintain hematopoietic stem cells within it, and also made a prototype of functional regenerative bone enclosing the rhBMP-2 into the scaffold, Finally, we established manufacturing condition of functional regenerative bone through animal experimental models using mice or others.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ステムセル・レザバー 間葉系幹細胞 造血幹細胞 骨再生 再生医療

研究成果の概要

1. 研究開始当初の背景

顎・顔面骨欠損の治療は血管柄つき骨組織あるいは海绵骨細片の自家移植などが行われている。しかし、移植できる組織量の制限や手術侵襲の問題などがあるため、代替えとして、PDGF 製剤や FGF-2 製剤による歯槽骨組織誘導や、培養間葉系幹細胞を用いた組織工学(tissue engineering)による上顎洞挙動術、などの骨再生医療の研究開発が盛んに進められている。これらは一定の成果を得ているものの、骨吸収や強度不足などの課題も残る。長期にわたり骨量・骨質を保ち、インプラント植立や咬合維持など機能的な面から臨床要請に合う再生骨を確立することは、骨再生医療の最終的な目標である。従来の再生骨は、初期には幼弱な線維性骨が旺盛に誘導されるものの、その後形成される成熟骨における骨髄は急速に黄色化し[Hoshi 2003 J Bone Miner Metab 2003]、造血幹細胞ならびに間葉系幹細胞が量的に不足していることを示唆している(図 1)。申請者らは、骨の維持に必要な造血幹細胞や間葉系幹細胞の貯蔵庫(ステムセル・レザバー)が持続的に構築されないことが最大の原因と考えている(図 1)。

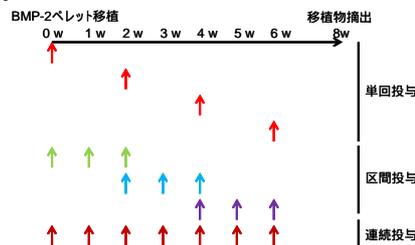


図3 VEGF投与スケジュール

2. 研究の目的

欠損した顎・顔面骨を再生・再建し、機能や審美性を回復することは口腔外科学の主要な課題である。現在、バイオマテリアルや組織工学による骨再生医療の研究が進められているが、現行の再生骨では骨吸収、強度不足などの課題が残る。申請者らはこの原因を、再生骨骨髄での造血幹細胞ならびに間葉系幹細胞の量的不足と考える。本研究の目的は、新規化合物を用いて造血幹細胞・骨髄幹細胞を生体内から持続的に再生骨へ動員し、再生骨内にいわば「ステムセル・レザバー」を構築して、長期にわたり骨量と骨質を維持できる機能的な骨再生を実現することである(図 2)。

3. 研究の方法

組み換えヒト(rh)BMP-2 で誘導する再生骨に、幹細胞動員作用を有する因子を用いて、持続的に造血幹細胞・骨髄幹細胞を動員し、ステムセル・レザバーを構築する方法を開発し、長期に骨量・骨質を維持できる機能的骨再生を実現することが本研究の目的である。そのため、以下の研究を実施した。

・マウス BMP-2 誘導再生骨モデルに対する

VEGF 投与とステムセル維持の評価

- ・BMP-2 と VEGF を用いた機能型再生骨の作製とマウス皮下移植実験
- ・ビーグルをもちいた移植実験による機能型再生骨の確立

マウス BMP-2 誘導再生骨モデルに対する VEGF 投与とステムセル維持の評価

rhBMP-2(1.25 μg)および担体として 3% アテロコラーゲン(100 μL)を凍結乾燥した BMP-2 ペレット( 3x1 mm)をマウス(C57BL/6J、6 週齢雄)の背部皮下へ移植し、骨再生を誘導する[Gong, Hoshi 2003 J Bone Miner Metab 2003]。移植後、BMP-2 ペレット周囲組織に様々な濃度とタイミングで VEGF を局所注入し、骨および骨髄の形成を評価する。VEGF の投与方法は、移植直後、2、4、6 週での単回投与、移植直後-2 週の区間投与、2-4 週の区間投与、4-6 週の区間投与、移植直後-6 週の連続投与、を検討する(図 3)。

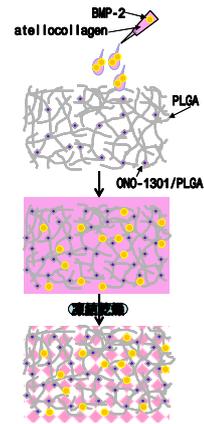


図2 機能型再生骨誘導のイメージ

VEGF 投与(0.1 mL)は、単回投与群ならびに区間投与群では 0, 1, 10, 100 ng/mL、連続投与群は 0, 1, 10 ng/mL の濃度で行う。8 週後に再生骨を摘出し比較検討する。評価には、DEXA 法を用いた骨塩定量、3D-μCT による骨形態評価を行った後、組織切片を作製し H-E 染色法、トルイジンブルー染色法、Azan 染色法を用いて組織学的に観察する。さらに、骨分化マーカーであるオステオカルシン、オステオポンチン、骨シアロタンパクなどを用いて免疫組織学的に骨形成を評価し、TRAP 染色で骨吸収を評価する。また、骨髄における幹細胞の変化は、造血幹細胞の指標として CD34(-)、Sca-1、c-kit などを、間葉系幹細胞は CD45、Ter119、PDGFR-1 などを免疫組織化学的に観察し、形態計測学的に評価する。これらの結果をもとに、BMP-2 誘導再生骨の骨量・骨質を維持し、骨髄における幹細胞の貯蔵庫(ステムセル・レザバー)を構築するのに適した VEGF 投与条件を設定する。

BMP-2 と VEGF を用いた機能型再生骨の作製とマウス皮下移植実験

上記実験の結果から、VEGF を担持させた BMP-2 再生骨を作製し、マウス(C57BL/6J、6 週齢雄)の背部皮下に移植し、4、8、12 週で組織を摘出する。評価には、DEXA 法を用いて骨塩定量、3D-μCT による骨形態評価を行う。また、組織切片を作製し、H-E 染色法、トルイジンブルー染色法、Azan 染色法を用いて組織学的に観察するとともに、骨芽細胞マーカーであるオステオカルシン、オステオ

ポンチン、骨シアロタンパクや破骨細胞マーカーである TRAP を組織学的に評価する。幹細胞の評価には、CD34、Sca-1、PDGFR-1、c-kit などを用いて、血球系細胞の評価には CD31、CD45 などを用いて、免疫組織化学的に解析する。

以上の結果を元に、骨量・骨質の維持、ステムセル・レザバーの構築に適した条件を絞り込む。また、結果から VEGF 誘導因子である ONO-1301 の応用を検討する。

### ビーグルを用いた移植実験による機能型再生骨移植の確立

前項で絞り込んだ製造条件を用いて、VEGF/BMP-2 含有再生骨を作製する。ビーグル(6 ヶ月齢雄)に上記再生骨を移植し、経時的に組織を摘出する。評価には、DEXA 法を用いて骨塩定量、3D- $\mu$ CT による骨形態評価を行い比較検討する。さらに、組織切片を作製し、H-E 染色法、トルイジンブルー染色法、Azan 染色法を用いて組織学的に観察する。これらの結果を元に、骨形成に優れ、その維持も良好な製造条件を選定する。また、結果から VEGF 誘導因子である ONO-1301 の応用を検討する。

#### 4. 研究成果

現在、バイオマテリアルや組織工学による骨再生医療の研究が進められているが、現行の再生骨では骨吸収、強度不足などの課題が残されている。申請者らはこの原因を、再生骨骨髄での造血幹細胞並びに間葉系幹細胞の量的不足と動化、新規化合物を用いて造血幹細胞・骨髄間葉系幹細胞を生体内から持続的に再生骨へ動員し、再生骨内にいわば「ステムセル・レザバー」を構築して、長期にわたり骨量と骨質を維持できる機能的な骨再生を研究期間内に実現することを目的として本研究を実施した。

まず、マウス BMP-2 誘導再生骨モデルを作製し、再生骨誘導に適した濃度の BMP-2 設定をおこない、この再生骨に各濃度、タイミングにて投与した VEGF の再生骨骨髄に与える影響を評価し、骨髄維持に効果的であった VEGF 濃度および投与のタイミングを設定し、BMP-2/VEGF 誘導再生骨の仕様を決定した。

rhBMP-2(Osteogenetics GmbH®)に滅菌水を加え 1 $\mu$ g/ml へ調整する。60、10 分間熱架橋を施した 3%アテロコラーゲン(Cell Matrix Inc. ®)1ml に rhBMP-2(Osteogenetics GmbH ®) 2 $\mu$ g を混和し、内径 5mm のクローニングリングに注入する。凍結乾燥機 FDU-1100 内にて 1~2 日間凍結乾燥し、最終的に 3mm 厚さ 1mm 程度のペレットを作製した。この作製したペレットをマウス皮下に移植し、経時的な異所性骨形成と骨成熟を検討した。移植後 1 週目よりペレット外周より骨形成を認め、内部には骨髄細胞様細胞が確認されだし、2 週目にはペレット外周の骨形成が顕著となり、内部にも海綿骨用骨構造が確認されると

ともに、骨髄細胞で満たされる所見を得たが、2 週目をピークとしてそれ以降、急激な骨退縮および、内部細胞の消失、脂肪化が顕著となり、最終的に、異所性骨の消失となった。これらの結果を基に、移植後形成された異所性骨の経時的な消失が骨髄細胞の減少と同時に生じたことを勘案すると、骨内部における恒常的な骨髄細胞については MSC や HSC といった幹細胞の存在が不可欠であると考えた。そこで、血管誘導を促進する因子である VEGF を投与することで、持続的な細胞の動員を評価した。上述したペレットに VEGF 100,200,500,1000ng で投与してそれぞれについて検討をおこなった結果、500ng 添加群において、4 週目までの骨形態の維持を認め、さらに、骨内部の細胞も減少傾向を認めたが、保持されることが分かった。

一方で、ONO-1301 による間葉系細胞のステムネス維持の評価と VEGF 誘導評価をおこない、間葉系幹細胞が効果的に VEGF を誘導する最適な ONO-1301 濃度を検討した。これらの知見を基に、BMP-2 と徐放化 ONO-1301 を用いた機能型再生骨を検討した。

#### 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 20 件)

Abe, M., Mori, Y., Inaki, R., Ohata, Y., Abe, T., Saijo, H., Ohkubo, K., Hoshi, K., Takato, T., A case of odontogenic infection by *Streptococcus constellatus* leading to systemic infection in a Cogan's syndrome patient, Case Reports in Dentistry, 査読有, vol.2014, 2014, Article ID 793174, 4 pages.

DOI: 10.1155/2014/793174

Abe, M., Mori, Y., Kanno, Y., Hoshi, K., Saijo, H., Abe, T., Ohkubo, K., Takato, T., A case of pleomorphic adenoma of the parotid gland with multiple local recurrences through facial to cervical region, Open Journal of Stomatology, 査読有, vol.4, 2014, 441-445. DOI:

10.4236/ojst.2014.49059

Takato, T., Mori, Y., Fujihara, Y.,

Asawa, Y., Nishizawa, S., Kanazawa, S., Ogasawara, T., Saijo, H., Abe, T., Abe, M., Suenaga, H., Kanno, Y.,

Sugiyama, S., Hoshi, K., Preclinical and clinical research on bone and cartilage regenerative medicine in oral and maxillofacial region, *Oral Sci. Int.*, 査読有, vol.11(2), 2014, 45-51. DOI: 10.1016/S1348-8643(14)00008-1

Mori, Y., Kanazawa, S., Asawa, Y., Sakamoto, T., Inaki, R., Okubo, K., Nagata, S., Komura, M., Takato, T., Hoshi, K., Regenerative cartilage made by fusion of cartilage elements derived from chondrocyte sheets prepared in temperature-responsive culture dishes, *J. Hard Tissue Biology*, 査読有, vol.23(1), 2014, 101-110. DOI: なし

Suenaga, H., Unami, M., Hoshi, K., Mori, Y., Takato, T., Rare case of composite embryonal rhabdomyosarcoma and leiomyosarcoma of the tongue of an adult, *J. Oral Maxillofac. Surg. Med. Pathol.*, 査読有, vol.26(1), 2014, 30-34. DOI: 10.1016/j.ajoms.2012.08.019

Fujihara, Y., Takato, T., Hoshi, K., Macrophage-inducing fasl on chondrocytes forms immune privilege in cartilage tissue engineering, enhancing in vivo regeneration, *Stem Cells*, 査読有, vol.32(5), 2014, 1208-1219. DOI: 10.1002/stem.1636

Kawase-Koga, Y., Saijo, H., Hoshi, K., Takato, T., Mori, Y., Surgical management of odontogenic myxoma: a case report and review of the literature, *BMC Res. Notes*, 査読有, vol.7, 2014, 214. DOI: 10.1186/1756-0500-7-214

Suenaga, H., Unami, M., Hoshi, K., Mori, Y., Takato, T., Ectopic complex odontoma of the nasal cavity: A rare case, *J. Oral Maxillofac. Surg. Med. Pathol.*, 査読有, vol.26(3), 2014, 347-350. DOI: 10.1016/j.ajoms.2013.02.002

Mori, Y., Takato, T., Hoshi, K., Kanno, Y., Sugiyama, M., Ohkubo, K., Saijo, H., Correction of upturned nasal tip with a costal cartilage graft in bilateral cleft lip patients, *J. Craniofac. Surg.*, 査読有, vol.25(5), 2014, e443-e445. DOI: 10.1097/SCS.0000000000000954

高戸 毅, 藤原夕子, 星 和人, 小笠原徹, 西條英人, 安部貴大, 阿部雅修, 末永英之, 菅野勇樹, 杉山 円, 森 良之, 顎顔面領域における骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究, *日本口腔科学会雑誌*, 査読有, 63 巻 2 号, 2014, 207-215. DOI: 10.11277/stomatology.63.207

高戸 毅, 藤原夕子, 星 和人, 歯科口腔外科と再生医療, *耳鼻咽喉科・頭頸部外科*, 査読有, 86 巻 6 号, 2014, 450-456. DOI: なし

星 和人, 稲木涼子, 高戸 毅, バイオインテグレーションを支持する軟部組織, *バイオインテグレーション学会雑誌*, 査読有, 3 巻 1 号, 2014, 3-5. DOI: なし

Matsuyama, M., Fujihara, Y., Inaki, R., Nishizawa, S., Nagata, S., Takato, T., Hoshi, K., Evaluation of in vivo migration of chondrocytes from tissue-engineered cartilage that was subcutaneously transplanted in mouse model, *OJRM*, 査読有, vol.2(4), 2013, 93-98. DOI: 10.4236/ojrm.2013.24013

Mori, Y., Hoshi, K., Takato, T.,

Takahashi, M., Hirano, Y., Kanno, Y., Ohkubo, K., Saijo, H., Submucous cleft palate: variations in bony defects of the hard palate, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 査読有, vol. 51(8), 2013, e220-e223. DOI: 10.1016/j.bjoms.2013.01.015

Uto, S., Nishizawa, S., Takasawa, Y., Asawa, Y., Fujihara, Y., Takato, T., Hoshi, K., Bone and cartilage repair by transplantation of induced pluripotent stem cells in murine joint defect model, *Biomed. Res.*, 査読有, vol.34(6), 2013, 281-288. DOI: 10.2220/biomedres.34.281

Mori, Y., Kanazawa, S., Watanabe, M., Suenaga, H., Okubo, K., Nagata, S., Fujihara, Y., Takato, T., Hoshi, K., Usefulness of agarose mold as a storage container for three-dimensional tissue-engineered cartilage, *Materials and Sci. Applications*, 査読有, vol.4, 2013, 72-78. DOI: 10.4236/msa.2013.48A010

Mori, Y., Watanabe, M., Nakagawa, S., Asawa, Y., Nishizawa, S., Okubo, K., Saijo, H., Nagata, S., Fujihara, Y., Takato, T., Hoshi, K., Hollow fiber module applied for effective proliferation and harvest of cultured chondrocytes, *Materials Sci. and Applications*, 査読有, vol.4, 2013, 62-67. DOI: 10.4236/msa.2013.48A008

Maeda, Y., Suenaga, H., Sugiyama, M., Saijo, H., Hoshi, K., Mori, Y., Takato, T., Clinical presentation of epignathus teratoma with cleft palate; and duplication of cranial base, tongue,

mandible, and pituitary gland. *J. Craniofac. Surg.*, 査読有, vol.24(4), 2013, 1486-1491. DOI:10.1097/SCS.0b013e3182953b1f

Komura, M., Komura, H., Otani, Y., Kanamori, Y., Iwanaka, T., Hoshi, K., Takato, T., Tabata, Y., The junction between hyaline cartilage and engineered cartilage in rabbits, *Laryngoscope*, 査読無, vol.123(6), 2013, 1547-1551. DOI: 10.1002/lary.23269

Suenaga, H., Hoang, T.H., Liao, H., Masamune, K., Dohi, T., Hoshi, K., Mori, Y., Takato, T., Real-time in situ three-dimensional integral videography and surgical navigation using augmented reality: a pilot study, *Int. J. Oral. Sci.*, 査読有, vol.5(2), 2013, 98-102. DOI:10.1038/ijos.2013.26

〔学会発表〕(計 17 件)

高戸 毅, 藤原夕子, 金澤三四朗, 星 和人, 3D プリンターによる外科用インプラントの創生 (招待講演) 第 76 回日本臨床外科学会総会、2014 年 11 月 21 日、郡山市民文化センター、福島

星 和人, 足場素材を用いた軟骨再生医療の新展開 (招待講演) 第 36 回バイオマテリアル学会、2014 年 11 月 18 日、タワーホール船堀、東京

阿部雅修, 森 良之, 安部貴大, 西條英人, 星 和人, 高戸 毅, 口腔扁平上皮癌における新規不活化遺伝子の同定と癌関連遺伝子変異との関連性 (招待講演) 第 59 回日本口腔外科学会総会、2014 年 10 月 17 - 19 日、幕張メッセ、千葉

星 和人, 足場素材を用いた軟骨再生医療の新展開、第 29 回日本整形外科学会

基礎学術集会、2014年10月10日、城山ホテル、鹿児島

高戸 毅、藤原夕子、金澤三四郎、星和人、3Dプリンターによる外科用インプラントの創生（招待講演）特定非営利活動法人 口腔医科学会、2014年10月5日、テレコムセンタービル東棟20階会議室2、東京

藤原夕子、高戸 毅、星 和人、マクロファージのサブクラスが軟骨再生に与える影響、第35回日本炎症・再生医学会、2014年7月1-4日、万国津梁館、沖縄  
星 和人、唇裂鼻変形に対するインプラント型再生軟骨臨床展開（招待講演）第38回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2014年5月30日、札幌コンベンションセンター、札幌

星 和人、iPS細胞を用いたティッシュエンジニアリング型軟骨再生医療の新展開（招待講演）第68回NPO法人日本口腔外科学会学術集会、2014年5月9日、京王プラザホテル、東京

星 和人、自己組織化ペプチドを活用した次世代再生軟骨組織の研究開発（招待講演）第13回日本再生医療学会総会、2014年3月4日、国立京都国際会館、京都

星 和人、軟骨の再生・再建 - 軟骨の生態学的研究 - （招待講演）第27回日本軟骨代謝学会、2014年3月1日、京都府医師会館、京都

星 和人、足場素材を導入した3次元再生軟骨の研究開発（招待講演）第16回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ、2013年12月26日、東京

星 和人、生分解性ポリマーを用いた軟骨再生医療の研究開発（招待講演）第30回高分子研究会講座、2013年11月27日、東京大学生産技術研究所、東京  
Kazuto Hoshi, Clinical application of

tissue-engineered cartilage in craniofacial areas, 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Oct. 13, 2013, Palau de Congressos de Catalunya Barcelona, Spain,

星 和人、足場素材を用いた軟骨再生医療の新展開（招待講演）第14回再生医療の実用化に関するニーズ発表会、2013年10月11日、神戸臨床研究情報センター、神戸

Kazuto Hoshi, Cartilage regeneration and usefulness of medication（招待講演）, International Cartilage Repair Society 2013, Sep. 17, 2013, Swissotel Gran Efes, Izmir, Turkey

Kazuto Hoshi, Optimal combinations of scaffolds and growth factors for tissue engineering of cartilage（招待講演）, Osteoarthritis Research Society International World Congress, Apr. 20, 2013, Marriott Philadelphia Downtown, Philadelphia, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

星 和人 (HOSHI, Kazuto)  
東京大学医学部附属病院・准教授  
研究者番号：30344451

### (2) 研究分担者

藤原 夕子 (FUJIHARA, Yuko)  
東京大学医学部附属病院・助教  
研究者番号：50466744

森 良之 (MORI, Yoshiyuki)  
自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70251296

高戸 毅 (TAKATO, Tsuyoshi)  
東京大学医学部附属病院・教授  
研究者番号：90171454