

令和元年6月14日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15704

研究課題名(和文) 幹細胞の分化制御を指向した高架橋コラーゲン・スキャフォールドの開発

研究課題名(英文) Development of optimally cross-linked collagen scaffold directed to differentiation control of stem cells

研究代表者

加来 賢 (Kaku, Masaru)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30547542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細胞移植の際に使用するコラーゲン担体の架橋制御が、材料の機械的強度を変化させるだけでなく、間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を促進し得るのではないかとこの着想から、コラーゲン架橋の変化が間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響の解析を行った。骨芽細胞の培養系における架橋阻害剤の添加により、一定の条件下ではコラーゲンの産生量に影響を及ぼさず架橋のみを選択的に低下させることに成功した。更に架橋の変化は間葉系幹細胞の増殖、初期接着、骨芽細胞分化に影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではコラーゲン架橋の変化が間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に影響を及ぼすことを明らかにした。幹細胞の分化制御には多様な因子が影響を及ぼすことが知られているが、細胞外微小環境としてのコラーゲン、中でもその分子間架橋構造による分化制御は新たな知見である。架橋の変化による幹細胞の分化制御機構は、再生医療に広く使われるコラーゲンを基材とした移植担体や補填材の開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study is based on the idea that control of collagen cross-linking in collagen-based cell transplantation carrier not only changes the mechanical properties of the material but also can promote osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. The aim of this project was to analyze the effect of collagen crosslinking on osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. The addition of a crosslinking inhibitor in the osteoblast culture system under certain conditions has succeeded in selectively reducing collagen crosslinking without affecting the amount of collagen produced. Furthermore, it was revealed that changes in collagen crosslinking affect proliferation, initial adhesion, and osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells.

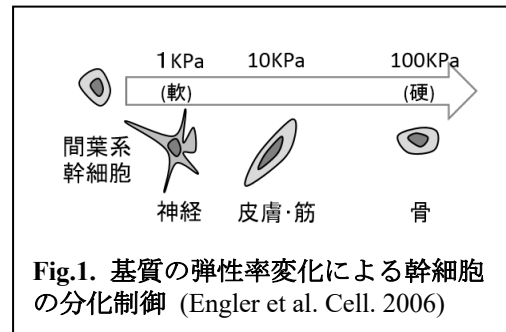
研究分野：歯科補綴学

キーワード：コラーゲン架橋 幹細胞 移植担体

## 様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周組織の再建は補綴前処置として有効であり、特にインプラント補綴の際の骨増成は広く行われている。細胞移植を伴う骨増成法において、担体の違いによって細胞の生着や分化効率、骨再生能が著しく異なることが報告されており、より効果的な移植担体の開発が急務である。移植担体には、移植に耐える強度、賦形性、細胞活性の維持、細胞分化制御能などが要求される。生体の組織中において、コラーゲンは生合成過程における一連の翻訳後修飾の結果として分子間架橋構造が形成され、強固な3次元構造の維持を可能としている。すなわち再構成コラーゲン・ゲルにおける架橋構造の再現が力学的特性の改良に有効であると考えられる。さらに近年の研究により、細胞を取巻く微小環境、とりわけ細胞外基質の弾性率の変化が細胞の分化に影響を及ぼすことが報告されている(Engler et al. 2006)。したがってコラーゲン・スキファールドにおける架橋の強化は材料の機械的強度を向上させるだけでなく、細胞の分化指向性を制御し得る可能性を示唆している。



### 2. 研究の目的

本研究では骨芽細胞への分化指向性を有する細胞移植担体の開発を可能とするために、コラーゲン架橋の変化が骨髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)8週齢雄性マウス(C57BL/6J)の骨髄から骨髄間質細胞を採取し、24時間以内に細胞培養皿に接着した細胞を骨髄由来間質細胞(BMSC)とした。培養液にはDMEM(含10%Fetal Bovine Serum, 1% antibiotics)を用い、得られた細胞は継代3回以内に使用した。

(2)架橋阻害剤であるβ-aminopropionitrile (BAPN, 0-2 mM)が骨芽細胞株(MC3T3-E1)に及ぼす影響を明らかにするため、細胞増殖能(MTS法)、遺伝子発現解析を行った。

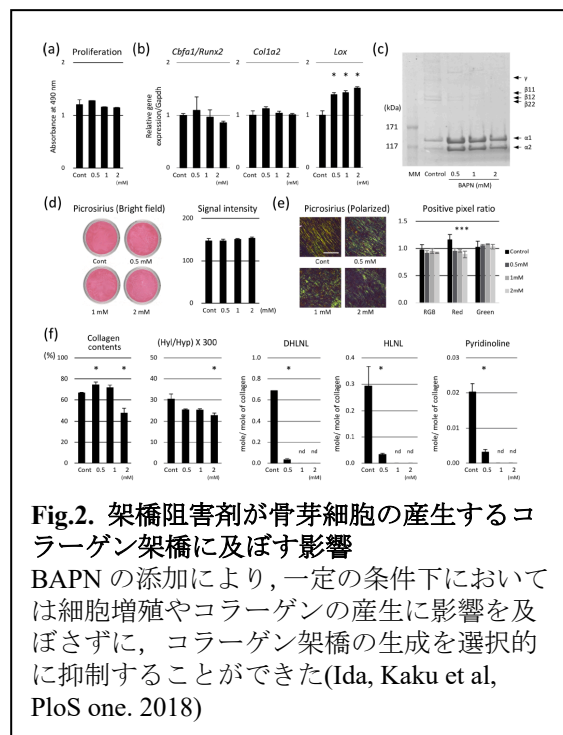
(3)MC3T3-E1細胞を架橋阻害剤(BAPN: beta-aminopropionitrile, 0-2mM)存在下で2週間培養し、架橋度の異なるマトリックスを作製した。培養液にはalpha-MEM(含10% Fetal Bovine Serum, 1% antibiotics, 50ug/ml Ascorbic acid)を用いた。得られたマトリックスにおける架橋の解析は、Picrosirius red染色, SDS-PAGE, HPLCにて行った。得られたマトリックスから細胞成分を除去するために0.5% Sodium deoxycholateにより10分間処理した。

(4)架橋の異なるマトリックス上にBMSC (2X10<sup>5</sup> cell/35mm dish)を播種し、細胞接着試験、細胞増殖能(MTS法)、骨芽細胞分化能(Alkaline Phosphatase活性、遺伝子解析)を行った。

### 4. 研究成果

BAPN添加によりMC3T3-E1の増殖能およびRunx2/Cbfa1, Col1a2遺伝子発現量に影響は認めなかったが、Lox遺伝子発現量はBAPN濃度依存的に上昇した。0.5-1.0 mMの濃度のBAPN添加により、コラーゲンの産生量に影響を及ぼさずにクロスリンクの形成を選択的に阻害することが可能であった。特に1 mMのBAPNでは、コントロールで検出された架橋(Pyridinoline, DHLNL, HLNL)量は検出限界以下にまで抑制された(Fig.2)。架橋の低下したマトリックス上に播種したBMSCsは、初期の細胞接着数の上昇、骨芽細胞分化誘導後の細胞増殖能、ALP活性、Alpl, Col1a2, Spp1遺伝子発現量においても上昇が認められた(Fig.3)。

以上の結果から、架橋阻害剤存在下における骨芽細胞の培養により、架橋度のみを選択的に変化させたコラーゲンシートを作製することに成功した。また架橋の変化はBMSCの骨芽細胞に影響を及ぼすことが明らかとなった。



また過去の報告から、骨髄由来間葉系幹細胞において、自身が産生する基質上では未分化能を維持するとの報告もあり(Chen et al. 2007), コラーゲンマトリックスによる幹細胞の特異的な分化制御機構のみならず、未分化維持機構との関連についても検討する必要があるから現在解析を進めている。

#### <引用文献>

1. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006; 126(4):677-89
2. Ida T, Kaku M, Kitami M, Terajima M, Rosales Rocabado JM, Akiba Y, Nagasawa M, Yamauchi M, Uoshima K. Extracellular matrix with defective collagen cross-linking affects the differentiation of bone cells. *PloS one*. 2018;13(9):e0204306.
3. Chen XD, Dusevich V, Feng JQ, Manolagas SC, Jilka RL. Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2007 Dec;22(12):1943-56.

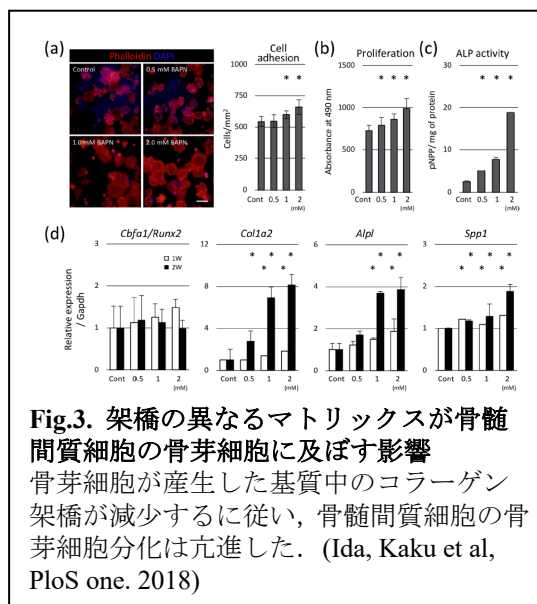
#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 22 件)

1. Rosales Rocabado JM, Kaku M, Nozaki K, Ida T, Kitami M, Aoyagi Y, Uoshima K. A multi-factorial analysis of bone morphology and fracture strength of rat femur in response to ovariectomy. *J Orthop Surg Res*. 2018 Dec;13(1):318. doi: 10.1186/s13018-018-1018-4.
2. Ida T, Kaku M, Kitami M, Terajima M, Rosales Rocabado JM, Akiba Y, Nagasawa M, Yamauchi M, Uoshima K. Extracellular matrix with defective collagen cross-linking affects the differentiation of bone cells. *PloS one*. 2018;13(9):e0204306. doi: 10.1371/journal.pone.0204306.
3. Kuroshima S, Kaku M, Ishimoto T, Sasaki M, Nakano T, Sawase T. A paradigm shift for bone quality in dentistry: A literature review. *J Prosthodont Res*. 2017 Oct;61(4):353-362. doi: 10.1016/j.jpor.2017.05.006.
4. Tabeta K, Du X, Arimatsu K, Yokoji M, Takahashi N, Amizuka N, Hasegawa T, Crozat K, Maekawa T, Miyauchi S, Matsuda Y, Ida T, Kaku M, Hoebe K, Ohno K, Yoshie H, Yamazaki K, Moresco EMY, Beutler B. An ENU-induced splice site mutation of mouse *Coll1a1* causing recessive osteogenesis imperfecta and revealing a novel splicing rescue. *Sci Rep*. 2017 Sep 15;7(1):11717. doi: 10.1038/s41598-017-10343-9.
5. Kaku M, Kitami M, Rosales Rocabado JM, Ida T, Akiba Y, Uoshima K. Recruitment of bone marrow-derived cells to the periodontal ligament via the stromal cell-derived factor-1/C-X-C chemokine receptor type 4 axis. *J Periodontal Res*. 2017 Aug;52(4):686-694. doi: 10.1111/jre.12433.
6. Kaku M, Komatsu Y. Functional Diversity of Ciliary Proteins in Bone Development and Disease. *Curr Osteoporos Rep*. 2017 Apr;15(2):96-102. doi: 10.1007/s11914-017-0351-6.
7. Kaku M, Rosales Rocabado JM, Kitami M, Ida T, Akiba Y, Yamauchi M, Uoshima K. Mechanical Loading Stimulates Expression of Collagen Cross-Linking Associated Enzymes in Periodontal Ligament. *J Cell Physiol*. 2016 Apr;231(4):926-33. doi: 10.1002/jcp.25184.
8. Kitami M, Kaku M, Rocabado JM, Ida T, Akiba N, Uoshima K. Prolonged Survival of Transplanted Osteoblastic Cells Does Not Directly Accelerate the Healing of Calvarial Bone Defects. *J Cell Physiol*. 2016 Sep;231(9):1974-82. doi: 10.1002/jcp.25302.

##### [学会発表](計 23 件)

1. 加来 賢: 骨質をコラーゲンの生合成から理解する. 海外の基礎研究はインプラント治療をどう変えたか? -From Bench to Clinic-第 48 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会, 大阪, 2018 年 9 月 16 日
2. Rosales Rocabado JM, Kaku M, Nozaki K, Ida T, Uoshima K: Influence of bone morphology over the bone mechanical properties of Osteoporotic rat models. 30<sup>th</sup> ASBMR 2016 Annual Meeting, Atlanta, Sep 19 2016.



3. 加来 賢: 骨質研究がもたらす歯科補綴の治療イノベーション. 第125回日本補綴歯科学会学術大会, 金沢, 2016年7月8日
4. 加来 賢, 北見恩美, Rosales Rocabado JM, 井田貴子, 秋葉陽介, 魚島勝美: SDF-1/CXCR4による歯根膜への骨髄由来細胞の誘導, 第125回日本補綴歯科学会学術大会, 金沢, 2016年7月8日
5. Rosales Rocabado JM, 加来 賢, 野崎浩佑, 井田貴子, 魚島勝美: Fracture Strength of Femoral Bone Increased by Gain of Cortical Bone Volume on Ovariectomized Rats, 第125回日本補綴歯科学会学術大会, 金沢, 2016年7月8日
6. Kaku M: Mechano-regulations of Collagen Biosynthesis and Related Cell Behaviors in Periodontal Ligament. International Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment. Lombok, Indonesia, Jan 10, 2016.
7. Ida T, Kaku M, Rosales Rocabado JM, Uoshima K., Osteoblastic Differentiation of BMSCs on Different Degree of Enzymatic Collagen Crosslinks. International Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment, Lombok, Indonesia, Jan 10, 2016
8. 加来 賢: コラーゲン生合成における翻訳後修飾とその分子機構, 第11回北里大学農医連携シンポジウム, 食と健康のつながり 生命を支える食のはたらき, 東京, 2015年11月29日
9. 加来 賢: 硬軟組織難治性疾患に対する組織再建と研究戦略, 硬軟組織の難治性疾患に対する病因解明と治療方法開発に向けての取り組み, 第124回日本補綴歯科学会学術大会, 大宮, 2015年5月30日
10. 井田貴子, 加来 賢, 北見恩美, Rosales Rocabado JM, 魚島勝美: コラーゲン架橋の変化は骨強度のみならず骨代謝に影響を及ぼす, 第124回日本補綴歯科学会学術大会, 大宮, 2015年5月30日
11. 井田貴子, 加来 賢, 北見恩美, Rosales Rocabado JM, 魚島勝美: コラーゲン・クロスリンクの変化は骨代謝に影響を及ぼす, 第47回日本結合組織学会学術大会, 東京, 2015年5月15日,
12. 井田貴子, 加来 賢, 北見恩美, Rosales Rocabado JM, 魚島勝美: 骨強度に重要なコラーゲン架橋の変化は骨代謝に影響を及ぼす, 第48回新潟歯学会 総会, 新潟, 2015年4月18日