

# 博士論文審査結果の要旨

学位申請者 中 井 敬

主論文 1 編

Osteogenic Response to Polysaccharide Nanogel Sheets of Human Fibroblasts After Conversion Into Functional Osteoblasts by Direct Phenotypic Cell Reprogramming.  
Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 9 : 695, 2021

## 審 査 結 果 の 要 旨

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、骨疾患に対して効果的な骨再生医療となりえる。これまでに申請者らは、線維芽細胞から骨芽細胞へ直接転換するダイレクト・リプログラミング (DR) 技術を開発し、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) 上でも dOB (直接誘導骨芽細胞) を誘導できることを報告したが、この先行研究ではレトロウイルスベクターを用いており、安全性に問題があった。そこで最近、小分子化合物を用いたケミカル DR 技術を開発したが、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。そこで申請者は、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 DR を行い検討した。

申請者は、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。ま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) を添加/非添加した骨分化誘導培地で 3 次元培養を行い、Alizarin Red S 染色, Real time RT-PCR, ATR-FTIR 解析で評価した。

ラマン分光法解析の結果、FD-NanoClip fiber では FD-NanoClip sheet と比較しスクロース様構造が豊富であった。Alizarin Red S 染色の結果、すべての足場材料で非添加対照群よりも高い石灰化基質産生を認め、FD-NanoClip fiber-dOB が最も高く、atelocollagen sheet-dOB が最も低かった。Real time RT-PCR では、すべての足場材料で非添加対照群よりも高い ALP と OC の mRNA 発現を認め、ALP 発現は FD-NanoClip fiber-dOB が最も高い発現を認めた。ATR-FTIR による骨質解析の結果、ミネラル対マトリックス比は、FD-NanoClip fiber-dOB が最も高く、atelocollagen sheet-dOB が最も低かった。また酸による溶解度に関連する炭酸塩対リン酸塩比の結果より、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。

申請者は新規に開発した sheet 状の FD-NanoClip 上で 3D ケミカル DR に成功した。FD-NanoClip fiber-dOB において最も高いミネラル含有比を認めたのは、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。FD-NanoClip dOB の炭酸塩対リン酸塩比の結果から、強度的には正常骨に比してやや劣るが、破骨細胞に吸収されやすく、新しい内因性骨に迅速に置換しえるため、生体適合性が高いと考えられた。これより、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。

以上が本論文の要旨であるが、本技術は、骨髄炎や骨腫瘍切除後の骨欠損等に対して良質の自家骨組織を提供する新たな再生医療の基盤になり得ると考えられる点で、医学上価値ある研究と認める。

令和 3 年 12 月 16 日

審査委員 教授 八木田和弘 ㊟

審査委員 教授 田中雅樹 ㊟

審査委員 教授 田中秀央 ㊟