

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10094

研究課題名（和文）血管新生作用を有する顎骨壊死治療用移植材料の開発

研究課題名（英文）Development of graft material for treatment of osteonecrosis of the jaw with angiogenesis

研究代表者

中川 貴之（Nakagawa, Takayuki）

広島大学・医系科学研究科（歯）・助教

研究者番号：30456230

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では連通多孔体ハイドロキシアパタイト（以下IP-CHA）上で十分量の血管内皮細胞をiPS細胞より分化誘導し、顎骨壊死の病変部へ移植することで、血管新生作用を介した顎骨壊死の予防・治療法を確立することを目的とした。iPS細胞はフィーダー細胞であるMEFの培地とbFGF存在下で維持し、Activin、BMP4で中胚葉へ分化誘導し、VEGFで内皮細胞へ最終的な分化誘導を行った。しかしながら内皮細胞への分化した細胞はIP-CHA上でも、培養ディッシュ上でも観察されなかった。フィーダー細胞の培養条件や継代時のコロニー濃度などについて種々の条件を検討したが、適切に継代維持できる条件は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、IP-CHA存在下でのiPS細胞の血管内皮細胞への分化誘導が困難であり、in vitroでの移植材料の開発ができなかった。この結果は、IP-CHAが細胞培養液の構成成分の吸着に加え、フィーダー細胞からもたらされる成長因子や分化誘導因子にも影響を与えることにより、通常の培養ディッシュ上での分化誘導とは異なる条件検討が必要である。このことは、in vitroで培養したiPS細胞由来の移植材料が、移植後の生体内で期待される結果をもたらすかは、in vivoでの移植実験が重要であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to establish a method for prevention and treatment of osteonecrosis of the jaw through angiogenesis by inducing differentiation of a sufficient amount of vascular endothelial cells from iPS cells on interconnected porous hydroxyapatite (IP-CHA) and transplanting them into the lesion area of osteonecrosis of the jaw. iPS cells were maintained in feeder cells, MEF. The iPS cells were maintained in the presence of feeder cells, MEFs, and bFGF, and induced to differentiate into mesoderm with Activin and BMP4, and finally into endothelial cells with VEGF. However, cells differentiated into endothelial cells were not observed on IP-CHA or on the culture dish. Various conditions for feeder cell culture and colony concentration at passaging were investigated, but conditions that allowed appropriate passaging maintenance were not obtained.

研究分野：口腔外科学

キーワード：薬剤関連顎骨壊死

## 1. 研究開始当初の背景

BP 製剤、抗 RANKL 抗体薬のデノスマブなどの骨代謝阻害薬は骨粗鬆症や悪性腫瘍の骨転移、多発性骨髄腫などの骨病変に対し広く使用されている。一方で、これらの骨代謝阻害薬により生じる顎骨壊死が問題になっている。さらに最近では VEGF 抗体ベバシズマブや VEGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬などの血管新生阻害薬でも同様の顎骨壊死症例が報告されており、これらは薬剤関連顎骨壊死 (medication-related osteonecrosis; MRONJ) と呼称され、非常に難治性で、顎骨切除などの外科的な加療を要する場合は術後の QOL が著しく損なわれる。しかしながら MRONJ の病態は未だ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

申請者は、これまでビスホスホネート (BP) 関連顎骨壊死の病因を探るため、ゾレドロン酸をマウス破骨細胞前駆細胞に投与し網羅的な遺伝子の発現解析を行ってきた。その結果、ゾレドロン酸が破骨細胞因子に抑制的に作用することに加え、血管新生因子も抑制することにより、破骨細胞形成が阻害されることを見出した。これらの事実は、破骨細胞への直接的な抑制作用に加え、骨への血流障害が顎骨壊死を誘発していることを示唆している。このため顎骨壊死の治療には病変部の血管新生が重要であると考え、連通多孔体ハイドロキシアパタイト (IP-CHA) を担体とし、iPS 細胞を担体上で血管内皮細胞へと分化誘導を行うことで、顎骨壊死部の血流を改善しうる新規の顎骨壊死治療用移植材料の作成を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では IP-CHA 上で十分量の血管内皮細胞を iPS 細胞より分化誘導させ、顎骨壊死の病変部へ移植することで、血管新生作用を介した顎骨壊死の予防・治療法を確立する。臨床応用時のプロセスとしては、以下の方法を想定している。①患者から iPS 細胞を抽出する。②IP-CHA 上で血管内皮分化誘導培地にて無菌的に培養する。③十分量の内皮細胞が確認できれば、顎骨壊死部への移植を行う。その際に PRP を採取し、移植材を被覆するように添加する。創部は閉鎖縫合し、成長因子の濃度は可能な限り高い状態を維持する。この治療方法を行うための基礎実験として、下記を計画した。

1. IP-CHA ディスク上でのヒトおよびラット iPS 細胞の血管内皮細胞への分化誘導実験
2. iPS 由来血管内皮細胞含有 IP-CHA ディスクのラット頭蓋骨への埋植実験
3. 顎骨壊死モデルラットの作製
4. MRONJ モデルラットへの iPS 由来血管内皮細胞含有 IP-CHA の埋植実験

## 4. 研究成果

令和 3 年度は IP-CHA ディスク上でのヒトおよびラット iPS 細胞の血管内皮細胞への分化誘導実験を計画した。しかしながら現在、JCRB および理研の細胞バンクではラット iPS 細胞は分譲されていない。このため細胞バンクより分譲されているヒト iPS 細胞を用いて実験を行う方針とした。iPS 細胞はフィーダー細胞である MEF の培地と bFGF 存在下で維持を行い、Activin, BMP4 で中胚葉へ分化誘導を行い、VEGF で内皮細胞へ分化誘導を行った。しかしながら CD31 陽性細胞数はほとんど認められなかった。問題点としては分化誘導に用いるための元の iPS 細胞数が不足していること、またフィーダー細胞による維持の方法にも問題があった可能性が考えられた。また、HA は培養液中のイオンやタンパク質を吸着することで細胞の増殖に影響を与えるため、IP-CHA 存在下での細胞培養条件を検討するため、マウス MC3T3 細胞を用いて培養条件の検討を行った。すでに数多く報告されている MC3T3 細胞の骨芽細胞への分化条件に従って IP-CHA ディスク上で培養を行ったところ、ALP 活性の上昇やアリザリン染色での石灰化などの骨芽細胞への分化を示唆する所見は得られなかった。このため IP-CHA ディスクは培養前に十分量の培地に浸漬させ、馴化させる必要があることが考えられた。IP-CHA の培地への馴化に関しては、引き続き MC3T3 細胞を用いて、培地への浸漬時間や IP-CHA の単位体積当たりの培地量を検討し、速やかな培養条件の決定を試みる方針とした。

令和 4 年度は前年に引き続き iPS 細胞はフィーダー細胞である MEF の培地と bFGF 存在下で維持を行い、Activin, BMP4 で中胚葉へ分化誘導を行い、VEGF で内皮細胞へ最終的な分化誘導を行った。マウス骨芽細胞前駆細胞の MC3T3 を骨芽細胞へ分化させた細胞数や IP-CHA の細胞培養培地への浸漬時間を参考に IP-CHA の馴化を行った。しかしながら IP-CHA 存在下では、様々な培養条件においても CD31 陽性細胞数はほとんど認められなかった。やはりマウス MC3T3 細胞と同じ条件では分化誘導は困難であり、前年より課題として挙げた、HA は培養液中のイオンやタンパク質を吸着することで細胞の増殖や分化に影響を与える可能性が考えられた。当初の研究計画では IP-CHA 上で iPS 細胞を血管内皮細胞へ分化させることにより移植材料を作成する方針で、iPS 細胞の様々な培養条件や分化誘導実験を検討してきた。しかしながら安定した内皮細胞への分化誘導が困難であり、目標が達成されなかった。このため IP-CHA は内皮細胞の担体として利用し、細胞材料は培養皿上で十分量を培養し、最終的に IP-CHA へ播

種する方針へ変更することとした。当初の研究計画では IP-CHA の深部にまで細胞が入り込むことで、移植材料の高度な血管網の作成を目標としてきたが、本研究では移植材料の作成が困難であると判断し、IP-CHA を細胞材料の足場としての利用は断念し、血管内皮細胞の担体として利用する方針とした。令和 6 年度はこれまでに実施したヒト iPS 細胞の血管内皮細胞への分化誘導実験の結果、IP-CHA 上での分化誘導が困難であったことから、培養ディッシュ上での分化誘導実験を行った。iPS 細胞はこれまで通りフィーダー細胞である MEF の培地と bFGF 存在下で維持を行い、Activin, BMP4 で中胚葉へ分化誘導を行い、VEGF で内皮細胞へ最終的な分化誘導を行った。しかしながら Activin と BMP4 による中胚葉への分化誘導が不十分であり、さらに VEGF 投与により内皮細胞への分化した細胞は観察されなかった。フィーダー細胞の培養条件や継代時のコロニー濃度などについて種々の条件を検討したが、適切に継代維持できる条件は得られなかった。これはオンフィーダー培養法に関する技術や不足している可能性が示唆された。また、iPS 細胞 自体や培養試薬の価格が高額であり、培養条件の検討が制限される点も問題であった。

このため今後の研究ではフィーダーフリー培養法の検討を行う予定としている。フィーダーフリー培養法ではオンフィーダー培養法と異なり、培養プレートにコーティング剤を塗布することにより iPS 細胞の安定した培養、継代が可能である。このため本法を検討し、iPS の血管内皮細胞への分化誘導を行う。ただしフィーダーフリー培養法も、IP-CHA 存在下での培養条件とは大きく異なるため、IP-CHA 存在下での培養には再度、培養条件の検討は必要であると予想される。また IP-CHA を担体として利用するにあたり、移植材料が生体内で、内皮細胞がどの程度 IP-CHA 内へ浸潤し血管網を構築するかは、移植材料の作成において最重要課題となると考えられるため、担体に播種する分化後の内皮細胞の細胞数や細胞活性を維持できる移植までの限界時間など、移植時の条件検討は慎重に行う方針である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nakagawa Takayuki, Ohta Kouji, Naruse Takako, Sakuma Miyuki, Fukada Syohei, Yamakado Nao, Akagi Misaki, Sasaki Kazuki, Niwata Chieko, Ono Shigehiro, Aikawa Tomonao	4. 巻 148
2. 論文標題 Inhibition of angiogenesis and tumor progression of MK-0429, an integrin $\alpha$ 3 antagonist, on oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 3281 ~ 3292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00432-022-04100-3	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0件

〔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	武知 正晃 (Takechi Masaaki) (00304535)	独立行政法人国立病院機構（呉医療センター臨床研究部）・ その他部局等・医師  (85402)	
研究分担者	太田 耕司 (Ohta Kouji) (20335681)	広島大学・医系科学研究科（歯）・教授  (15401)	

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