

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：33924

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05701

研究課題名(和文) ラテックスナノ粒子を補強粒子かつ細胞分化の増強因子に用いた新規軟骨組織の創成

研究課題名(英文) Fabrication of new cartilage tissues using latex nanoparticles as reinforcing particles and enhancing factors of cell differentiation

研究代表者

岡本 正巳 (OKAMOTO, MASAMI)

豊田工業大学・工学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：60288553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：天然ゴムラテックス(NRL)ナノ粒子の精密な構造解析を行い、NRL粒子の細胞毒性の研究を基に、癌細胞に対する標的選択性とプログラム細胞死が癌細胞に誘導されることを実証し、抗癌活性としての薬理効果を見いだした。さまざまな細胞機能(細胞接着、分化、シグナル伝達経路など)を調節できる新規生物活性物質としてのNRL粒子の開発と、NRL粒子と細胞との間の物理化学的相互作用の評価を行った。最近の進歩としてNRL粒子の骨および軟骨分化誘導についても研究し、NRLナノ粒子を導入した生体コンポジットの創成に初めて成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高分子ナノコンポジット研究を基盤として生体組織工学に向けた「生体コンポジット」という新しい研究領域をつくることに挑戦した。軟骨の再生は重要かつ緊急の課題であり、臨床的にもその必要性は極めて高いために、in vitro培養による軟骨組織形成の研究が注目されている。NRLの薬理的用途としての可能性は高いものの、NRLナノ粒子の細胞毒性に関しては十分に理解されてこなかった。そこで申請者はNRL粒子表面のタンパク質にhMSCの増殖や軟骨細胞への分化に効果があることを、マーカー遺伝子解析によって見いだした。さまざまな細胞機能を調節できる新規生物活性物質としてのNRLナノ粒子の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：we conducted a precise structural analysis of natural rubber latex (NRL) nanoparticles, and based on the cytotoxicity research of NRL particles, we demonstrated that target selectivity and programmed cell death were induced in cancer cells. , found pharmacological effects as anticancer activity. He developed NRL particles as novel bioactive substances that can modulate various cellular functions (cell adhesion, differentiation, signaling pathways, etc.) and evaluated the physicochemical interactions between NRL particles and cells. His recent advances include research on the induction of bone and cartilage differentiation by NRL particles, and he was the first to successfully create a bio-composite incorporating NRL nanoparticles.

研究分野：生体組織工学

キーワード：ラテックス 軟骨再生 生体コンポジット 細胞機能 薬理効果

研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

軟骨組織は本質的に無血管であるため自己治癒能力が低く、自然治癒による再生が困難である。軟骨損傷は主に、外傷、関節炎、骨壊死、過度の荷重、加齢に伴う変形（変形性関節症）により引き起こされる。変形性関節症の発生割合は、60歳以上の男性で10%、女性で15%である。今後も老化や肥満のためにこれらの数字は増加する可能性が極めて高い。従って軟骨の再生は重要かつ緊急の課題であり、臨床的にもその必要性は極めて高い。

現在の治療には、微小挫傷に対するマトリックス関連自己軟骨細胞移植（MACT）が検討されている[1]。MACTは、患者から軟骨細胞を採取し、それを生体外で増殖させて再び患者の軟骨組織に戻すことによって、軟骨修復誘導を試みる手法である。この方法によっていくらかの満足いく修復結果が得られているが、依然として長期再生には不満足なものである。さらに、微小破壊はより小さい欠陥に限定されており、MACTは極めて高価であり、2回以上の外科手術の介入によるリスクが大きいことが課題となっている[2]。

2. 研究の目的

本研究目的は、幹細胞を用いてインビトロ（生体外）培養にて軟骨組織の発生過程において、軟骨分化誘導を促進させながら、天然の軟骨細胞外マトリックス組成物を模倣し、同様の力学的特性を特徴とする優れた硝子軟骨組織を創成することである。

そのために、補強粒子かつ細胞分化の増強因子として作用するラテックスナノ粒子（弾性率 1 MPa）を用いて、ヒト間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化し、それを成熟されることで、これまで実現されていない力学的強度に優れた新奇な硝子軟骨組織を、人体にアレルギー反応を引き起こすことのない低いラテックス濃度において創成する。

3. 研究の方法

ラテックスナノ粒子（NRL）溶液サンプル(固形分 35.3 質量%)は、住友理工株式会社(日本)から提供を受けた。NRL ナノ粒子の特性評価については、以前の論文[3]ですでに説明した。

遺伝子発現解析：スフェロイドを形成するために、ヒト間葉系幹細胞（hMSC）（タカラバイオ）を EZsphere® 96 ウェルプレート(Iwaki)に播種し、間葉系幹細胞増殖培地(タカラバイオ)中で 37° C、5% CO₂ で 24 時間インキュベートした。スフェロイド形成後、培養液を NRL (0.32 mg/mL)を含む軟骨形成分化培地に変更し、各ウェルに投与した。3 日後、スフェロイドをそれぞれ 2×10⁵ 細胞の濃度でマイクロチューブに移した。スフ

フェロイドは、37° Cで正常酸素(5% CO₂、20% O₂)および低酸素(5% CO₂、1% O₂) の異なる時点(3、7、14、および21日目)に回収した。培地は3日ごとに交換した。hMSCの遺伝子発現解析は、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)(Light Cycler® 96:Roche)を用いて、Transcriptor Universal cDNA Master(Roche)のプロトコールに従って行った。統計解析は、Tukey-Kramerの事後検定を用いて行った。

原子間力顕微鏡(AFM)によるスフェロイド剛性の測定： AFM(SPM-9700HT、島津製作所)マイクロインデンテーションは、hMSCベースのスフェロイドの高さ画像、接着力、弾性率を含むスフェロイド剛性について21日間インキュベートして行った。AFM測定に先立ち、各スフェロイドをカーボンテープで固定し、PBSに浸漬して乾燥を防いだ。弾性率は、Johnson-Kendal-Roberts (JKR) 2点法により決定した。

4. 研究成果

遺伝子発現解析： 低酸素下でのHIF-1 α レベルは、正常酸素症と比較して、14日目にインキュベートされたhMSCで著しく増加した。低酸素状態におけるSOX9の発現は、培養後21日間で徐々に増加した(図1)。しかし、NRLの有無にかかわらず、スフェロイド間に統計的な違いはなかった。アグリカンの発現は、対照群と比較して21日目で6倍以上であり、NRLナノ粒子で培養した軟骨が大量のアグリカンを産生していることが示唆された。Col-IIは14日目にアップレギュレーションされた。NRL負荷スフェロイドの発現レベルは、コントロールと比較して4倍以上です。スフェロイドではSOX9、アグリカン、Col-IIの発現レベルが高く、低酸素状態でのNRLナノ粒子の投与により軟骨形成分化がうまく誘導されることを示した。

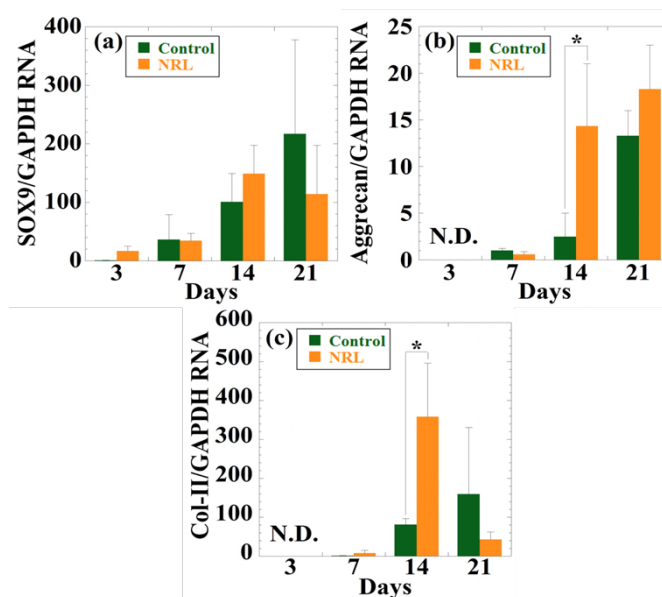


図1. 低酸素状態で異なる時間間隔(3~21日)で0.32 mg / mLのNRLナノ粒子で培養した

hMSC および hMSC の(a)SOX9 および (b)アグリカン、(c)Col-II 発現の RT-PCR 分析。データは、(a)については3日目、(b)および(c)については7日目の対照データに正規化され、平均±S.D. (n=3)として表示した。* : p<0.05。N.D. は、データが検出されなかったことを示す。

軟骨表面の弾性・接着性：PBS 中の固定軟骨細胞スフェロイド構造を CCD カメラで撮影した。異なる濃度の NRL ナノ粒子で培養したスフェロイド(~600 μm)では、得られたトポグラフィーの画像は、対照(すなわち、NRL ナノ粒子なし)と比較して、20 x 20 μm²で滑らかな表面形態を示した。低酸素状態で 0.1、0.32、1.0 mg/mL の3種類の濃度の NRL ナノ粒子で培養したスフェロイド(~600 μm)のくぼみ領域について、20×20 μm²(256点)の接着力とヤング率マップを構築した (図2)。

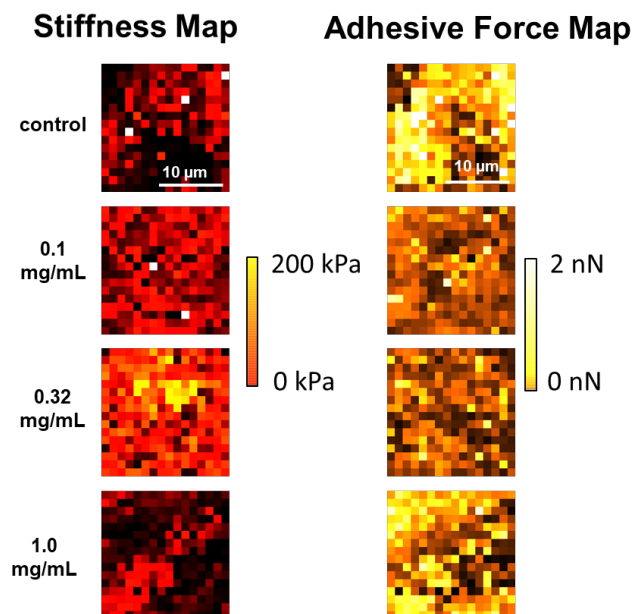


図2. (a) NRL ナノ粒子なし(コントロール)および (b) 0.1 mg/mL、(c) 0.32 mg/mL、(d) 1.0 mg/mL の濃度の NRL ローディングスフェロイドをヒートマップとして表したヤング率の結果。ヒートマップとして表される接着力の結果: (e) 選択した 20 x 20 μm²の領域から得られた(f) 0.1 mg/mL、(g) 0.32 mg/mL、(h) 0 mg/mL の濃度の NRL ローディングスフェロイドおよびコントロール。

剛性の不均一性は、AFM 圧痕によっても検出された。変形の初期段階 (アプローチカーブに対応)では、周囲の回転楕円体表面の組成が深く観察される。観察された不均質構造では、接着力の引き込み曲線 (除荷力)の変形率が大きいことがわかる。

スフェロイドの接着力ヒストグラムも同様に調査された。NRL ナノ粒子を使用せずに培養したスフェロイドは、NRL を充填したスフェロイドと比較して、幅広い力分布

を示した。評価された平均接着力は、コントロールおよび NRL ロード (0.32 mg/mL) スフェロイドでそれぞれ 545 pN および 244 pN であった。この結果は、上記で仮定したように、回転橢円体内の硬い表面構造の相互作用によるものである可能性がある。

<参考文献>

- [1] C.L. Camp ら *Sports Health*, **6**, 265, 2014.
- [2] C. Erggelet ら *J. Clinical Orthopaedics and Trauma*, **7**, 145, 2016.
- [3] M. Furuya ら *Materials Today Chemistry*, **5**, 63, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuki Okamoto, Masami Okamoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Biocomposites composed of cartilage and natural rubber latex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int Phys Med Rehab J.	6. 最初と最後の頁 40-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15406/ipmrj.2023.08.00331	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 岡本正巳	4. 巻 6
2. 論文標題 生体コンポジット	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本ゴム協会誌	6. 最初と最後の頁 1-4
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 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 Yuki Okamoto, Masaya Kinoshita, Masami Okamoto	4. 巻 6
2. 論文標題 Fabrication of cartilage/natural rubber latex biocomposites derived from human mesenchymal stem cells in hypoxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanocomposites	6. 最初と最後の頁 137-148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/20550324.2020.1851438	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 Kinoshita M., Okamoto Y., Furuya M., Okamoto M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Biocomposites composed of natural rubber latex and cartilage tissue derived from human mesenchymal stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials Today Chemistry	6. 最初と最後の頁 315 ~ 323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mtchem.2019.03.002	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Masami Okamoto
2. 発表標題 Fabrication of cartilage/natural rubber latex biocomposites derived from human mesenchymal stem cells
3. 学会等名 1st State Congress of Students of Science and Engineering of Materials (CEECIM) 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masami Okamoto
2. 発表標題 Fabrication of cartilage/natural rubber latex biocomposites derived from human mesenchymal stem cells
3. 学会等名 2nd Global Summit on Biomaterials and Applications (GSBA2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masami Okamoto, Masaya Kinoshita
2. 発表標題 Cytotoxicity and anticancer activity of natural rubber latex particles for cancer cells
3. 学会等名 International conference on Materials Science Engineering and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masami Okamoto
2. 発表標題 Fabrication of cartilage/natural rubber latex biocomposites derived from human mesenchymal stem cells
3. 学会等名 International Polymer Processing Society 37 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本祐樹、岡本正巳
2. 発表標題 低酸素濃度における間葉系幹細胞の軟骨分化：天然ゴムラテックス添加軟骨組織の構造と物性
3. 学会等名 日本ゴム協会2020年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本祐樹、岡本正巳
2. 発表標題 低酸素濃度における間葉系幹細胞の軟骨分化
3. 学会等名 第32回高分子加工技術討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本祐樹、木下雅也、岡本正巳
2. 発表標題 低酸素濃度における間葉系幹細胞の軟骨分化：天然ゴムラテックスの添加効果
3. 学会等名 日本ゴム協会2019年年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下雅也、岡本祐樹、岡本正巳
2. 発表標題 低酸素濃度における間葉系幹細胞の軟骨分化：天然ゴムラテックス添加軟骨組織の構造と物性
3. 学会等名 第30回エラストマー討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Okamoto, M. Kinoshita, Y. Okamoto
2. 発表標題 Biocomposites composed of natural rubber latex and cartilage tissue derived from human mesenchymal stem cells
3. 学会等名 ADVANCES IN POLYMER SCIENCE AND RUBBER TECHNOLOGY 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masami Okamoto	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 492
3. 書名 Handbook of Chemistry Manufacture and Applications of Natural Rubber	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Welcome to Okamoto Laboratory https://www.toyota-ti.ac.jp/Lab/Zairyo/5z50/okamoto.htm Welcome to Okamoto Laboratory https://www.toyota-ti.ac.jp/Lab/Zairyo/5z50/okamoto.htm
--

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

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