

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 中井 敬

### 論文題目

Osteogenic Response to Polysaccharide Nanogel Sheets of Human Fibroblasts After Conversion into Functional Osteoblasts by Direct Phenotypic Cell Reprogramming.

### 論文内容の要旨

#### 【緒言】

骨芽細胞は骨基質を生成することで骨組織を形成する細胞である。骨芽細胞と適切な足場材料を用いた自家再生骨組織を移植できれば、種々の骨疾患に対して、効果的な骨再生医療となりえるであろう。骨芽細胞のソースとして、間葉系幹細胞や iPS 細胞が考えられるが、前者は採取時の侵襲、得られる幹細胞数の不足、後者は未分化多能性幹細胞の残存による腫瘍化のリスクといった問題点がある。これまでに我々は、皮膚線維芽細胞を骨芽細胞へ直接転換するダイレクト・コンヴァージョン技術を開発し、直接誘導骨芽細胞 (dOB) を得ることに成功した。一方、天然多糖プルランを主成分とした多孔質足場材料である Nanogel-crosslinked porous freeze-dried gel (FD-NanoCliP gel) を京都大学工学研究科生体機能高分子研究室の秋吉教授らと共同で開発し、この FD-NanoCliP gel 上の 3D 培養でも線維芽細胞から骨芽細胞をダイレクト・コンヴァージョンにより誘導できることを報告してきた。しかしながら、この我々の先行研究では骨芽細胞を誘導する手段としてレトロウイルスベクターを用いており、レトロウイルスベクターを導入した細胞は移植に用いるには望ましいとは言えない。我々は最近、レトロウイルスベクターの代わりに小分子化合物 (TGF- $\beta$  阻害剤 (ALK5 i II)) を用いたケミカル・ダイレクト・コンヴァージョン法を開発したが、この方法が足場材料上でも有効か否かは未解明であった。一方、上記研究で用いた FD-NanoCliP gel は fiber 状であったが、大規模骨欠損に応用するには sheet 状であることがより望ましい。そこで本研究では、sheet 状の FD-NanoCliP gel を新たに開発するとともに、FD-NanoCliP gel 上でヒト線維芽細胞から骨芽細胞への 3D ケミカル・ダイレクト・コンヴァージョンを誘導し、得られた骨組織の性状を atelocollagen や fiber 状の FD-NanoCliP gel と比較した。

#### 【材料と方法】

調査した 3 種類の足場 (FD-NanoClip fiber, FD-NanoClip sheet, atelocollagen sheet) に対して、分子スケールでの構造の違いを評価するためにラマン分光法で解析した。

各足場材料にヒト線維芽細胞をそれぞれ播種し、小分子化合物である TGF- $\beta$  阻害剤 (ALK5 i II) とビタミン D3 を添加または非添加した骨分化誘導培地で 3 次元培養を行った。骨芽細胞分化マーカー ALP (アルカリフォスファターゼ) と OC (オステオカルシン) の mRNA 発現を real time RT-PCR で、石灰化基質産生を Alizarin Red S 染色で、生成さ

れた骨基質の骨質を Fourier 変換赤外分光法 (ATR-FTIR) 解析でそれぞれ評価した。

#### 【結果】

##### 1. 各足場材料のラマン分光法解析

FD-NanoCliP fiber では FD-NanoClip sheet と比較しクロス様構造が豊富であった。

##### 2. 3D 培養下におけるヒト線維芽細胞の骨芽細胞へのケミカル・コンヴァージョン

Alizarin Red S 染色の結果、すべての足場材料で未分化対照群よりも高い石灰化基質産生を認めた。FD-NanoClip fiber-dOB は、FD-NanoClip sheet-dOB と比較すると、2 倍程度の石灰化基質の産生を認め、atelocollagen sheet-dOB と比較すると 4 倍以上の石灰化基質産生を認めた。また、real time RT-PCR では、いずれの足場材料を用いた場合でも誘導骨芽細胞群において誘導培地で培養した対照群よりも高い ALP と OC の mRNA 発現を認めた。ALP 発現は、FD-NanoClip fiber-dOB では FD-NanoClip sheet-dOB の約 2.3 倍の値を示し、OC 発現は、すべての足場材料中の dOB で同等レベルの発現を認めた。

##### 3. ATR-FTIR による骨質解析

骨代謝回転率と類骨形成の程度を反映するミネラル対マトリックス比は、FD-NanoClip fiber-dOB では 0.32、FD-NanoClip sheet-dOB では 0.2、atelocollagen sheet-dOB では 0.14 であり、Alizarin Red S 染色で明らかにした石灰化基質産生量との相関が確認された。また酸による溶解度に関連する炭酸塩対リン酸塩比は、FD-NanoClip fiber-dOB では 0.7、FD-NanoClip sheet-dOB では 1.0、atelocollagen sheet-dOB 複合体では 1.2 であり、これらの結果より FD-NanoClip fiber-dOB が最も強固な骨基質組成を示し、atelocollagen sheet-dOB が最も脆弱な骨基質組成を示した。

#### 【考察】

従来の fiber 状に比して大きな骨欠損にも適用しうると考えられる sheet 状の FD-NanoClip を作成することに成功した。また小分子化合物を用いた 3D ケミカル・ダイレクト・コンヴァージョンを、その上で誘導できた。FD-NanoClip fiber-dOB では FD-NanoClip sheet-dOB よりも約 30% 高いミネラル含有比を認めたが、その理由として、ラマン分光法で明らかになった化学的構造の違いが骨芽細胞分化度に寄与している可能性が考えられた。また FD-NanoClip dOB の炭酸塩対リン酸塩比は、健康な被験者の骨の平均値と比較して 3~4 倍高い値を示したことから、強度的には正常骨に比してやや劣ると考えられた。しかし、通常の臨床で現在使用されている人工足場は炭酸塩対リン酸塩比が正常骨よりもむしろ低くなっており、強度は十分であるが、破骨細胞に吸収されて骨組織に置換されず移植部に長期間残存するといった欠点もある。それに対し、FD-NanoClip-dOB は破骨細胞に吸収されやすいと考えられるため、新しい内因性骨に迅速に置換しえる可能性が示唆され、生体適合性が高いと考えられる。したがって、3D 再生骨組織には、石灰化骨基質の産生量だけでなく、形成された骨基質の骨質も重要であると考えられる。本技術は、骨質の低下した有病者や高齢者に対して良質の自家骨組織を提供する新たな骨再生医療の基盤になり得ると考えられる。