

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03837

研究課題名(和文)骨オルガノイドの生成期間短縮と物性制御を目指した材料学的アプローチ

研究課題名(英文) Organoid optimization for rapid bone mineralization and controlled products quality

研究代表者

松本 卓也 (Matsumoto, Takuya)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：40324793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年オルガノジェネシス研究が盛んとなっている一方、骨オルガノイド技術の応用にあたり、解決すべき問題が多く残っている。問題の1つは「時間の制御」であり、もう一つは「生成物の物性制御」である。本研究では(a)実際の骨組織発生過程を材料学的観点で再検討、(b)得られた結果を元に物理的、化学的人工環境をin vitroにて再現、構築、(c)この構築環境を利用した骨オルガノイド生成のコントロールを試み評価した。その結果、in vitroでの迅速石灰化物生成技術の開発やそのメカニズムの一端を解明するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、実際の生体骨生成過程を模倣し、再現するという新しいアプローチで骨ブロックともいえる微小骨の迅速石灰化ならびに物性制御の可能性を示すことに成功した。この骨ブロックは有機質を基材とした中で、細胞由来の石灰化物を自然析出させるものや、石灰化物を有機基材と混在してパターンニングするなど、これまでにない材料といえる。この微小骨を組織再生に応用する形での医療の実現は患者のQOL回復につながり、早期の社会復帰など社会的にも大きな意義があると思われる。

研究成果の概要(英文)：While organogenesis research has been paid tremendous attention in these years, there are still many problems to be solved when applying bone organoid technology. One of the problems is "Shortening of time" and the other is "control of physical properties of products". Here, in this study, (a) the actual bone tissue development process is reexamined from a material point of view, (b) the physical and chemical artificial environment is reproduced and constructed in vitro based on the obtained results, and (c). We tried and evaluated the control of bone organoid production using these constructed environments. As a result, we have developed an in vitro rapid mineralization methods and elucidated a part of the mechanism.

研究分野：歯科再生医学

キーワード：組織制御 時間空間制御 オルガノイド 骨組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年オルガノジェネシス研究が盛んとなり、様々なオルガノイド形成が報告されている。我々はこれまでに骨オルガノイド形成、さらに骨オルガノイド形成の先の技術として、形成したオルガノイドの成長制御を *in vitro* において進めてきた。具体的には、骨髄間葉系幹細胞をもとにした細胞凝集塊作りに 2009 年に成功し、2012 年に世界で初めて骨オルガノイド形成を報告している。さらに iPS 細胞を用いた骨オルガノイド形成や成長制御として 2015 年には三次元ハイドロゲル材料を利用した成長制御技術の手法を確立している。一方でオルガノイド技術の応用にあたり、様々な解決すべき問題が多く残っている。特に重要な問題の 1 つは「時間の制御」である。骨組織を例に挙げると、現在の骨オルガノイド形成では間葉系幹細胞の分化を進めたうえで石灰化を誘導するという過程を経る。その結果実際の石灰化組織を作るために 2-3 週間の時間を要する。この期間をできるだけ短縮することは単純かつ重要な問いである。もう一つの重要な問題は「生成物の物性制御」である。現在の骨オルガノイド形成では生成した石灰化物の定性評価がほとんどであり、生成物の結晶性や結晶配向など形成された石灰化物のクオリティ (品質) についてはほぼ議論されていない。しかし、今後の再生医療への応用を考えた場合、品質制御 (生成石灰化物の物性制御) は重要な問いである。

## 2. 研究の目的

本研究では骨オルガノイド生成の短縮化ならびに生成骨オルガノイドの物性制御を *in vitro* にて実現する技術開発を目的とする。本目的達成に向け、本研究では (a) 実際の骨組織発生過程を材料学的観点で再検討し、(b) 得られた結果を元に物理的、化学的人工環境を *in vitro* にて再現、構築する、(c) この構築環境を利用した骨オルガノイド生成のコントロールを試み評価する、という過程を順次進める。

## 3. 研究の方法

### a) 実際の骨組織発生過程を材料学的観点で再検討する

実験は ICR マウス発生初期の大腿骨、メッケル軟骨、フナの肋骨を利用した。マウス大腿骨については、生後 5 日目以降の大腿骨骨端部を用い、マウスメッケル軟骨については、胎児期 13 日目以降の組織を使用、異なるゲル硬さ環境での組織成長変化について検討した。フナ肋骨については生後 3 週目以降の組織を使用した。それぞれの組織について、異なる時期の組織切片像、電子顕微鏡像をもとに、組織形態変化、石灰化の拡大、石灰化物の同定を行った。さらに、同部位における pH について pH シートを用いた時間空間的变化を検討するとともに、生成石灰化物の定性・定量評価を電子線回折、フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) などを用いて詳細な検討を進めた。これらの結果をもとに、同部位における石灰化再現に向けた様々な環境条件を設定した。

### (b) 得られた結果を元に人工骨合成を *in vitro* にて再現、迅速石灰化を試みる

これまでの我々の研究で細胞を断片化させたナノフラグメントが高い石灰化誘導能を有することが分かっている。そこで、異なる細胞種 (軟骨細胞、骨芽細胞、線維芽細胞) による石灰化誘導能の違いについて検討した。また、回収されたナノフラグメントについても、超高速遠心分離を利用し、細胞膜成分、核成分、細胞質成分に分類し、それぞれの石灰化誘導能について検討した。さらに、種々のナノフラグメントを含有したコラーゲンゲルを準備し、ゲル石灰化を試み、迅速石灰化の可能性について評価した。石灰化の評価はアリザリンレッド染色、X 線回折により行った。

### (c) 得られた結果を元に人工骨合成を *in vitro* にて再現、生成骨物性制御を試みる

フナ肋骨の骨成長の検討結果から、この組織が無機リン酸カルシウム成分が層状に積層することでこの骨独特の強度としなやかさ、靱性を示すことが明らかとなった。そこで、本項目では無機リン酸カルシウムと結合剤としてのゼラチンを元に、3次元の層状構造体を作製した。研究では、さらに結合材としてのゼラチンとその架橋物質を応用することで、新たな有機/無機複合体を作製し、その物性変化について評価した。

#### 4. 研究成果

骨組織発生を材料学的に再検討した結果、大腿骨骨端部の石灰化では細胞膜断片の核形成部位としての働きに加え、この結果生じる石灰化小球の融合においてコラーゲン線維や細胞膜断片が粘結剤として働くことを見出した。また、メッセル軟骨は異なる硬さ環境で異なる組織形態変化、物性変化を示した。特に 10 kPa 近辺で石灰化促進に働くこと、40 kPa 以上で軟骨組織の吸収促進が生じることを見出した。さらに肋骨組織は特有の層状構造を有し、独特の強度としなやかさを合わせ持つことが示された。

そこで、これら結果を元に、*in vitro*での迅速石灰化を試みたところ、軟骨細胞の利用がもっとも高い石灰化誘導能を示すことが明らかとなった。また、細胞全体、および超高速遠心分離を利用し、細胞膜成分、核成分、細胞質成分に分類し、それぞれの石灰化誘導能についても検討し、全細胞の粉碎物がもっとも高い石灰化誘導能を示すことが明らかとなった。次に、細胞粉碎時間と石灰化誘導能との関係について検討した。その結果、超音波粉碎 3 分以上で作製したナノフラグメントが高い石灰化誘導能を示すことが明らかとなった。これら結果を元にコラーゲンゲル内での石灰化誘導を進めた結果、わずか 48 時間以内でゲル内を石灰化物が占める状態が観察された。

また、これら機械的刺激に関連した石灰化促進、軟骨吸収に関わる分子メカニズムの検討を進めた。ここでは、部位特異的に前後部では石灰化を、また、中部では軟骨吸収を示すメッセル軟骨に着目し検討を進めてきた。ここにおいて、インテグリン 1 に関連した YAP の発現、また、これらに関連した MMP-1, 13 の発現変化を明らかにした。

さらに、無機リン酸カルシウムと結合剤としてのゼラチンを元に、3次元の層状構造体を作製した。異なる濃度のゼラチン、その架橋物質を応用することで、新たな有機/無機複合体を作製し、異なる条件での無機/有機複合体の物性を評価した。その結果、ゼラチン濃度 10wt%以上で、無機リン酸カルシウムの層状間が完全にゼラチンで充満され、その濃度を変えることで強度の制御 (0-20 MPa) に成功した。さらにグルタルアルデヒドの架橋を実践すること少量のゼラチンで高い機械的強度 (約 40 MPa) の層状人工骨の再現に成功した。

このように本研究では、実際の生体骨生成過程を模倣し、再現するというこれまでにないアプローチで骨ブロックともいえる微小骨の迅速石灰化ならびに物性制御の可能性を示すことに成功した。この実現は患者の早期 QOL 回復につながり、社会的にも大きな意義がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Farahat M., Kazi G.A.S., Hara E.S., Matsumoto T.	4. 巻 100
2. 論文標題 Effect of Biomechanical Environment on Degeneration of Meckel 's Cartilage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 171 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034520960118	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 Akhter Mst Nahid, Hara Emilio Satoshi, Kadoya Koichi, Okada Masahiro, Matsumoto Takuya	4. 巻 21
2. 論文標題 Cellular Fragments as Biomaterial for Rapid In Vitro Bone-Like Tissue Synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5327 ~ 5327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155327	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 Jiao Yu Yang, Okada Masahiro, Hara Emilio Satoshi, Xie Shi Chao, Nagaoka Noriyuki, Nakano Takayoshi, Matsumoto Takuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Micro-Architectural Investigation of Teleost Fish Rib Inducing Pliant Mechanical Property	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 5099 ~ 5099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13225099	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 Kunitomi Y, Hara E.S., Okada M, Nagaoka N, Kuboki T, Nakano T, Kamioka H, Matsumoto T	4. 巻 107
2. 論文標題 Biomimetic mineralization using matrix vesicle nanofragments.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res 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, ハラ エミリオ サトシ	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 -

1. 著者名 Farahat Mahmoud, Hara Emilio S., Anada Risa, Kazi Gulshan A.S., Akhter Nahid M., Matsumoto Takuya	4. 巻 N/A
2. 論文標題 Mechanotransductive Mechanisms of Biomimetic Hydrogel Cues Modulating Meckel's Cartilage Degeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Biology	6. 最初と最後の頁 2101315 ~ 2101315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adbi.202101315	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 Hara Emilio Satoshi, Okada Masahiro, Nagaoka Noriyuki, Nakano Takayoshi, Matsumoto Takuya	4. 巻 28
2. 論文標題 Re-Evaluation of Initial Bone Mineralization from an Engineering Perspective	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part B: Reviews	6. 最初と最後の頁 246 ~ 255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEB.2020.0352	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 Sasaki Jun-Ichi, Abe Gabriela L, Li Aonan, Matsumoto Takuya, Imazato Satoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Large three-dimensional cell constructs for tissue engineering	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science and Technology of Advanced Materials	6. 最初と最後の頁 571 ~ 582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14686996.2021.1945899	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 Okada Masahiro, Hara Emilio Satoshi, Kobayashi Daisuke, Kai Shoki, Ogura Keiko, Tanaka Masaru, Matsumoto Takuya	4. 巻 2
2. 論文標題 Intermediate Water on Calcium Phosphate Minerals: Its Origin and Role in Crystal Growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 981 ~ 986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.9b00014	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Hara Emilio Satoshi, Oozawa Susumu, Nagaoka Noriyuki, Okada Masahiro, Kasahara Shingo, Matsumoto Takuya	4. 巻 2
2. 論文標題 Nanostructural analysis of distinct nucleation sites in pathological mineralization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Advances	6. 最初と最後の頁 4423 ~ 4431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1MA00273B	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本卓也
2. 発表標題 材料科学の視点による骨石灰化の再評価と骨の新しい作り方への応用
3. 学会等名 歯科基礎医学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本卓也
2. 発表標題 材料学的アプローチによる硬組織発生探索と骨迅速再生技術構築に向けた展開
3. 学会等名 日本再生医療学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本卓也
2. 発表標題 機械的刺激をベースにした骨発生の理解とその応用
3. 学会等名 日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本卓也
2. 発表標題 骨迅速石灰化への取り組み
3. 学会等名 日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本卓也
2. 発表標題 硬組織生成を模倣したアパタイト系接着材の開発
3. 学会等名 岡山県医用工学研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 村上伸也、網塚憲生、齋藤正寛、松本卓也	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 340
3. 書名 歯科再生医学	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨再生材料及びその製造方法	発明者 松本卓也、ハラ エ ミリオ	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-179245	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	山本 雅哉  (Yamamoto Masaya)  (10332735)	東北大学・工学研究科・教授    (11301)	

	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	岡田 正弘  (Okada Masahiro)	岡山大学	
研究協力者	ハラ エミリオ  (Hara Emilio)	岡山大学	

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