

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10259

研究課題名(和文) 未分化脂肪幹細胞の移植による軟骨内骨化を介した骨形成法と新しい骨再生療法への応用

研究課題名(英文) Osteogenesis via endochondral ossification by implanting undifferentiated adipose stem cells and its application to a new bone regeneration therapy.

研究代表者

池田 正明 (Ikeda, Masa-Aki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：20193211

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)：従来の幹細胞を用いた骨再生療法は、移植部位への血液供給に限界があるため、適用できる骨欠損の大きさに限界がある。軟骨内骨化の過程では血管新生が起ることから、軟骨内骨化を模倣した骨再生法が注目されている。この骨再生法に適した足場材料を明らかにするため、ヒト間葉系幹細胞と足場材料から作成した人工軟骨をマウスに移植し、軟骨内骨化に対する効果を検討した。その結果、ヒアルロン酸ゲルが、質の高い人工軟骨を作製するために優れた性質をもつこと、マウス皮下に複数移植すると互いに融合し、一体化した一つの骨を形成すること、さらに癒合した組織の間には骨髄が形成され、血管新生を促進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨の細胞外マトリクスの主成分の一つであるヒアルロン酸から作成されたゲルは軟骨および軟骨内骨化に関連した多くの研究で用いられている。しかしながら、ヒアルロン酸のみを成分とするゲルの軟骨内骨化における有効性を検討した報告はなかった。我々はヒアルロン酸ゲルを単独で用いた場合、未分化間葉系幹細胞から均一で質の高い人工軟骨を作成できること、さらに複数の人工軟骨から統合した一つの骨を形成できることを見出した。以上のアルロン酸ゲル特徴を明らかにした研究は初めてであり、本研究の成果は、大きな骨欠損を治癒させるための新しい骨再生療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Conventional bone regeneration therapies using stem cells are limited in the size of bone defects to which they can be applied because of the limited blood supply to the graft site. Since angiogenesis occurs during endochondral ossification, bone regeneration methods that mimic endochondral ossification are attracting attention. To clarify the suitable scaffold material for this bone regeneration method, we implanted artificial cartilages from human mesenchymal stem cells and scaffold materials into nude mice and examined endochondral ossification. We found that hyaluronic acid gel has excellent properties for producing high-quality artificial cartilage, that artificial cartilage made from multiple hyaluronic acid gels implanted subcutaneously in mice fused to form a single integrated bone, and that bone marrow is formed between the fused tissues, which promotes angiogenesis.

研究分野：再生歯学

キーワード：脂肪幹細胞 足場材料 骨形成 軟骨内骨化 間葉系幹細胞 軟骨 肥大軟骨

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 研究成果報告内容

### 1. 研究開始当初の背景

幹細胞と足場材料を用いた骨再生療法は、血流の不足による移植組織の壊死や脱離を起こすことがあり、大きな骨欠損に用いるには限界がある。軟骨細胞は、低酸素・低栄養の環境下でも抵抗性をもつと共に、軟骨内骨化や骨折治癒の過程において骨芽細胞に直接分化転換することが明らかになった。最近、軟骨内骨化を再現させる骨再生法、即ち、軟骨に分化させた幹細胞を移植し、軟骨内骨化を誘導する方法が報告され、動物実験では骨再生に有効であることが確認されている。しかしながら、移植に用いる軟骨を体外で作製するには、多大な労力と費用がかかる。研究代表者らは、軟骨分化能を高めた未分化な脂肪幹細胞を軟骨形成に適した足場材料と一緒に移植すると、軟骨内骨化が誘導されることを示唆する知見を得た。

### 2. 研究の目的

本研究は、

- (1) ヒト脂肪幹細胞の軟骨分化能を高めるのに最適な成長因子を明らかにする。
- (2) 未分化脂肪幹細胞が生体内で軟骨内骨化を誘導するのに最も適した足場材料を明らかにする。
- (3) 正常免疫をもつマウスより大型の実験動物(ラット、イヌ)を用いて本研究の有効性を確認し、将来的な軟骨内骨化を介する骨再建・骨再生療法の実現に貢献することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脂肪幹細胞の軟骨分化能を高める成長因子の検討

予備実験の結果、脂肪幹細胞の軟骨分化能を高める成長因子の候補を見出している。しかしながら、生体内での軟骨形成と軟骨内骨化をより早く、効率的に誘導するためにはさらに検討する余地がある。軟骨内骨化に関与する成長因子を詳細に検討し、軟骨分化能の高い細胞を得るのに適した培養条件を明らかにする。

#### (2) 軟骨分化・軟骨内骨化に適した足場材料の検討

1. 生体内での軟骨形成・軟骨内骨化に最も適した環境を提供する足場材料を検討するため、骨の無機成分(ハイドロキシアパタイト)を含まない生体吸収性の生体材料(ヒアルロン酸、フィブリン、低分子量アルジネートなど)をそれぞれ単独、あるいは複数組み合わせで検討する。
2. 移植後、経時的に $\mu$ -CTによる経過観察を行うとともに、移植組織を固定し、脱灰後、組織学的解析(サフラニンO、改良テトラクロム、HE染色など)および免疫組織学的解析(コラーゲンI, II, Xなど)を行う。
3. 定量RT-PCR法を用いて骨・軟骨・肥大軟骨の分化マーカーの発現を

解析する。以上の解析により、生体内での軟骨内骨化を誘導するのに適した足場材料を明らかにする。

### (3) 大型実験動物を用いた有効性の検討

将来的な臨床応用を目指すため、正常な免疫系をもつ近郊系 F344 ラットあるいはビーグル犬から脂肪幹細胞を採取・培養後、それらの実験動物の頭蓋冠・顎骨・長幹骨欠損モデルを用いてより大きな骨欠損の修復に対する有効性を確認する。

## 4. 研究成果

### (1) 脂肪幹細胞の軟骨分化能を高める成長因子の検討

軟骨内骨化を誘導するためには肥大軟骨細胞に分化しやすい幹細胞を用いることが重要である。そこで、ヒト脂肪幹細胞や骨髄間葉系幹細胞を用いて肥大軟骨細胞への分化能を増強させる成長因子の検討をおこなった。その結果、すでに効果的であることが知られている線維芽細胞成長因子 2 (FGF2) に加えて低濃度の TGF- $\beta$ 1 を添加すると、骨髄間葉系幹細胞において肥大軟骨分化能および生体内での軟骨内骨化の誘導能を著明に向上させることを見出した(未発表データ)。

### (2) 生体内での軟骨内骨化を誘導するのに最適な足場材料の検討

軟骨内骨化を誘導するための人工軟骨の作製には、生体親和性の高い足場材料を用いることが有効である。ヒアルロン酸 (HA) は軟骨の細胞外マトリクス (ECM) の主成分の一つであり、優れた生体親和性と生分解性を持つ生体高分子である。生体内での軟骨分化・軟骨内骨化に最も適した環境を提供する足場材料を明らかにするため、ヒト脂肪幹細胞および骨髄間葉系幹細胞を生体吸収性の生体材料と共に生体外で肥大軟骨に分化させた後、免疫不全マウスに移植した。その結果、以下の成果を得た[1,2]。

1. 化学的に重合させた HA だけを成分とするハイドロゲル (ゲル) が、均一で質の高い人工軟骨を作製するために優れた性質をもつことを見出した (図 1)。

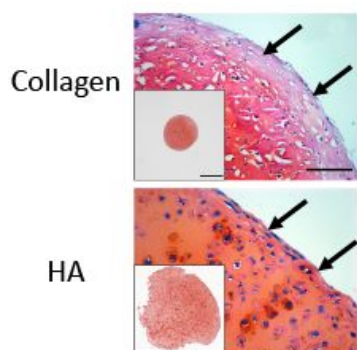


図 1 コラーゲンゲル (上) と HA ゲル (下) で作成した人工軟骨の比較[1]

(サフラニン O 染色)

コラーゲンゲルは周辺部 (矢印) の細胞形態が不規則で、染色性が低かった。一方、HA ゲルは周辺部 (矢印) の細胞も軟骨細胞様の形態を示し、全体的に均一な染色性を示した。スケールバー : 200  $\mu$ m (全体図: 1 mm)。

2. HA ゲルで作成した人工軟骨は、マウス皮下に複数移植すると互いに融合し、一体化した一つの (異所性) 骨を形成すること、さらに癒合した組織の間には骨髄が形成され、血管新生も促進することを見出した (図 2)。

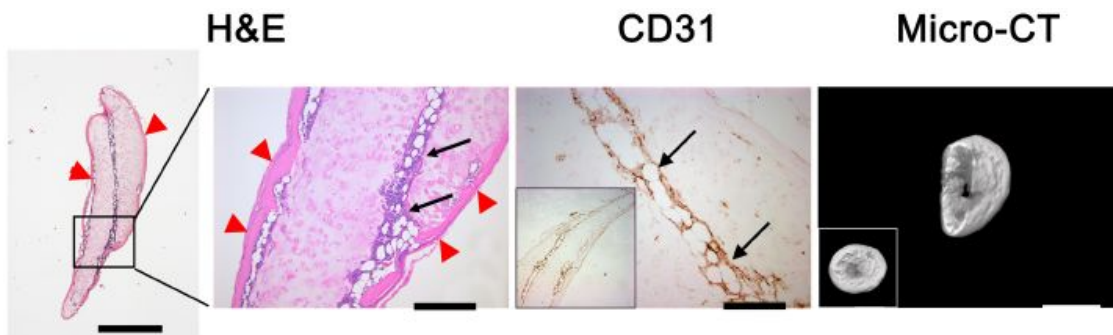


図2 2つの移植片が癒合し、一体化して骨化したHAゲル由来人工軟骨（移植後、8週間）[1]

移植組織周辺部の骨形成（赤矢頭）とミネラル沈着（ $\mu$ -CT）．癒合した軟骨の間に認められた骨髄（H&E, 矢印）と血管（CD31, 矢印）．スケールバー：200  $\mu$ m (全体図: 500  $\mu$ m); 2 mm ( $\mu$ -CT).

#### <考察>

骨には生来の修復能力があるが、外傷や骨腫瘍の切除などでその能力を超える大きさの骨欠損が生じた場合には、外部からの介入が必要となる。血管柄付き自家移植を除く、従来の骨再生療法は、移植部位への血液供給に限界があるため、「臨界サイズ」を超える骨欠損への適用が困難であった。本研究で示した人工肥大軟骨（人工軟骨）を移植して軟骨内骨化を誘導する骨再生法は、骨形成とともに血管新生が起こるため、「臨界サイズ」を超える骨欠損を治癒させるための有望な手段である。

この人工軟骨を用いた骨再生療法の成功の鍵は、質の高い人工軟骨を作成することである。人工軟骨の作製には、生体親和性の高い足場材料を用いることが有効であるが、そのために最適な生体材料はまだ明らかになっていない。ヒアルロン酸（HA）は軟骨の細胞外マトリクス（ECM）の主成分の一つであり、優れた生体親和性と生分解性を持つ生体高分子である。しかしながら、コラーゲンなど他の生体材料と混合して用いられる場合が多く、HAのみを成分とするゲルの軟骨内骨化における有効性を検討した報告はなかった。我々は、HAゲルを単独で用いた場合、未分化ヒトMSCから均一で質の高い人工軟骨を作成できること、さらに複数の人工軟骨から統合した一つの骨を形成できることを見出した（図1,2）[1,2]。

これまでの研究では、人工軟骨の軟骨分化の程度が不均一で、軟骨に分化していない組織（細胞）が残存する問題、および複数の人工軟骨を移植した場合、欠損部の骨とは癒合するが、移植した軟骨同士が癒合しない問題などが報告されていた。本研究の成果は人工軟骨の作成におけるこれらの重要な問題の解決に貢献する研究成果である。さらにHAゲルは培養中にゲルの収縮が起こらないため、より少量の細胞を用いて人工軟骨のサイズを大きくできる利点があることを見出した[1]。この事実は、大量の細胞培養を伴う人工軟骨の作製の困難な問題を低減することに繋がると考えられる。

以上、本研究の成果は、軟骨内骨化を模倣する骨再生法成功の鍵となる高品質の人工軟骨の作成に貢献し、血管新生を伴うため「臨界サイズ」を超える骨欠損に適用可能な新しい骨再生療法の開発に貢献すると考えられる。

< 引用文献 >

1. Shintaro Yamazaki, Ryoko Hirayama, Yayoi Ikeda, Sachiko Iseki, Tetsuya Yoda, Masa-Aki Ikeda. Hyaluronic acid hydrogels support to generate integrated bone formation through endochondral ossification in vivo using mesenchymal stem cells. PLoS ONE 18(2): e0281345. (2023)
2. 山崎新太郎、清水真優、平山涼子、井関祥子、依田哲也、池田正明 軟骨内骨化を介した骨再生に適したヒト間葉系幹細胞の培養条件および足場材料の検討 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会 2021年11月12-14日 幕張メッセ 東京

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（査読付論文5件/国際共著4件/オープンアクセス0件）

著者名 Yamazaki Shintaro、Hirayama Ryoko、Ikeda Yayoi、Iseki Sachiko、Yoda Tetsuya、Ikeda Masa-Aki	4. 巻 18
2. 論文標題 Hyaluronic acid hydrogels support to generate integrated bone formation through endochondral ossification in vivo using mesenchymal stem cells	5. 発行年 2023 年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0281345
掲載論文の DOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0281345	査読の有無 有
オープンアクセス	国際共著
該当せず	-

他4件

〔学会発表〕 計9件(招待講演0件/国際学会6件)

1. 発表者名 山崎新太郎、清水真優、平山涼子、井関祥子、依田哲也、池田正明
2. 発表標題 軟骨内骨化を介した骨再生に適したヒト間葉系幹細胞の培養条件および足場材料の検討
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021 年

他8件

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saadat Khandakar, Lestari Widya, Pratama Endrawan, Ma Teng, Iseki Sachiko, Tatsumi Megumi, Ikeda Masa-Aki	4. 巻 58
2. 論文標題 Distinct and overlapping roles of ARID3A and ARID3B in regulating E2F-dependent transcription via direct binding to E2F target genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2021.5192	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 該当する
1. 著者名 Yamazaki Shintaro, Hirayama Ryoko, Ikeda Yayoi, Iseki Sachiko, Yoda Tetsuya, Ikeda Masa-Aki	4. 巻 18
2. 論文標題 Hyaluronic acid hydrogels support to generate integrated bone formation through endochondral ossification in vivo using mesenchymal stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0281345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0281345	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 Arman Kaifee, Saadat Khandakar A. S. M., Igci Yusuf Z., Bozgeyik Esra, Ikeda Masa Aki, Cakmak Ecir A., Arslan Ahmet	4. 巻 44
2. 論文標題 Long noncoding RNA ERICD interacts with ARID3A via E2F1 and regulates migration and proliferation of osteosarcoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 2263 ~ 2274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbin.11434	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 Saadat Khandakar A.S.M., Bozgeyik Esra, Arman Kaifee, Bozgeyik Ibrahim, Ikeda Masa-Aki	4. 巻 20
2. 論文標題 ARID3A-mediated modulation of TP73 and TP73-AS1 in osteosarcoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene Reports	6. 最初と最後の頁 100683 ~ 100683
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.genrep.2020.100683	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 Bozgeyik Esra, Saadat Khandakar A.S.M., Arman Kaiffee, Bozgeyik Ibrahim, Ikeda Masa-Aki	4. 巻 24
2. 論文標題 Enhanced E2F1 activity increases invasive and proliferative activity of breast cancer cells through non-coding RNA CDKN2B-AS1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Meta Gene	6. 最初と最後の頁 100691 ~ 100691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mgene.2020.100691	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 山崎新太郎, 清水 真優, 井関 祥子, 依田 哲也, 池田 正明
2. 発表標題 軟骨内骨化を介した骨再生に適したヒト間葉系幹細胞の培養条件および足場材料の検討
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎新太郎, 清水真優, 平山涼子, 井関祥子, 依田哲也, 池田正明
2. 発表標題 軟骨内骨化を介した骨再生に適したヒト間葉系幹細胞の培養条件および足場材料の検討
3. 学会等名 第66回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saadat K ASM, Ikeda MA
2. 発表標題 Gene-Silencing Efficiency Determination of ARID3B in Osteosarcoma Cell Lines by siRNA and shRNA
3. 学会等名 6th International Multidisciplinary Studies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Saadat K ASM, Lestari W, Ma T, Pratama E, Iseki S, Ohtani K, Ikeda MA
2 . 発表標題 ARID3B modulates E2F target gene expression and cell proliferation
3 . 学会等名 2019年度生命科学系学会合同年次大会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Saadat K ASM, Ikeda MA
2 . 発表標題 Gene-Silencing Efficiency Determination of ARID3B in Osteosarcoma Cell Lines by siRNA and shRNA.
3 . 学会等名 III. International Eurasia Multidisciplinary Studies Congress ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Ogr, Uyesi. Saadat K ASM. Saadat, Arman K, Ikeda MA
2 . 発表標題 ARID3A Regulates the Tumor Suppressor Tap73 in Osteosarcoma.
3 . 学会等名 2nd ZEUGMA International Congress on Multidisciplinary Studies ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Ogr, Uyesi. Saadat K ASM, Arman K, Ikeda MA
2 . 発表標題 ARID3A Directly Regulates Autophagy Related Gene Beclin1 in Osteosarcoma.
3 . 学会等名 2nd ZEUGMA International Congress on Multidisciplinary Studies ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年



1. 発表者名 1. 発表者名 Saadat K ASM, Arman K, Ikeda MA
2. 発表標題 ARID3A Regulates the Tumor Suppressor Tap73 in Osteosarcoma.
3. 学会等名 2nd ZEUGMA International Congress on Multidisciplinary Studies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saadat K ASM, Arman K, Ikeda MA
2. 発表標題 ARID3A Directly Regulates Autophagy Related Gene Beclin1 in Osteosarcoma.
3. 学会等名 nd ZEUGMA International Congress on Multidisciplinary Studies (国際学会)
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 分担者	丸川 恵理子  (Marukawa Eriko)  (40419263)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授   (12602)	
研究 分担者	池田 やよい  (Ikeda Yayoi)  (00202903)	愛知学院大学・歯学部・教授   (33902)	

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			
トルコ	Gaziantep University			
マレーシア	International Islamic University			