

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11315

研究課題名(和文) iPS細胞と低結晶性炭酸アパタイトを用いたハイブリッド型人工骨による骨再生医療

研究課題名(英文) Bone regeneration using a hybrid-type artificial bone consisted of iPS cells and low crystalline carbonate apatite

研究代表者

永井 宏和 (Nagai, Hirokazu)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：50282190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低結晶性炭酸アパタイトとiPS細胞由来の骨芽細胞とを組み合わせ、ハイブリッド型人工骨を作製し、新しい骨再生医療を目指した。はじめに骨再生用scaffoldとして、低結晶性炭酸アパタイト顆粒とコラーゲンの複合体を作製した。この複合体をウサギ頭頂骨の欠損部に埋植したところ、良好な骨形成が確認でき、骨再生用scaffoldとしての有用性が示された。一方、iPS細胞から直接骨芽細胞へ分化誘導することが困難であったため、iPS細胞を一度間葉系幹細胞へ分化誘導させたが、分化効率が低かった。しかし、炭酸アパタイト上で培養した間葉系幹細胞が骨芽細胞へ分化することは確認できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we try to develop the bone regenerative therapy using a hybrid-type artificial bone consisted of human induced pluripotent stem (iPS) cells and low crystalline carbonate apatite (CAp). We used iPS cells for cell source of bone regenerative therapy, and used low crystalline CAp and collagen complex for scaffold of bone regenerative therapy. As a result, it was revealed that 1) low crystalline CAp and collagen complex implanted into the cranial bone defect of rabbits induced new bone tissues, 2) the differentiation of human iPS cells to mesenchymal stem cell-like cells was induced, 3) mesenchymal stem cells cultured on carbonate apatite disk differentiated into osteoblastic cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨再生医療 炭酸アパタイト iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療研究の著しい進歩によって、失った臓器を取り戻すことも夢ではなくなりつつあるが、顎骨欠損に対する治療の現在のゴールドスタンダードは自家骨移植である。自家骨移植では採骨時に新たな侵襲を健康部に加える必要があり、患者の負担は大きい。また、複雑な顎骨形態を付与することは難しく、採取できる骨量にも限界があり、広範囲の顎骨欠損を再建することができない。そのため自家骨移植に代わる新しい骨再生医療への期待は大きい。

再生医療は細胞、scaffold(細胞の足場)、分化増殖因子の3大要素から構成される。骨再建にはハイドロキシアパタイト(HAp)が臨床応用されているが、焼結体であるHApは体内で吸収されず、異物として永久に残留するという重大な欠点がある。骨には造血作用などの重要な生物学的機能があることから、体内で吸収して骨に置換する生体材料の開発が望まれる。骨の主成分である炭酸アパタイト(CAp)は骨リモデリングに同調して生体骨に置換される。一般的なCApの製造過程では高温での焼結処理が必要であるため、生体骨に近い結晶性の低いCApを創ることは難しかった。申請者らは、溶解-析出反応によって、高温での焼結処理なしに結晶性の低いCApを作製する方法を開発し、CApが骨芽細胞の分化を促進すること、体内で吸収されて骨に置換されることを明らかにしてきた。しかしながら、申請者らが作製したCApは顆粒状やブロック状であるため、賦形性や操作性に問題がある。また、生体材料だけを移植した場合の骨形成速度は自家骨に比べて大幅に遅いことから、CApもその例外ではないことが予想される。生体骨がコラーゲンとCApを主成分とする有機・無機複合体であることから、本研究ではCApとコラーゲンの複合体を作製して骨再生用のscaffoldとして用いるという発想に至った。

一方、骨再生医療の細胞源としては、これまで間葉系幹細胞(MSC)が用いられてきたが、MSCは成体組織中に含まれる数が少なく、増殖能も低い。また、継代培養によって分化能が低下するなど、臨床応用を進める上で大きな問題があった。この問題を解決したのがiPS細胞である。iPS細胞ではES細胞の問題点である倫理的問題と拒絶反応も解決された。また、iPS細胞にはがん化の問題があったが、最近、その問題も解決されつつある。本研究では、iPS細胞を骨再生医療の細胞源として用いる。iPS細胞の骨芽細胞への分化を制御することは困難であることが予想されるため、iPS細胞をMSCへ分化させてから、さらに骨芽細胞へと分化させて骨再生医療に用いることを考えた。最終的には、CAp-コラーゲン複合体とiPS細胞から分化させた骨芽細胞を用いたハイブリッド型人工骨を作製し、新しい骨再生医療の開発に挑む。

### 2. 研究の目的

本研究では、生体骨がコラーゲンとCApを主成分とする有機・無機複合体であることから、申請者らが開発した生体吸収性材料である低結晶性CApとコラーゲンを複合させた新しい骨再生用scaffoldを開発し、骨再生医療に応用する。一方、骨再生医療の細胞源としては、iPS細胞を間葉系幹細胞、骨芽細胞へと分化させて応用する。その上で、骨再生用scaffoldとiPS細胞由来の骨芽細胞とを組み合わせたハイブリッド型人工骨を創製して新しい骨再生医療を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 低結晶性CApとコラーゲンの複合化

CAp顆粒とコラーゲン溶液を混和し、直径6 or 9 mmのdisk状金型に充填した後、凍結乾燥することで円柱状のCAp-Col複合体を作製する。CApの顆粒径は100-300 μm, 300-600 μm, 1000-1500 μmとし、コラーゲン濃度は1, 2, 3%として複合体を作製して、その賦形性および操作性について評価する。さらに、混和するCApとコラーゲンの重量比についても検討する。また、複合体を120, 150, 180で熱架橋を行い、その影響について評価する。作製した複合体のX線回折およびフーリエ変換赤外分光分析の解析を行う。

#### ウサギ頭頂骨へのCAp-Col複合体の埋植

ウサギ頭頂骨に自己修復が不可能とされる直径9 mmの骨欠損をトレフィンバーで作製し、CAp-Col複合体を埋植する。2, 4, 8週後に屠殺して試料(頭蓋骨)を摘出し、摘出標本のX線評価および組織学的評価を行う。

#### iPS細胞の分化誘導

理研バイオリソースセンターから入手したヒトiPS細胞(HPS0002)を用いる。iPS細胞を25% KNOCKOUT Serum Replacementを含むDMEM-F12培地を用いて、マウス胚線維芽細胞(MEF)をフィーダー細胞として培養し、十分な細胞ストックを作成する。

iPS細胞の間葉系幹細胞への分化誘導はES細胞で確立されている細胞表面分化マーカーを用いた方法で分離する。すなわち、iPS細胞をLIF非存在下に血清を用いて培養してiPS細胞の分化を誘導する。培養4日目に、PDGFR陽性、VEGFR2陰性の分画をFACSでソートして培養する。継代培養した細胞の多分化能について評価する。

iPS細胞由来間葉系幹細胞を骨分化誘導培地(100 nM dexamethasone, 10 mM β-glycerol phosphate, 50 μM ascorbic acid)で培養して、骨芽細胞への分化誘導を行う。培養した細胞の骨芽細胞分化マーカー(collagen type I, alkaliphosphatase, osteocalcinなど)の発現をRT-PCR法および免疫染色によって評価し、石灰化をアリザリンレッド染色によって評価する。

iPS細胞とCAp-Col複合体を用いたハイブリッド型人工骨の創製

最適の条件で作製した CAp-Col 複合体のコラーゲンスポンジ中で iPS 細胞由来の骨芽細胞を培養して、ハイブリッド型人工骨を作製する。

骨欠損へのハイブリッド型人工骨移植による骨再生医療の検討

で作製したハイブリッド型人工骨の骨欠損部への移植実験を行い、新しい骨再生医療の可能性について検討する。

・ウサギ大腿骨への移植

ウサギ大腿骨に直径 6 mm の骨欠損をトレフィンバーで作製し、ハイブリッド型人工骨を埋植し、2, 4, 8, 12 週後に屠殺して試料を摘出する。摘出標本の X 線評価および組織学的評価を行って、骨形成を評価する。

・ラット頭頂骨への移植

ラット頭頂骨に自己修復が不可能とされる直径 9 mm の骨欠損をトレフィンバーで作製し、ハイブリッド型人工骨を埋植し、2, 4, 8, 12 週後に屠殺して試料を摘出する。摘出標本の X 線評価および組織学的評価を行って、骨形成を評価する。

#### 4. 研究成果

低結晶性 CAp とコラーゲンの複合化

低結晶性 CAp・コラーゲン複合体は CAp 顆粒とコラーゲン溶液を混和した後、円柱状金型に CAp・コラーゲン混合液を充填し、凍結乾燥して作製した。複合体の作製条件として、顆粒径、混和するコラーゲン溶液の濃度、炭酸アパタイトとコラーゲン溶液の重量比について検討した結果、顆粒径は 300-600 μm (S サイズ) と 600-1000 μm (M サイズ) の 2 種類、コラーゲン溶液の濃度は 3%、CAp とコラーゲン溶液の重量比は 50% と 65% という条件で複合体の作製が可能であった。

続いて、熱架橋の有無について検討したが、熱架橋していない複合体は生理食塩水に浸漬すると溶解してしまったが、150 °C で熱架橋を行うことで溶解性が改善できた。

ウサギ頭頂骨への CAp-Col 複合体の埋植

の結果から、コラーゲン溶液の濃度を 3% とし、CAp とコラーゲン溶液の重量比を 50% と 65% とし、S サイズと M サイズの 2 種類の顆粒を用いて、埋植用の CAp-Col 複合体を 4 種類 (50S, 65S, 50M, 65M) 作製した。複合体をウサギ頭頂骨に埋植し、2, 4, 8 週後に摘出して組織学的評価を行った。骨欠損部に試料が緊密に埋植されている個体では骨形成は良好であったが、顆粒が骨欠損部外へ分散してしまった個体では骨形成が不十分であったことから、作製した複合体の操作性と安定性に問題があることが明らかになった。

そこで、150 °C で熱架橋を行った CAp-Col 複合体を埋植したところ、骨形成には影響はなく、操作性と安定性の改善が得られた。

iPS 細胞の分化誘導

骨再生医療の細胞ソースとして用いる iPS 細胞の培養系 (フィーダー細胞を用いた培養

とフィーダーレス培養) を確立し、その特性を検討した。免疫染色とアルカリフォスファターゼ染色の結果では、維持培養、凍結、解凍を繰り返し行った iPS 細胞が多能性を維持していることを確認した。本研究を行うためには、均質で十分な iPS 細胞のストックが必要であるが、ヒト iPS 細胞の増殖が遅く、細胞ストックの作成に時間を費やした。

続いて、iPS 細胞の間葉系幹細胞への分化誘導実験を行った。iPS 細胞を LIF 非存在下に血清を用いて培養して分化を誘導したが、分化効率が低く、次の骨芽細胞への分化誘導に進むことができなかった。

そこで、レチノイン酸を添加して iPS 細胞を培養した後、骨芽細胞分化培地で培養して、骨芽細胞への分化誘導を行ったが、やはり、分化効率が低く、一部しか骨芽細胞へ分化しなかった。

iPS 細胞と CAp-Col 複合体を用いたハイブリッド型人工骨の創製

iPS 細胞由来の骨芽細胞の培養ができなかったため、iPS 細胞と CAp-Col 複合体を用いたハイブリッド型人工骨は創製できず、次の骨欠損へのハイブリッド型人工骨移植による骨再生医療の検討もかなわなかった。

#### 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 2 件)

1. Fabrication and Physical Evaluation of Gelatin-Coated Carbonate Apatite Foam. Hara K, Fujisawa K, Nagai H, Takamaru N, Ohe G, Tsuru K, Ishikawa K, Miyamoto Y: Materials (Basel), 9(9): E711, 2016. doi:10.3390/ma9090711. (査読あり)
2. Effects of low crystalline carbonate apatite on proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow cells. Nagai H, Kobayashi-Fujioka M, Fujisawa K, Ohe G, Takamaru N, Hara K, Uchida D, Tamatani T, Ishikawa K, Miyamoto Y: J Mater Sci Mater Med, 26(2): 99, 2015. doi:10.1007/s10856-015-5431-5. (査読あり)

[学会発表](計 12 件)

1. 新規骨増生用バイオマテリアルとしての炭酸アパタイトの開発と薬事承認, 宮本 洋二. 第 62 回日本口腔外科学会学術大会, 2017 年 10 月 21 日 (京都).
2. 炭酸アパタイト・コラーゲン複合体を用いた骨再建に関する基礎的研究. 秋田和也, 福田 直志, 大江 剛, 藤澤 健司, 宮本 洋二. 第 62 回日本口腔外科学会学術大会, 2017 年 10 月 21 日 (京都).

3. 骨補填材としての炭酸アパタイトの開発と薬事承認に向けて. 宮本 洋二. 第47回日本口腔インプラント学会学術大会, 2017年9月24日(仙台).
4. 新規骨再生材料としての炭酸アパタイト・コラーゲン複合体の開発. 秋田 和也, 福田 直志, 大江 剛, 藤澤 健司, 宮本 洋二, 都留 寛治, 石川 邦夫. 第47回日本口腔インプラント学会学術大会, 2017年9月23日(仙台).
5. 低結晶性炭酸アパタイト顆粒の骨再生への応用 -ウサギ大腿骨内における組織学的検討-. 藤澤 健司, 秋田 和也, 福田 直志, 大江 剛, 高丸 菜都美, 都留 寛治, 石川 邦夫, 宮本 洋二. 第47回日本口腔インプラント学会学術大会, 2017年9月23日(仙台).
6. 低結晶性炭酸アパタイトを用いた骨再建に関する基礎的研究. 大江 剛, 藤澤 健司, 永井 宏和, 宮本 洋二. 第20回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会, 2016年12月3日(東京).
7. 低結晶性炭酸アパタイトのインプラント領域への応用 -イヌ顎骨へのインプラント体との同時埋植-. 藤澤 健司, 永井 宏和, 高丸 菜都美, 都留 寛治, 石川 邦夫, 宮本 洋二. 第46回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会, 2016年9月17日(名古屋).
8. 炭酸アパタイト被膜炭酸カルシウムを用いた新規骨置換材料による骨再生の試み. 大江 剛, 小林 真左子, 藤澤 健司, 永井 宏和, 宮本 洋二. 第46回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会, 2016年9月17日(名古屋).
9. 低結晶性炭酸アパタイトを用いた骨再生療法に関する基礎的研究. 大江 剛, 鎌田 久美子, 藤澤 健司, 永井 宏和, 宮本 洋二. 第19回日本顎顔面インプラント学会学術大会, 2015年11月28日(横須賀).
10. ゼラチン複合型炭酸アパタイトフォームの物理学的評価. 藤澤 健司, 永井 宏和, 高丸 菜都美, 大江 剛, 都留 寛治, 石川 邦夫, 宮本 洋二. 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 2015年11月10日(京都).
11. 低結晶性炭酸アパタイトの骨再建への応用 第1報 イヌ歯槽骨欠損部への移植. 永井 宏和, 藤澤 健司, 大江 剛, 小林 真左子, 高丸 菜都美, 工藤 隆治, 玉谷 哲也, 宮本 洋二. 第60回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会, 2015年10月16日(名古屋).
12. 低結晶性炭酸アパタイトの骨再建への応用 イヌ顎骨に作製した骨欠損部への移植. 永井 宏和, 藤澤 健司, 都留 寛治, 石川 邦夫, 宮本 洋二. 第45回公益社団法人日本口腔インプラント学会

学術大会, 2015年9月22日(岡山).

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

永井宏和 (NAGAI HIROKAZU)  
東北大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号: 50282190

##### (2) 研究分担者

宮本洋二 (MIYAMOTO YOUJI)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号: 20200214  
藤澤健司 (FUJISAWA KENJI)  
徳島大学・大学病院・講師  
研究者番号: 40228979  
玉谷哲也 (TAMATANI TETSUYA)  
徳島大学・大学病院・講師  
研究者番号: 30274236  
大江剛 (OHE GO)  
徳島大学・大学病院・助教  
研究者番号: 60432762

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4) 研究協力者

( )