

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19071

研究課題名(和文)自家誘導骨芽細胞を含み自在な3D形状に構築できる再生治療用培養骨組織の開発

研究課題名(英文) Development of cultured bone tissue for regenerative therapy that contains autologous osteoblasts and can be constructed into a free 3D shape

研究代表者

佐藤 良樹 (Sato, Yoshiki)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：50808235

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)：我々はヒト皮膚線維芽細胞を、ALK阻害剤II(トランスフォーミング増殖因子-シグナルの阻害剤)および $1,25$ -ジヒドロキシビタミンD₃を使用して、天然の凍結乾燥ナノゲル架橋多孔質(FD-NanoClip)多糖類シートまたは線維上で骨芽細胞に変換することに成功した。また、異なる多糖類足場を比較するラマン分光分析とdOB培養のフーリエ変換赤外分光分析に基づいて、骨形成挙動の観察された違いを解析したところ、この研究は、既存のアテロコラーゲン足場材料と比較してより優れた骨形成出力を備えたFD-NanoClipシートを開発することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、骨疾患に対する再生医療を目的として、高機能の自家骨芽細胞を含む、自在な3D形状の骨組織を構築する技術を報告した。本研究では我々が開発した2つの技術、低分子化合物を用いたダイレクト・リプログラミングによる骨芽細胞誘導技術と、高い3D組織構築が可能なスキャホールドを組み合わせて、骨芽細胞移植に際して、効率性、安全性を高めたゼノフリー骨再生医療の基盤技術を確立を検証した。本研究の結果、Fibronectin-coated NanoClip-FD matrixとALK5i が骨芽細胞の接着、骨組織形成を強く支持し、安全なゼノフリー骨再生の基盤技術を拓くものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Human dermal fibroblasts were converted into osteoblasts using a ALK inhibitor II (inhibitor of transforming growth factor- signal) and $1,25$ -dihydroxy Vitamin D₃ on natural freeze-dry nanogel-crosslinked-porous (FD-NanoClip) polysaccharide sheets or fibers. Based on Raman spectroscopic analyses comparing different polysaccharide scaffolds and Fourier transform infrared spectroscopy analyses of dOB cultures, we interpreted the observed differences in osteogenic behaviors. This study substantiates a possible new path to repair large bone defects through a simplified transplantation procedure using FD-NanoClip sheets with better osteogenic outputs as compared to the existing atelocollagen scaffolding material.

研究分野：骨再生

キーワード：スキャホールド ナノゲル ダイレクト・リプログラミング 骨芽細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えようとしている我が国では、今後、骨疾患に伴って生じる大規模骨欠損に対し、骨再生療法の選択の多様化が求められる。骨腫瘍切除後の骨欠損、骨粗鬆症性骨折後の癒合不全、関節リウマチ、歯周病に伴う歯槽骨吸収、骨髄炎や MRONJ による骨欠損等、種々な骨疾患に伴って生じる大規模骨欠損は、患者の QOL と ADL を著しく低下させる。

骨芽細胞は、骨基質を産生して骨形成に寄与し、骨リモデリングにおける中心的な役割を果たすと考えられ、骨欠損の回復に必要不可欠な細胞といえる。しかし、骨芽細胞は増殖能が低く、加齢によって機能も低下することが知られているため、骨再生を促進するためには、細胞移植などの外部からの供給が必要となる。

再生医療の領域において、細胞移植は、拒絶免疫応答を避けるため患者自身の骨芽細胞を用いることが望ましく、現在自己骨芽細胞は、骨髄や脂肪由来の間葉系幹細胞から分化誘導が可能である。しかしながら、間葉系幹細胞の採取時の侵襲や幹細胞数の不足などの問題がある。細胞研究である近年では iPS 細胞由来細胞や口腔由来幹細胞を用いた骨再生に関する報告も数多く存在するが、近年、患者自身やアロの線維芽細胞から目的細胞へ直接誘導する技術(ダイレクト・コンバージョン)が報告されている。これらの技術を用いて骨欠損回復を早期に回復できるようにするのは今後の医療に必要不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、臨床応用を見据え、より簡易で安全な骨芽細胞移植法を確立させるために、小分子化合物を用いたダイレクト・コンバージョン技術を用いるとともに、架橋ナノゲルを足場材料として用いて体外で骨分化誘導して移植することにより、難治性で治療方法が確立されていない大規模骨欠損および骨吸収に対応しうる、新たな骨再生療法を確立することを目指す。

3. 研究の方法

1. Preparation of scaffold (NanoClipFD and Atelocollagen)

本研究では、足場材料として、天然多糖であるプルランを主成分とする架橋ナノゲルを使用した。

アクリロイル基で置換したナノゲルを末端チオール基ポリエチレングリコールで化学的に架橋し、自在な 3D 形状に成型し、フリーズドライ工程を加えることにより、多孔質構造を付与した。さらに、接着因子のコーティングによって骨芽細胞が内部に進展接着して 3 次元的に配向できるようにできるよう工夫した。

完成した架橋ナノゲルを湿潤状態で計測し、直径 0.8mm、長さ 9mm となった架橋ナノゲルを選択して実験に使用した (NanoClipFD fiber)。

今回新しく作成した Sheet Type の架橋ナノゲル (NanoClipFD sheet) の作成方法を以下に示す。

コレステリル基、アクリロイル基で修飾された cholesterol bearing pullulan の乾燥物を、30mg/mL となるように 600rpm のスターラーで溶解させ、架橋剤である PEGSH (末梢チオール化ポリエチレングリコール) を PBS に溶解し 105mg/mL となるように調整したものを 2:1 の量でボルテックスで混和し、溶液を速やかに型 (シリコンコーティングを行った 1.5mm スペーサー付きガラス板で作成した鋳型) に流し込む。その後、37 環境にて 24 時間静置インキュベートし、鋳型からシート状のゲルを取り出した後、短冊状にカットし、PBS にて洗浄後、PBS に浸して 4℃まで冷却した後、-30 度にてオーバーナイト静置した。凍結したゲルを室温で解凍し、融解後、純水にて 2 度水洗して塩を洗い流し、余分な水分をよく切って、容器ごと液体窒素にて急冷、凍結させ、凍結させたゲルを真空乾燥機にて Over Night 真空乾燥させた。凍

結乾燥させたゲルを 50 μ g/mL Fibronectin Solution (Wako laboratory chemicals, Osaka, Japan) に Over Night 浸漬してフィブロネクチンコーティングした。その後、ゲルを直径 6mm 厚さ 1.2mm の円盤シート状に成型した後、10 秒間 70%エタノール溶液に浸透させて余分なフィブロネクチンの除去と滅菌を行い、滅菌パラフィルムに個包装し、ゲルを再度 Over Night 真空乾燥させた。

完成した架橋ナノゲルを湿潤状態で計測し、直径 5mm、高さ 1.5mm となった架橋ナノゲルを選択して実験に使用した (NanoClipFD sheet)。

Atelocollagen は、直径 5 mm , 高さは 3 mm の円柱状のコラーゲンスポンジ (AteloCell® Atelocollagen spoge MIGHTY, KOKEN, Tokyo) を、高さ 1.5mm に切断し、直径 5mm、高さ 1.5mm に成型して使用した (Atelocollagen sheet)。

完成した Atelocollagen sheet は湿潤状態で直径 5mm、高さ 1.5mm であることを確認し、実験に使用した。

NanoClipFD sheet と Atelocollagen sheet は、湿潤状態での一片の長さをそれぞれ測定して体積を計測し、体積が等しくなることを確認している。

一方で、従来の NanoClipFD Fiber を湿潤状態で計測すると、直径 0.8mm、長さ 9.1mm である。したがって、NanoClipFD Fiber は 5 本で NanoClipFD sheet 1 個および Atelocollagen sheet 1 個と概ね体積が等しくなることを確認し、使用した。

Alizarin Red S 染色での石灰化量の定量比較をするため、それぞれの scaffold に入れる細胞数と scaffold の体積を揃えた。

それぞれの scaffold に細胞充填するために、まずそれぞれの scaffold を 96well に並べた。

NanoClipFD sheet と Atelocollagen sheet は体積が等しい。NanoClipFD fiber は、5 本で、NanoClipFD sheet および Atelocollagen sheet 1 個と概ね体積が等しくなるため、5 本を並べて 96well に置いた。

NanoClipFD sheet および Atelocollagen sheet 1 個あたりにそれぞれ 1.5×10^5 個の細胞含有培地 15 μ l をピペットにてゆっくり滴下し、ピンセットで scaffold から気泡を押し出して細胞充填を行った。

あたりに 1.5×10^5 個の細胞含有培地 15 μ l をピペットにてゆっくり滴下し、ピンセットで scaffold から気泡を押し出して細胞充填を行った。

細胞充填を行ったそれぞれの scaffold が入った 96well プレート を 2 時間インキュベートして、scaffold とヒト皮膚線維芽細胞を接着させた。

三次元培養した scaffold の内部で骨芽細胞様細胞が石灰化基質を形成しているかを確認するため、NanoClipFD と dOB の複合体および Atelocollagen と dOB の複合体を、Day21 で 95%エタノールで固定し、Alizarin Red S 溶液 (Sigma Aldrich) で染色した。また、染色後の NanoClipFD および Atelocollagen を 12well に移し、10% Formic Acid (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka Japan) を 1000 μ L/well 加えて、振とうしながら溶解し、15 分後に上清を回収して、吸光濃度計を用いて 405nm の吸光度を測定し、石灰化量の定量比較を行った (N=3 で実施)。

4. 研究成果

本研究では、NanoClipFD sheet、NanoClipFD fiber および Atelocollagen にヒト皮膚線維芽細胞を播種し、ALK5 inhibitor (ALK5 i) および 1,25-dihydroxy Vitamin D3 (VitD3) を添加した骨分化誘導培地を用いて骨芽細胞誘導を行い、石灰化基質産生能および骨分化遺

伝子の発現を解析した。

さらに、骨分化培養して作成した骨芽細胞様細胞の複合体のラマン分光解析を行い、生成された骨器質を DNA レベルで評価した。

結果として、本研究では、NanoClipFD sheet と誘導骨芽細胞 (The directly converted fibroblasts) (dOB) の複合体で、control 群と比較して有意な骨器質生成および骨分化マーカーの発現上昇を示し、さらに、既存の足場材料である Atelocollagen と誘導骨芽細胞 (dOB) の複合体と同等な骨器質生成および骨分化マーカーの発現上昇を認めた。

また、NanoClipFD sheet と誘導骨芽細胞 (dOB) の複合体は、従来の NanoClipFD fiber と誘導骨芽細胞 (dOB) の複合体と比較して、骨器質生成および骨分化マーカーの発現上昇において、概ね同じパフォーマンスであることも示された。

さらに、ラマン分光解析の結果、NanoClipFD sheet と誘導骨芽細胞 (dOB) の複合体では、Atelocollagen と誘導骨芽細胞 (dOB) の複合体と比べ (良好な骨質形成を示した)。

本研究では、小分子化合物および足場材料として架橋ナノゲルを用いることで、造腫瘍性のリスクおよび異種タンパクを含むことによる免疫拒絶や感染のリスクを解決し、より安全に、さらに、現状では回復手段のない大規模骨欠損を、移植術式をより簡易にした上で、既存の足場材料である Atelocollagen と比較して何ら遜色なく回復できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐藤良樹, 山本健太, 堀口智史, 中井 敬, 足立哲也, 足立圭司, 大迫文重, 雨宮傑, 山本俊郎, 金村成智
2. 発表標題 多孔性ハイブリッド・ナノゲルとダイレクト・リプログラミングを用いた新規骨再生療法の開発
3. 学会等名 第62回春期日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato Y, Yamamoto K, Takizawa S, Adachi K, Oseko F, Kishida T, Mazda O, Yamamoto T, Kanamura N
2. 発表標題 Bone regeneration by osteoblasts transplantation using nanogel as a scaffold
3. 学会等名 4th Meeting of the international Association for Dental Reserch Asua Pacific Region (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中井 敬, 佐藤良樹, 山本健太, 足立哲也, 滝沢茂太, 足立圭司, 大迫文重, 山本俊郎, 金村成智
2. 発表標題 ダイレクト・コンバージョン技術による新規骨再生療法の確立
3. 学会等名 第31回日本口腔科学会近畿地方部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto T, Sato Y, Yamamoto K, Adachi T, Oseko F, Kanamura N
2. 発表標題 Transplantation of dental pulp-derived cell sheets cultured on human amniotic membrane
3. 学会等名 4th Meeting of the international Association for Dental Reserch Asua Pacific Region (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
--	---------------------------	-----------------------	----

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