

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390459

研究課題名(和文) ナノDDSと微小人工骨を用いた骨再生用ハイブリッド型骨移植片に関する基礎的検討

研究課題名(英文) Examination of hybrid bone grafts using nano DDS and artificial bones

研究代表者

森 良之(Mori, Yoshiyuki)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70251296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らがこれまでに行ってきた研究を発展・融合させ、いかなるサイズや形状にも簡便に対応でき、速やかに自家骨に置換される骨再生用ハイブリッド型骨移植片を作製することが本研究の目的である。バイオセンサーを用いて骨形成性遺伝子・生理活性物質の同定を行い、ナノ薬剤送達を用いた骨形成性遺伝子・生理活性物質の送達による骨分化誘導法に関する知見を得た。細胞源としてのiPS細胞にも着目し、生理活性物質の送達によるインビトロ骨分化誘導法の樹立も行った。また、自己組織型微小人工骨と骨分化細胞によるハイブリッド型骨移植片の作製を行い、その骨誘導能を動物実験で検証した。

研究成果の概要(英文)：By further integrating research that we had performed, this study was aimed to develop hybrid-type bone grafts for bone regeneration that were efficiently replaced into bone tissues. We identified osteogenic genes and bioactive factors with the bio-sensor and developed the osteogenic differentiation protocol using the nano drug delivery of the genes and factors. Focusing on iPS cells as a cell source for bone regeneration, we attempted to establish an in vitro differentiation protocol from the cells. Finally, we generated hybrid-type bone grafts that consisted of artificial bones and osteoblastic cells generated from stem cells, and examined their bone healing ability in animal experiments.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨再生用移植片

1. 研究開始当初の背景

不可逆性骨欠損・変形に対する治療としては自家骨移植と他家骨移植が主に行われているが、骨移植は形状・術中操作性・侵襲・安全性に難点を有する。こういった問題を解決するものとして期待されている再生医療では、「細胞源・成長因子・足場」が3つの構成要素として挙げられる。近年の骨再生医療においては、成体幹細胞を生分解性の足場材料と組み合わせて骨欠損・変形部へ移植する、細胞移植に基づく戦略の有効性が示されている。しかし、効率的に大量の再生骨を得るまでには至っておらず、適応される骨欠損部のサイズには限界がある。

今後目指すべき骨再生法は、広範かつ複雑な骨欠損においても短期間で、かつ安全に骨再生を誘導するものであると申請者らは考えている。そのためには、いかなるサイズや形状にも簡便に対応でき、生体骨の代替物として機能しながらも、周囲に積極的に骨再生を促し、最終的には自身が誘導した再生骨へと速やかに置換される『骨再生用ハイブリッド型骨移植片』の作製が必要であると考えている。そこで、「細胞源・成長因子・足場」の各要素を改善することで、従来型の幹細胞移植を補強できる新たな骨再生戦略を打ち立てなければならない。その実現には以下の3点がポイントであると考えている：

1. 細胞源に関する検討（細胞使用の有無・安全な骨分化誘導法・担体への適用方法）
2. 骨再生用成長因子・生理活性物質の選定
3. 自家骨置換型人工骨材料の選定

2. 研究の目的

申請者らがこれまでに行ってきた研究を発展・融合させ、いかなるサイズや形状にも簡便に対応でき、速やかに自家骨に置換される骨再生用ハイブリッド型骨移植片を作製することが本研究の目的である。ナノ DDS を用いて、安全かつ高効率に骨分化誘導した MSC と骨形成性生理活性物質を、自己組織型微小人工骨に搭載させた骨再生用ハイブリッド型骨移植片を創製し可能性を検証することで、広範かつ複雑な骨欠損にも対応できる、新しい骨再生戦略に関する基礎的知見を収集する。また、新たな細胞源として iPS 細胞に着目し、iPS 細胞の樹立法と骨分化誘導法を検討し、骨再生用自家細胞源としての有用性も検証する予定である。

具体的には、バイオセンサーを用いて骨形成性遺伝子・生理活性物質の同定を行い、高

分子ナノミセルを用いた骨形成性遺伝子・生理活性物質の送達による MSC 骨分化誘導法を検討する。また、細胞接着性および骨誘導能に優れた足場としての自己組織型微小人工骨を作製する。最後に、骨分化誘導させた細胞を微小人工骨からなるハイブリッド型骨移植片を作製し、骨誘導能を動物実験で明らかにする。また、ナノ DDS による骨分化誘導法の樹立も試みる。

3. 研究の方法

1. 骨形成性生理活性物質の同定

骨芽細胞特異的に発現する I 型コラーゲン遺伝子プロモーター断片の下流に蛍光蛋白 (GFP) を付けたトランスジーン (Col1a1GFP) をもつ種々の細胞 (ES 細胞、線維芽細胞、MC3T3 等) に様々な因子 (遺伝子、低分子化合物) を組合せて網羅的に導入し、骨形成性生理活性物質を同定する。

2. ナノ DDS による MSC 骨分化誘導法の検討

すでに探索した骨形成性遺伝子ならびに本研究で同定された骨形成性生理活性物質を用いて骨分化誘導を図るため、生体適合性の高い高分子ナノミセル (PEG-b-P[Asp-(DET)]) による生理活性物質のデリバリーを検証する。

3. ナノ DDS による iPS 細胞の骨分化誘導法の検討

ナノ DDS・生理活性物質を用いた iPS 細胞の骨分化誘導法を検証する。

4. 自己組織型人工骨の開発

細胞及び血管侵入に適した間隙のサイズが 100-500 μm であるという報告を勘案すると、100-500 μm の間隙を作製できる正四面体のサイズは、高さ 1 mm である。したがって、このサイズの自己組織型微小人工骨を開発する。

5. 自己組織型微小人工骨と骨分化細胞によるハイブリッド型骨移植片の作製

自己組織型微小人工骨からの生理活性物質放出・徐放条件の最適化と、人工骨へ細胞を播種することにより、ハイブリッド型骨移植片を作成する。

6. 動物実験によるハイブリッド型骨移植片の骨誘導能に関する検証

マウスあるいはラットに作製した骨欠損モデルを用いて、ハイブリッド型骨移植片が骨再生を誘導するか否か検証する。

4. 研究成果

1. 骨形成性生理活性物質の同定

すでに樹立した骨分化バイオセンサー Col1a1GFP-ES細胞、Col1a1GFP-NIH3T3細胞、Col1a1GFP-MC3T3-E1細胞を用い、遺伝子と生理活性物質を組み合わせ、網羅的に生理活性物質のスクリーニングを行った。その結果、既に同定した遺伝子の組合せや骨形成性低分子化合物は単独で十分な骨形成活性を有することが明らかとなった。

2. ナノ DDS による MSC 骨分化誘導法の検討

1.の結果に基づき、申請者らが以前同定した遺伝子の組合せである恒常活性型 ALK6 (BMP 受容体タイプ IB) と転写因子 Runx2 のナノ DDS を用いた遺伝子デリバリーの検証を行った。上記二つの遺伝子をナノ DDS により前駆細胞に導入し、骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシンの発現上昇を、他の遺伝子導入法であるリポフェクションあるいはポリエチレンイミンと比較した。その結果、遺伝子導入後 2 日から 10 日にわたって、ナノ DDS による遺伝子導入を行った群でのみ、著しいオステオカルシンの上昇が認められることが明らかとなった。

次にナノ DDS による mRNA デリバリーの検証を行った。インビトロ転写用のベクターに上記遺伝子をクローニング後、インビトロ転写にて mRNA を作製した。作製した mRNA の品質をバイオアナライザーにて検証した。さらにこれらの mRNA をリポフェクション法により細胞に導入し、ルシフェラーゼレポートアッセイを行った。その結果、導入した mRNA に由来する蛋白が細胞内で発現し、骨形成性遺伝子である BMP の反応エレメントあるいは、骨芽細胞マーカーであるオステオカルシン遺伝子のプロモーター領域にある Runx2 反応エレメントを介して、転写を活性化させることが確認された。

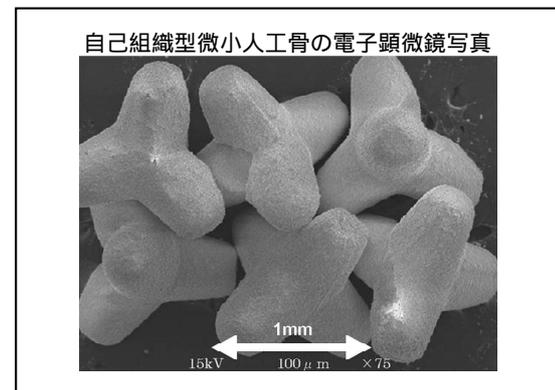
3. ナノ DDS による iPS 細胞の骨分化誘導法の検討

分化誘導因子として低分子化合物のみをデリバリーすることで骨芽細胞分化を段階的に模倣し、マウス iPS 細胞から高効率に骨芽細胞を形成する方法を開発しつつある。現在までに最適化された分化プロトコールは、無血清・無フィーダーにおける ES 細胞の維持、Wnt シグナル活性化剤とヘッジホッグシグナル抑制剤を添加した無血清培地による中胚葉細胞への誘導、ヘッジホッグシ

グナル活性化剤とヘリオキサンチン誘導体を添加した無血清培地における骨芽細胞への誘導という 3 つの段階から構成される。本法に従って培養することで、Col1a1、Runx2、Sp7、Ibsp、Bglap といった骨芽細胞分化マーカー遺伝子の著しい発現誘導が認められる。一方、多能性マーカーである Pou5f1 (Oct4)、Nanog、Sox2 の遺伝子発現は抑制され、外胚葉マーカーである Sox1 や内胚葉マーカーである Gata4・Sox17 の発現は誘導されないことを確認している。現在さらにプロトコールの修正を進めている。

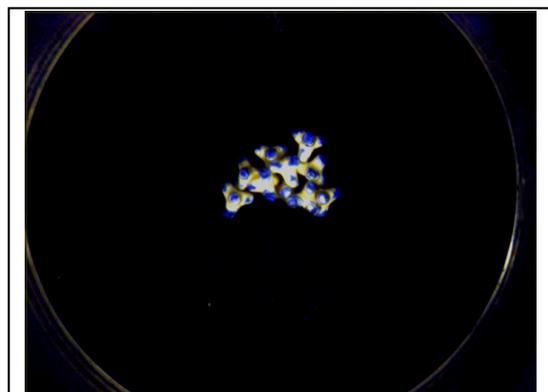
4. 自己組織型人工骨の開発

α 型リン酸三カルシウムを正四面体状に微小射出成形することにより、自由な形状に集積することができ、血管や細胞の侵入に理想的なサイズの連通路を形成する、サイズ 1 mm のテトラポッド形状を有する自己組織型微小人工骨を作製することに成功した(下図、Choi S et al. Acta Biomater, 2012)。



さらに、その in vivo における骨修復効果についてもイヌ及びウサギにおいて確認された (Honnam M et al. Biomaterials, 2013; Choi S et al. J Vet Med Sci, 2014; Honnam M et al. J Vet Med Sci, in press)。

5. 自己組織型微小人工骨と骨分化細胞によるハイブリッド型骨移植片の作製

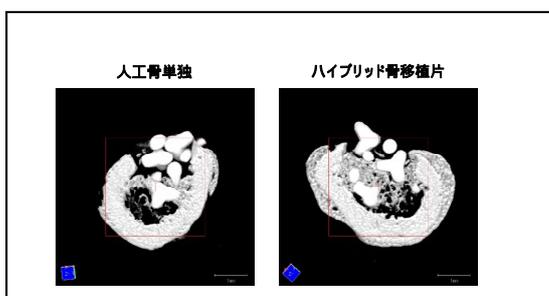


4.で開発した人工骨に骨分化させたラット

MSC を播種し、ハイブリッド型骨移植片の作製を試みた。播種後 ALP 染色を行うことにより、人工骨上に骨分化した MSC 由来細胞が存在することが確認できた（前頁図、青色染色）。

6. 動物実験によるハイブリッド型骨移植片の骨誘導能に関する検証

5. で作製したハイブリッド型骨移植片をラット大腿骨に作製した直径 2.2 mm 円筒状骨欠損部に移植し、人工骨単独移植群と比較して、その骨誘導効果を検証した。



上図に示すように、人工骨単独移植と比べて、ハイブリッド型骨移植片で骨再生の増加の傾向を認めた。今後、骨再生量の定量化を含めて更なる検討を進める予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 13 件）

- Honnami M, Choi S, Liu IL, Kamimura W, Taguchi T, Hojo H, Shimohata N, Ohba S, Koyama H, Nishimura R, Chung UI, Sasaki N, Mochizuki M: Bone regeneration by the combined use of tetrapod-shaped calcium phosphate granules with basic fibroblast growth factor-binding ion complex gel in canine segmental radial defects. *J Vet Med Sci* (in press)
- Choi S, Liu I, Yamamoto K, Honnami M, Sakai T, Ohba S, Echigo R, Suzuki S, Chung UI, Sasaki N, Mochizuki M: Implantation of tetrapod-shaped granular artificial bones or β -tricalcium phosphate granules in a canine large bone-defect model. *J Vet Med Sci* 76(2):229-235, 2014
- Honnami M, Choi S, Liu I, Kamimura W, Taguchi T, Hojo H, Shimohata N, Ohba S, Koyama H, Nishimura R, Chung UI, Sasaki N, Mochizuki M: Repair of rabbit segmental femoral defects by using a combination of tetrapod-shaped granular artificial bones and basic fibroblast growth factor-binding ion complex gel. *Biomaterials* 34(36):9056-9062, 2013
- Saito T, Yano E, Mori D, Ohba S, Hojo H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Tanaka S, Chung UI, Kawaguchi H: Generation of Col2a1-EGFP iPS cells for monitoring chondrogenic differentiation. *PLoS ONE* 8(9):e74137, 2013
- Ogasawara T, Ohba S, Yano E, Kawaguchi H, Chung UI, Saito T, Yonehara Y, Nakatsuka T, Mori Y, Takato T, Hoshi K: Nanog promotes osteogenic differentiation of the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. *J Cell Physiol* 228(1):163-171, 2013
- Mori Y, Hoshi K, Takato T, Takahashi M, Hirano Y, Kanno Y, Ohkubo K, Saijo H: Submucous cleft palate: variations in bony defects of the hard palate. *Br J Oral Maxillofac Surg* 51:e220-223, 2013
- Mori Y, Kanazawa S, Watanabe M, Suenaga H, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K.: Usefulness of agarose mold as a storage container for three-dimensional tissue-engineered cartilage. *Mater Sci Appl* 4(8):73-, 2013
- Mori Y, Watanabe M, Nakagawa S, Asawa Y, Nishizawa S, Saijo H, Nagata S, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K.: Hollow fiber module applied for effective proliferation and harvest of cultured chondrocytes. *Mater Sci Appl* 4(8):62-7, 2013
- Maeda Y, Suenaga H, Sugiyama M, Saijo H, Hoshi K, Mori Y, Takato T. Clinical presentation of epignathus teratoma with cleft palate; and duplication of cranial base, tongue, mandible, and pituitary gland. *J Craniofac Surg* 24(4):1486-91, 2013
- Choi S, Liu IL, Yamamoto K, Igawa K, Mochizuki M, Sakai T, Echigo R, Honnami M, Suzuki S, Chung UI, Sasaki N. Development and evaluation of tetrapod-shaped granular artificial bones. *Acta Biomater* 8(6):2340-7, 2012
- Mori Y, Susami T, Saijo H, Okubo K, Uchino N, Hoshi K, Takato T: Mandibular body ostectomy for correction of mandibular prognathism – a technical note. *Oral Sci Int* 9(1):21-25, 2012

12. Abe M, Mori Y, Saijo H, Hoshi K, Ohkubo K, Ono T, Takato T. The efficacy of dental therapy for an adult case of Henoch-Schönlein Purpura. Oral Sci Int 9(2):59-62, 2012
13. Mori Y, Susami T, Haga N, Tamura K, Kanno Y, Saijo H, Takato T. Extraction of 6 molars under general anesthesia in patient with fibrodysplasia ossificans progressiva. J Oral Maxillofac Surg 69(7):1905-10, 2011

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Kanke K, Saito S, Hojo H, Lichtler AC, Chung UI, Ohba S: Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. Cell symposia 2013- Stem cells to model and treat human disease, 2013.11, Los Angeles, CA, USA
2. Kanke K, Saito T, Hojo H, Lichtler AC, Chung UI, Ohba S: Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts with four small molecules under a serum-free condition. 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2013.10, Baltimore, MD, USA
3. Kanke K, Hojo H, Lichtler AC, Chung UI, Ohba S: Novel approach for the differentiation of embryonic stem cells into osteoblasts under a chemically-defined condition. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, 2013.5, Kobe, Japan (Travel Award)
4. Mori Y, Susami T, Saijo H, Uchino N, Ohkubo K, Inokuchi T, Okayasu M, Uwatoko K, Hoshi K, Takato T. Outcome of the surgical-orthodontic treatment in patients with clefts using the two-stage surgery combining maxillary distraction with mandibular setback osteotomies. 12th International Congress on Cleft Lip/Palate and Related Craniofacial Anomalies, May 5 -10, 2013, Florida USA, Hilton Orlando Lake Buena Vista
5. 菅野勇樹, 西條英人, 鄭雄一, 森良之, 高戸毅: in situ Tissue Engineering 型カスタムメイド人工骨の骨癒合状態の CT による評価. 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 福岡, 2013.10
6. Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata H, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI: Gli1 Participates in the Indian Hedgehog-mediated Osteogenesis during Endochondral Ossification. 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2012.10, Minneapolis, MN, USA (Travel Award)
7. Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI: Osteo-chondrogenic Function of BMP is Directed Toward Osteogenesis by Hh-Gli1 in the Perichondrium. 34th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2012.10, Minneapolis, MN, USA
8. Yano F, Hosaka Y, Fukai A, Saito T, Hojo H, Ohba S, Kawaguchi H, Chung UI: Prevention and Repair of Cartilage Degeneration by a Novel Small Thienopyridone-derivative Compound. 2012 World Congress on Osteoarthritis, 2012.4, Barcelona, Spain
9. 森良之, 末永英之, 古賀陽子, 菅野勇樹, 杉山円, 瀬戸一郎, 西條英人, 星和人, 高戸毅: 下顎枝矢状分割術における超音波骨切削器(ピエゾサージェリーシステム®)を用いた Short lingual osteotomy (SLO). 第 57 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術集会 2012 年 10 月 19 - 21 日 パシフィコ横浜会議センター, 神奈川県横浜市
10. 阿部雅修, 森良之, 西條英人, 安部貴大, 杉山円, 古賀陽子, 高戸毅: 口腔前癌病変悪性化におけるエピジェネティクスを指標としたリスクマーカーのゲノム網羅的探索. 第 35 回日本頭頸部癌学会 2011 年 6 月 8 - 10 日 ウィンクあいち, 名古屋
11. Mori Y, Susami T, Saijo H, Ohkubo K, Kanno Y, Suenaga H, Seto I, Hoshi K, Takato T: A 2-stage surgery combining mandibular distraction with a Le Fort I maxillary osteotomy in a patient with hemifacial microsomia. 9th European Craniofacial Congress, September 14-17, 2011, Salzburg, Austria, Salzburg Congress

〔図書〕(計1件)

1. 森良之・高戸毅:「15章消化器疾患 5 口腔疾患」内科学, 門脇孝・永井良三総編集, 西村書店(東京), 2012, pp838-841.

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

- 東京大学医学部附属病院顎口腔外科・歯科矯正歯科ホームページ:

<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 良之 (MORI, Yoshiyuki)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 70251296

(2)研究分担者

西條 英人 (SAIJO, Hideto)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 80372390

鄭 雄一 (TEI, Yuichi/ CHUNG, Ung-il)
東京大学・工学系研究科・教授
研究者番号: 30345053

矢野 文子 (YANO, Fumiko)
東京大学・医学系研究科・特任助教
研究者番号: 80529040

(3)連携研究者

片岡 一則 (KATAOKA, Kazunori)
東京大学・工学系研究科・教授
研究者番号: 00130245

小笠原 徹 (OGASAWARA, Toru)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20359623