

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15559

研究課題名(和文) 成育医療における骨・靭帯の生分解性足場材料の探索と融合蛋白質の創製

研究課題名(英文) Search for biodegradable scaffolding materials of bones and ligaments in growth and medicine and creation of fusion proteins

研究代表者

高山 真一郎 (TAKAYAMA, SHINICHIRO)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・臓器・運動器病態外科部・部長

研究者番号：40138045

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)：間葉系細胞を用いることで、目的の組織に関する機能を賦活させる再生誘導治療法は再生医療の一つと考えられている。間葉系細胞は高い増殖能・自己複製能と部分全能性の性質を合わせ持ち、細胞補充療法のための移植デバイスとしても注目されている。骨疾患は日常生活を営む上で誰にでも起こりうるものである。本研究において組換えタンパク質を用いた足場材料としての基盤的実験を行い、その有効性についての検証を終了した。

研究成果の概要(英文)：By using mesenchymal cells, regenerative induction therapy that activates functions related to target tissues is considered to be one of regenerative medicine. Mesenchymal cells have both high proliferative ability, self-replicating ability and partial totipotency properties, and are also attracting attention as a transplantation device for cell replacement therapy. Bone disease can occur to anyone in daily life. In this study, a basic experiment as a scaffold material using a recombinant protein was carried out and verification of its effectiveness was completed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小児運動器学 キメラタンパク質 再生医療 生分解性材料

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

骨組織の維持・再生に関する研究へ社会的注目が集まるようになって久しい。先天性・後天性の難治性骨欠損に加え加齢・閉経による骨粗鬆症、炎症性疾患による骨形成能低下など骨組織の再生医療が待ち望まれている疾患が多々存在する。近年、再生医学研究より組織構成要素である細胞が治療材料となり得る可能性が示されている。しかし、臨床応用のためには移植細胞のコントロール、移植方法の確立といった問題を解決する必要がある。

再生医療において細胞、培養担体および成長因子は組織再生のための必須要素である。このうち、培養担体は細胞が生着するための足場であるとともに、形態を維持するための骨格として重要な鍵となっている。我々はこれまでに骨髄中に存在する骨髄間質細胞の秘めた多分化能を明らかとし、生体吸収性材料である合成高分子に細胞親和性に富むコラーゲンを複合化した培養担体を用いて骨再生治療に対する組織工学的アプローチの提言を行ってきた。この培養担体は高い細胞保持性を有し、かつ生体内における形状保持性を有している優れたものではあるが、細胞の分化・成熟に必要なもうひとつの要素である成長因子は、外来よりの添加に頼らざるを得ない。

しかし、液性である成長因子を局所に止めることはできず、有効濃度を得るための大量投与はコストパフォーマンスが悪く、いばかりか望まない効果を誘発する可能性がある。この成長因子をいかに効率的に局所にとどめて薬物送達システムとして機能させることができるかが、再生医療

成否のもうひとつの鍵である。我々は細胞外マトリックスの代表的な細胞接着タンパクであるファイブロネクチンの持つコラーゲンへの高い結合性に注目した。再生足場材料を用いた骨再生の研究は、1988年 Maniopoulos らは、デキサメタゾン等を含む培地でのラット骨髄細胞を培養することにより骨様組織が形成されることを報告したのが最初である。同組織に細胞外マトリックス産生、骨芽細胞活性を同定した。さらに無機人工骨とともに骨髄間質細胞を培養することにより人工骨内の多孔質内に培養骨が形成され、動物実験においても移植後1週間で有意な骨形成を生ずることを明らかにした。ヒト骨髄間葉系細胞においても同様にヌードマウスへの移植において同様の骨形成能が検証されている。しかしながらヒト骨髄間葉系細胞は、現在までの方法では必要な量の細胞数を得るには至らず、広範な欠損に対する再建や骨粗鬆症、慢性関節リウマチに代表される自己の骨再生能の低下した患者に対する治療法としての限界があった。

2. 研究の目的

間葉系細胞を用いることで、目的の組織関する機能を賦活させる再生誘導治療法は再生医療の一つと考えられている。間葉系細胞は高い増殖能・自己複製能と部分全能性の性質を合わせ持ち、細胞補充療法のための移植デバイスとしても注目されている。骨疾患は日常生活を営む上で誰にでも起こりうるものである。これらの知見を基盤としたインテリジェント骨再生足場材料を用いた細胞移植を行うことで、いままで治療が困難であった

骨疾患が治癒する可能性を見出す。

3. 研究の方法

・コラーゲン複合化合成高分子シートの作製

生体吸収性合成高分子であるポリグリコール酸-ポリ乳酸共重合体(PLGA)からなるニットメッシュにアテロ化コラーゲンのマイクロスポンジを真空凍結乾燥法にて複合化させグルタルアルデヒド架橋を行う。メッシュの空隙をコラーゲンの網目で覆うことで細胞に対する親和性と表面積の増大を計る。

・キメラタンパクの作製

ヒト正常細胞に発現するファイブロネクチンの mRNA を鋳型として増幅させた相捕的 DNA 遺伝子配列の中から既知であるコラーゲン結合領域の遺伝子配列(約 1000 塩基)を酵素処理にて切り出す。同様に正常ヒト胎盤由来 mRNA を鋳型として骨形成タンパク BMP-4 の成熟型遺伝子配列(約 400 塩基)を抽出し、両者を連結したタンパク発現ベクターを作製する。大腸菌内に両遺伝子配列からキメラタンパクを合成させ抽出・精製を行う。

・シートへの組み換えタンパク複合化

作製したシートを、キメラタンパク溶液に浸漬することでコラーゲンマイクロスポンジ上へのタンパク複合化を得る。

4. 研究成果

シート上のキメラタンパク局在は生体外にて免疫組織学的に評価するとともに培養液中へのタンパク放出程度をファイブロネクチンの継時的な ELISA 法により推定する。キメラ化 BMP-4 の機能確認は培養未分化骨髄間質細胞へのキメラタンパクの添加お

よび複合化シートへの細胞播種実験により、骨分化マーカー遺伝子の発現、alkaline phosphatase 活性の定量にて行った。さらにこの複合化シートを単独または未分化骨髄間質細胞(国立成育医療研究センターにて承認された(承認受付番号 12-22 および 13-11) 研究者の研究室により分離培養した細胞表面マーカー、gene array を用いたプロファイリングを行い細胞の有する性格を詳細に検討されたもの)を播種した状態で免疫不全マウス(NOD/SCID/IL-2 ノックアウトマウス)へ移植し、骨への分化、骨再生方法を検討した。また各種条件下での足場の形態を確立した。加えて組織学的評価を通じて生体内における骨形成能と組織に対する毒性の有無を確認した。最終的には骨髄間質細胞を開発した骨再生足場材料に播種し、疾患モデルマウスへ移植することで、疾患の治療に有効であるかの評価を行った。間葉系細胞を用いることで、目的の組織関する機能を賦活させる再生誘導治療法は再生医療の一つと考えられている。間葉系細胞は高い増殖能・自己複製能と部分全能性の性質を合わせ持ち、細胞補充療法のための移植デバイスとしても注目されている。骨疾患は日常生活を営む上で誰にでも起こりうるものである。本研究において組換タンパク質を用いた足場材料としての基盤的実験を行い、その有効性についての検証を終了した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山真一郎（64）

国立成育医療研究センター・臓器・運動器

病態外科部 統括部長

研究者番号：40138045

(2) 研究分担者

梅澤明弘（57）

国立成育医療研究センター研究所再生医

療センター センター長

研究者番号：70213486