

令和 5 年 7 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17119

研究課題名(和文)細胞膜由来ナノフラグメントを用いた新骨誘導材料の開発

研究課題名(英文)Development of a novel osteoinductive material using cell membrane nanofragments

研究代表者

ハラ エミリオ・サトシ(Hara, Emilio Satoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40779443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、研究代表者は、マウス大腿骨骨端部における初期骨形成過程を系統的に解析し、軟骨細胞由来の膜断片(ナノフラグメント)が骨形成の起点となることを見出した。また、培養細胞から単離した細胞膜ナノフラグメントを用いることで、わずか2日でin vitroにて石灰化を誘導することに成功した。本研究では、細胞膜ナノフラグメントを用いた骨再生誘導材料の開発を目的に、細胞膜ナノフラグメントの作製・単離法の確立を検討した。本研究の成果としては、細胞膜ナノフラグメントの単離法を確立した。また、これらの細胞膜ナノフラグメントを骨再生に用いることが可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しい骨形成誘導材料の開発は、顎顔面領域において顎骨再建や歯周組織再生、インプラント治療などの歯科治療の基盤となる骨再生につながり、社会的に大きな意義がある。本研究では、細胞成分(細胞膜ナノフラグメント)を基盤材料として新規骨誘導材料の開発を目的に、細胞膜ナノフラグメントの作製・単離法の確立に成功した。これらの細胞成分を用いたバイオハイブリッド材料の開発も期待できる。

研究成果の概要(英文)： We have previously analyzed the early process of bone formation in vivo, in mouse femur epiphysis. Interestingly, we found that cell (plasma) membrane nanofragments (PMNFs) were the nucleation site for bone formation. Moreover, isolation of PMNFs from cultured cells induced mineralization in just 2 days.

In this study, we aimed to establish a method for the preparation and isolation of PMNFs to develop a novel material for bone regeneration using PMNFs. The results of this study describe the methods for the isolation of PMNFs. It was also suggested that it is possible to induce bone regeneration using PMNFs.

研究分野：生体材料学、歯科医用工学・再生歯学、補綴系歯学

キーワード：生体材料 骨再生 組織工学 歯科医用工学・再生歯学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

骨組織は約70%の無機材料でできており、支持作用、器官保護作用、造血作用など重要な役割を果たす。近年、バイオミメティクス(生体模倣)に基づいた実験室(*in vitro*)で生体組織を作る試み(組織工学)が盛んである。しかし、骨組織の*in vitro*構築には、長期間(2~3週間)の培養によっても骨様の石灰化物が得られるのみである。これは、骨形成に関して多分野的統合研究があまりされておらず、骨形成機構について未だ不明な点が多く残っているためである。

これまでに申請者は、二次骨化部(大腿骨骨端部)における初期石灰化に着目し(*Hara et al., ACS Biomater Sci Eng, 2018*)、骨形成機構の解明に向けて生物学・材料学双方向の視点から研究を進めてきた。まず、マウス二次骨化は生後6日目から開始することを明らかにした。さらに興味深い事に、初期石灰化周囲の軟骨細胞が破裂し、その破裂から細胞膜ナノフラグメント(断片)が生成されることを見出した(*Hara et al., Integr Biol, 2018*)。さらに、この細胞膜ナノフラグメント(リン脂質)が足場となって石骨形成が開始することが分かった。実際に培養細胞から細胞膜断片を作製・回収し、その石灰化形成能を検討した結果、生細胞の場合21日程度かかる石灰化がわずか2日で起こることを明らかにした(*Hara et al., J Mater Chem B, 2018*)。これは実験室での骨組織作製を実現する材料としてナノフラグメントが高い可能性を有することを示した。これらの結果から、細胞膜ナノフラグメントが骨組織再生へ応用できる材料として高い可能性を有することを示した。

## 2. 研究の目的

本研究は、細胞膜ナノフラグメントを用いた骨再生誘導材料の開発を目的に、細胞膜ナノフラグメント作製方法の確立、ならびに細胞膜ナノフラグメントを用いた骨再生における細胞膜ナノフラグメント使用方法の最適化を検討した。

## 3. 研究の方法

細胞膜ナノフラグメントの生成・単離には5つの処理法を検討し、最適化を行った。細胞膜ナノフラグメントの石灰化については、アリザリンレッド染色による石灰化の確認を行った。石灰化物の定性解析はエックス線回折装置および電子線回折によって解析を行った。石灰化物の形態を電子顕微鏡で観察し、得られた画像をImage J(NIH)画像処理ソフトウェアを用いて解析を行った。

骨組織再生実験について、野生型マウス頭蓋骨に直径2mmのBiopsy punchを用いて骨欠損を作製し、細胞膜ナノフラグメントを移植した。移植前に細胞膜ナノフラグメントの事前処理(処理法“Y”)を行った。移植2、6週間後に組織を回収し、X線マイクロマイクロトモグラフィ(micro-CT)および組織切片・ヘマトキシリンエオシン染色による組織学的解析を行った。

#### 4．研究成果

細胞膜ナノフラグメントの生成・単離法について、処理法“X”では均一なナノフラグメントを生成・単離することができた。また、処理法“X”で得られた細胞膜ナノフラグメントは、他の方法と比べ、早期に石灰化することを確認した。

処理法“Y”の細胞膜ナノフラグメントをマウス頭蓋骨欠損部位に移植した結果、欠損部位が再生されたということが明らかとなった。一方、細胞膜ナノフラグメント移植無し(defect only)のコントロール群では、骨再生は認められなかった。

以上の結果から、本研究において、細胞膜ナノフラグメントの生成・単離法を確立し、また処理“Y”の細胞膜ナノフラグメントを骨再生誘導材料として用い、早期に骨再生を誘導することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kunitomi Yosuke, Hara Emilio Satoshi, Okada Masahiro, Nagaoka Noriyuki, Kuboki Takuo, Nakano Takayoshi, Kamioka Hiroshi, Matsumoto Takuya	4. 巻 107
2. 論文標題 Biomimetic mineralization using matrix vesicle nanofragments	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 1021 ~ 1030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36618	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 松本卓也, Hara ES.	4. 巻 37
2. 論文標題 骨組織発生の材料学的再検討が新しい骨組織工学につながる.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 バイオマテリアル	6. 最初と最後の頁 50-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 4件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 角谷宏一, Akhter NM, Hara ES, 岡田正弘, 佐々木朗, 松本卓也
2. 発表標題 軟骨細胞断片の石灰化能の検討
3. 学会等名 第40回岡山歯学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢部淳, 岡田正弘, Hara ES, 鳥井康弘, 松本卓也
2. 発表標題 軟組織接着システムの開発
3. 学会等名 第40回岡山歯学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akhter NM, Hara ES, 岡田正弘, 松本卓也
2. 発表標題 In vitro bioinspired rapid bone tissue synthesis by artificial cell nanofragments
3. 学会等名 The 4th International Symposium of Medical and Dental Education in Okayama (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akhter MN, Hara ES, Matsumoto T
2. 発表標題 Cell nanofragment-based bone-like tissue synthesis
3. 学会等名 3rd International Workshop on BioEngineering in Okayama Seminar (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akhter MN, Hara ES, Okada M, Matsumoto T
2. 発表標題 Analysis of cell nanofragment mineralization obtained by different fabrication methods
3. 学会等名 第 73 回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hara ES, Okada M, Matsumoto T
2. 発表標題 Fabrication of bone nanocomposite using cell-derived nanofragments
3. 学会等名 Opto X Nano 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hara ES, Matsumoto T
2. 発表標題 Bioinspired bone-like tissue synthesis using plasma membrane nanofragments
3. 学会等名 The 4th Meeting of the International Association for Dental Research - Asian Pacific Region (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hara ES
2. 発表標題 最初期骨形成過程の細胞化学・材料化学的解析
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hara ES
2. 発表標題 Biomaterials in Tissue Engineering
3. 学会等名 The 8th International Dental Conference in Hai Phong (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hara ES
2. 発表標題 細胞膜由来ナノフラグメントを用いた in vitro骨組織構築
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akhter NM, Hara ES, Farahat M, 岡田正弘, 松本卓也
2. 発表標題 細胞フラグメントを用いた三次元骨様組織の構築
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 12.Hara ES, 岡田正弘, 松本卓也
2. 発表標題 In vivo 石灰化における pH の影響
3. 学会等名 第 73 回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2019年

〔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
研究協力者	松本 卓也  (Matsumoto Takuya)		
研究協力者	岡田 正弘  (Okada Masahiro)		

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
---------	---------