

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10172

研究課題名(和文) PDGFR (+)間葉系幹細胞誘導システムを用いた新規骨置換材料の開発

研究課題名(英文) Development of novel bone replacement material using PDGFRa(+) mesenchymal stem cells migration system

研究代表者

森川 暁 (MORIKAWA, Satoru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：00424169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：定量的骨形成能を評価するためのin vivo評価系を構築するため、マウスおよびラットでの定量的骨形成能を評価するモデルの確立に取り組んだ。現在新規骨補填材料の評価系を構築するべく、臨床で用いられている(適応が認められている)ガイストリッチバイオオス、b-TCP、炭酸アパタイトを用いて、自家骨置換率を組織化学的に検証している。引き続き「抗菌性」、「臨床操作性に優れた形状」、「高い自家骨置換率を達成するための骨誘導能」、「内在性間葉系幹細胞集積機能」を有した新規骨疾患治療用材料の開発を進めている状況である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨吸収疾患、骨欠損疾患に対する既存の骨補填材を用いた治療は、一定の効果を上げているものの、安全性や適応外使用、臨床的ハンドリングなどの改善点を多くかかえている。本研究では、骨リモデリング機能を強化させ、さらに生体に内在する幹細胞を再生させたい場所に誘導する「幹細胞誘導システム」を付与する幹細胞誘導型硬組織再建・再生材料の開発を目指した研究課題である。本研究における社会実装＝「口から食べることによる健康寿命の延伸」を、全ての医療機関のすべてで実現できるように、外部から幹細胞を移植する細胞治療は行わず、動物由来材料に依存しない多機能型新規骨補填材の社会実用に向けた成果の一つを得られた。

研究成果の概要(英文)：In order to establish an in vivo evaluation system for quantitative bone formation, we worked on the establishment of models to evaluate quantitative bone formation in mice and rats. In order to establish an evaluation system for new bone replacement materials, we are now histochemically examining the autogenous bone replacement rate using clinically used (approved) Biomaterials, b-TCP, and carbonate apatite. We continue to develop new materials for bone disease treatment that have "antibacterial properties," "a shape with excellent clinical usability," "osteoinductive ability to achieve a high autogenous bone replacement rate," and "intrinsic mesenchymal stem cell accumulation function."

研究分野：再生医学

キーワード：新規骨補填材 自家骨置換 骨誘導能 定量的骨欠損モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科・口腔外科領域が対象とする疾患は、主に歯や骨組織などの硬組織疾患であり、硬組織の温存・再建・再生をいかに達成し、患者 QOL に貢献するかに重点が置かれている。そして歯槽骨再生や顎骨組織の増生においては、国内外においてウシ骨などのゼノグラフトによる治療が適応外使用も含めて広く紹介、あるいは行われており、一定の効果は上げている。

しかしながらこれらの臨床術式は臨床的・基礎的観点から、次の(1)～(5)の問題点を抱えている。(1)ウシやブタなどの動物由来材料であること。(2)完全に吸収されることはなく、生体に残存すること。(3)再生組織は、患者由来と動物材料由来のハイブリッド組織であるため、実際どのようなメカニズムで再生現象が起こっているのかが不明であること。(4)このような治療法はこれ以上の科学的進歩が難しく、同じ硬組織疾患をあつかう整形・形成外科領域への応用や発展は望めないこと。(5)臨床成績が良好とされている脱タンパクウシ骨+ブタコラーゲン膜による口腔インプラント周囲骨増生治療は適応外使用であること、の5点が挙げられる。そこで申請者はこれらの課題をすべて克服し、さらに幹細胞誘導システムを有した骨置換材料を開発するための基盤・臨床一体型研究を立ち上げ、本研究課題を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は生涯に渡って口から食べることを支援する安全な治療を行うことによって、健康寿命の延伸に貢献、寄与することである。その目的達成のための手段として、理工学部と協力し、新規骨置換材の骨リモデリング機能を強化させ、内在性の間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; MSCs) をリコンビナント成長因子によって骨再生部位に積極的に誘導させる「MSCs 誘導型骨置換材」を提案した。本研究における社会実装 = 「口から食べることによる健康寿命の延伸」を1～3次医療機関のすべてで実現できるように外部から幹細胞を移植する細胞治療は行わず、動物由来材料に依存しない、内在性 MSCs を活性化させる骨疾患治療の実現へ向けた基盤研究を行うことを目的とした。対象疾患は抜歯による小型骨欠損から、歯周組織再生療法、口腔インプラント骨増生術、顎裂骨移植から大腿骨頭壊死などの大型骨欠損を想定した。

本研究課題は(1)自家骨に置換するために骨リモデリング能を有する。(2)周囲からの血管と細胞の誘導に最適な構造を有する。(3)MSCs が発現している細胞表面抗原を利用して、誘導・遊走させることで、生体治癒機能を最大限に発揮する。(4)動物由来材料に依存しないことで安全性を担保する。(5)臨床医が使用しやすい形態、具体的には顆粒状ではなく、綿状あるいはペースト状を選択できる。この(1)～(5)を満たすことによって、歯周組織再生療法および口腔インプラント骨増生治療から、大腿骨頭壊死などの大型骨欠損再生療法等の臨床応用へ展開する。申請者がこれまで行ってきた研究結果から得られた知見をもとに、理工学部との連携を密にして課題を遂行していくこととした。新規骨置換材のベースとなる材料開発はすでに進んでおり、これまでの骨補填材料にはない「骨誘導」能を有する機能の獲得を目指す。再生させたい部位への積極的な血管誘導、そして生体内に内在する MSCs を積極的に誘導するために、血小板由来増殖因子 (Platelet derived growth factor; PDGF) を組み込む。この根拠として、申請者らのこれまでの研究成果として、ヒトおよびマウス MSCs に特異的な細胞表面抗原を同定することに成功している。ヒトおよびマウス MSCs は細胞表面に PDGF 型受容体 (Platelet derived growth factor receptor ; PDGFR) を発現しており、リン酸カルシウムに PDGF を組み込むことで全身の MSCs が誘導され、骨組織を形成することも確認している。本研究課題を通して、材料 成長因子 組織幹細胞 動物実験 画像/組織評価において臨床教室・基礎教室・理工学部も含めた連携がそれぞれの強みを活かして有機的な結びつきを創造し、その成果による社会実装を果たすことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題で開発する骨置換材は、これまでの研究をベースにそのまま臨床応用可能な安全性と有効性を担保するために、*in vitro* では化学的および材料学的実験を行い、骨代謝能を向上させるために破骨細胞による吸収 = 生体吸収性の向上を目指す。骨再生を期待する部位には、生体に存在する MSCs を積極的に誘導させる事を目的に、リコンビナント成長因子である PDGF を最適な濃度で組み込む。また、マウス・ラットによる動物も含めた移植方法および治療効果と安全性評価を行う。

- (1) リン酸カルシウム + ポリ乳酸 + 炭酸カルシウムに PDGFBB を組み込むことによる PDGFR (+)MSCs 誘導型骨置換材の開発

本研究課題の開始時は -リン酸三カルシウム (beta-Tricalcium phosphate; TCP) + ポリ乳酸 + 炭酸カルシウムをベースの材料とし、開発を進めていた。自家骨置換するために必要と考えられている破骨細胞による吸収 = 生体吸収性の確認を行っており、材料表面の 3D 構造を変えることによって破骨細胞が活性化しやすい構造と、周囲の血管と細胞が流入可能な多孔質構造を付与する実験を開始した。

- (1)- 綿状とペースト化による適応症例に最適化した形状の開発：現時点では綿状の形状であるが、複雑な骨欠損部に充填する場合や、椎体の圧迫骨折等の生体深部に骨置換材を送り込めることが望ましい臨床ケース、CAD/CAM による 3D プリンティングによるオーダーメイド骨置換

材への展開も予定していることから、ペースト化に取り組んでいる。具体的には TCP よりも溶解性に勝る TCP を加えることで、「骨リモデリング機能を有するペースト化骨置換材」を目指す。

(1)- 内在性 PDGFR (+)MSCs を誘導するための PDGFBB の組み込み：移植部位の骨再生現象をより強化するため、MSCs を誘導する仕組みを開発する。生体に存在する MSCs は PDGFR を発現していること、そしてこれらの細胞は受容体に対するリガンドである PDGFBB が徐放されている部位に集積する性質があることを実験的に証明している。PDGFBB の徐放スピードのコントロールは、静電的結合の強さ (+と-の強さ) を利用する予定である。

(2) マウス・ラットによる定量的硬組織欠損モデル作製と移植方法の確立・術後組織反応の評価

本課題はヒト臨床応用を前提としているため、定量的な評価が可能な動物実験による治療の効果判定は必須であると考えていた。対象とする具体的な硬組織疾患と適応症は 抜歯手術後の歯槽骨温存治療 (4 壁性骨欠損)、歯周組織再生療法 (1-3 壁性骨欠損)、口腔インプラント周囲骨増生法、唇顎口蓋裂に対する腸骨移植代替療法、良性腫瘍・顎骨嚢胞・顎骨壊死切除後の腸骨移植代替療法、脊椎椎体骨折や大腿骨頭壊死症などを想定している。動物実験専用施設において、抜歯による歯欠損モデルと、5-0 絹糸の歯周囲結紮による歯周病モデルを作製する。新規開発材料による移植実験においては、評価項目は臨床術式の確立、移植拒絶反応の有無、形態や臨床的なハンドリングも含めた移植材料条件の最適化を行うことを予定していた。

(3) 組織再生様式を CT による画像解析によって定量的に、免疫組織化学的手法を用いて生物学的に解析し、有効性と安全性を評価する。

本研究課題は生体内 MSCs を活性化させることを目標としており、外部から細胞移植を行う幹細胞治療ではないことから、大型動物での骨組織形成を CT スキャンによる評価と免疫組織学的解析によって、安全性と有効性が立証されれば臨床研究に移行できると考えている。

4. 研究成果

既存の歯周組織再生療法や骨増生術は一定の効果を上げているものの、安全性や適応外使用、臨床的ハンドリングなどの改善点を多くかかえている。本研究では、骨リモデリング機能を強化させ、さらに生体に内在する間葉系幹細胞を再生させたい場所に誘導する「間葉系幹細胞誘導システム」を付与することで、動物由来材料から脱却した骨リモデリング機能を有する幹細胞誘導型硬組織再建・再生材料の開発を目指した。外部から細胞移植を行うことなく骨再生治療を達成することから、医療機関の全てで使用することが可能であり、口腔領域に限らず、「骨」を対象とする整形外科や形成外科での実用を可能にする基盤研究を行うことを計画した。2021年から2022年度は当初予定していた産学連携共同研究施設の変更が行われ、幸いにも本プロジェクトに賛同してくださった新たな他大学理工学部との共同研究計画も立ち上げ、生物材料に依存しない新規骨補填材の開発および、口腔領域疾患への応用を展開していくこととなった。現在の骨補填材はほとんどが顆粒状のもので、臨床現場においては、操作性に問題がある場面にも遭遇する。共同研究を行っている理工学部の研究者らが開発している、「抗菌性」と「骨伝導能」に加えて、「骨誘導能」も兼ね備えた材料の開発に成功し、理工学部で *in vitro* の検証を行い、申請者らは定量的骨形成能を評価するための *in vivo* 評価系を構築した。マウスおよびラットでの定量的骨形成能を評価するモデルの確立に取り組んだ。また、マウスおよびラットであれば、現在も研究を行っている内在性間葉系幹細胞の集積も含めた評価も行えると考えた。マウスおよびラットの定量的顎骨欠損モデルも確立することで、分子生物学的にも検証手段の方法が拡がり、かつ骨置換部分の間葉系幹細胞の動態を評価することを想定した。実際、マウスの顎骨は非常に菲薄であり、顎骨の様々な部位を用いて定量的骨欠損モデルの作製に取り組んだが、サイズと菲薄さから、困難であると結論づけた。その一方、ラットを用いた定量評価が可能な顎骨欠損モデルを確立することに注力し、その確立に成功した (右図)。



現在新規骨補填材料の評価系を構築するべく、臨床で用いられている (適応が認められている) ガイストリッチ バイオオス, b-TCP, 炭酸アパタイトを用いて、自家骨置換率を組織化学的に検証している。さらにラットの定量的顎骨欠損モデル作製時に、なるべく低侵襲に行えるように術式の改良を加えている。現在ラットの顎骨欠損モデルによる骨補填材の評価には、動物用マイクロCTと組織学的評価を行っている最中であり、本研究課題の目的である完全化学合成、自家骨置換能に優れ、臨床的操作性の向上を兼ね備えた新規骨補填材の評価を行っている。引き続き「抗菌性」、「臨床性操作性に優れた形状」、「高い自家骨置換率を達成するための骨誘導能」、「内在性間葉系幹細胞集積機能」を有した新規骨疾患治療用材料の開発を進

めている状況である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森川 暁 中川 種昭
2. 発表標題 組織幹細胞による再生治療戦略と難治性疾患の病態生理解明
3. 学会等名 第37回日本ヒト細胞学会学術集会（招待講演）
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
研究分担者	宮下 英高 (MIYASHITA Hidetaka) (20445290)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

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