

審査の結果の要旨

氏名 趙基源

骨の小さな欠損は自然治癒も可能であるが、事故や疾患などによる骨の大きな欠損の再生には大きな困難が伴う。このような骨欠損を修復するために、チタンなどの金属材料や、多孔性ヒドロキシアパタイトなどのセラミックス材料を用いた骨代替材料がこれまでに開発され、これらの人工骨の移植による治療が試みられているが、生体適合性が低く、骨再生能が不十分であるという課題があった。そこで近年、細胞、その足場材料、骨形成因子などを複合化し、組織工学的アプローチによって作製した培養人工骨が、生体適合性、骨再生能の観点から注目されている。すなわち、生体外の人工的な細胞培養環境下において、足場材料、骨分化・成長因子の適切な組み合わせにより細胞の分化能や骨生成能を制御し、生体内での骨再生過程を模倣することによって、生体適合性、骨再生能の高い培養人工骨を作製する技術の開発が望まれている。

本論文では、細胞として骨肉腫細胞、骨芽前駆細胞、骨芽細胞、間葉系幹細胞、繊維芽細胞などを用い、また、細胞の足場材料としてゼラチンヒドロゲル、コラーゲンスポンジ、コラーゲンビトリゲル、リン酸カルシウムセメントなどを用い、これに骨形成タンパク質やカルシウムイオン、骨疾患治療用漢方薬成分であるハーブ由来フラボノイド配糖体イカリン、ヘリオキサンチン誘導体 (TH) などの低分子化合物を添加し、生体外培養系において石灰化能評価ならびに石灰化関連蛋白質であるオステオポンチン (OP)、骨シアロタンパク質 (BSP)、石灰化反応促進に係る転写因子である RunX2、骨誘導分化マーカーである細胞内アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオカルシン (OC) などの mRNA 転写レベルあるいはタンパク質発現レベルの詳細な解析を行なっている。さらに、このような組織工学的アプローチによって作製した培養人工骨をマウスに移植して生体内での生体適合性、骨形成能の評価を行い、実用的な培養人工骨作製技術の開発を行ったものである。

本論文は、全5章から構成されている。

第1章では、本論文の意義を明確にするために、本研究の背景およびその目的について述べている。

第2章では、カルシウムイオンが細胞の石灰化能、骨誘導分化に及ぼす影響を検討している。すなわち、ゼラチンヒドロゲル、コラーゲンスポンジを足場材料に用いて骨肉腫細胞 MG63、野生型 C57BL/6N マウスから採取した骨芽細胞 POB、繊維芽細胞、骨芽前駆細胞 MC3T3-E1 などを培養し、培地中に添加するカルシウムイオン濃度を 2mM から 10mM の範囲で変化させ、石灰化能、各種マーカー蛋白質の mRNA 転写レベルに及ぼす影響を検討している。その結果、カルシウムイオン濃度が 8mM-10mM の高濃度条件では、足場材料、細胞の種類にかかわらず、石灰化量ならびに石灰化に関連する蛋白質 OP、RunX2 の mRNA の転写量が著しく向上することを見出している。しかし、骨誘導分化の初期マーカーである ALP、後期マーカーである OC の mRNA 転写量の増加は認められなかったため、高濃度のカルシウムイオンは石灰化を促進するものの、細胞の骨誘導分化には寄与しないと結論づけている。さらに、高濃度カルシウムイオン条件下で骨芽前駆細胞 MC3T3-E1 をゼラチンヒドロゲル上で培養して作製した培養人工骨と繊維芽細胞をコラーゲンスポンジ上で培養して作製した培養人工骨をマウス頭骨欠損部に移植して生体適合性、骨形成能を評価した結果、ゼラチンヒドロゲルは生体適合性が低く移植部周辺の炎症が誘起され、コラーゲンスポンジの場合には生体適合性が高いものの骨形成能は認められなかった。骨形成能が認められなかった理由として、RunX2 を高発現させると骨芽細胞の分化が抑制されることが知られているこ

とから、高濃度のカルシウムイオンが RunX2 を高発現させたことが、骨形成抑制の原因ではないかと考察している。

第3章では、フラボノイド配糖体イカリン、ヘリオキサンチン誘導体(TH)などの低分子化合物の骨誘導分化効果について検討している。すなわち、骨芽前駆細胞 MC3T3-E1、骨芽細胞 POB に対して 10^{-10} M から 10^{-5} M の濃度のイカリンを添加して培養し、石灰化量、ALP 活性、ALP、BSP、OC、RunX2 などの mRNA 転写量に及ぼす影響を評価している。その結果、イカリン濃度が 10^{-5} M の条件下で石灰化量、ALP、BSP、OC、RunX2 の mRNA 転写量が顕著に増加し、イカリンが骨芽前駆細胞、骨芽細胞の骨誘導分化を著しく促進することを明らかにしている。しかし、強力な骨誘導分化促進作用を有する骨形成蛋白質 (BMP-2) を 100ng/mL 添加した場合と比較すると、RunX2 の mRNA 転写レベルでは同等の促進効果が得られるものの、OC と BSP の mRNA 転写レベルはそれぞれ $1/6$ 、 $1/3$ 程度であった。また、TH を 10^{-6} M で培地に添加した場合にも骨誘導分化促進作用が見られたが、BMP-2 の場合と比較して RunX2、OC、BSP の mRNA 転写レベルはそれぞれ $1/3$ 、 $1/6$ 、 $1/15$ 程度であり、単独の添加による骨誘導分化促進効果は BMP-2 に及ばなかった。しかし、 10^{-5} M のイカリンと 10^{-6} M の TH を同時に添加した場合には、シナジー効果により RunX2、OC、BSP の全ての mRNA 転写レベルが BMP-2 を 100ng/mL 添加した場合とほぼ同じレベルまで促進されることを見出している。さらに、イカリンを含有させたリン酸カルシウムセメントを足場材料としてマウス頭骨欠損部に移植する *in vivo* 実験ならびに骨粗鬆症モデルマウスにイカリンを血中投与する *in vivo* 実験において、それぞれ頭骨欠損部における顕著な骨再生、骨粗鬆症モデルマウスの骨量増加が認められたことより、培養人工骨のさらなる骨誘導分化促進効果が、イカリンと TH のシナジー効果によって *in vivo* でも期待できると述べている。また、イカリンや TH などの低分子化合物は BMP-2 と比較して安定性に優れ、価格も極めて廉価であるため、BMP-2 に代わる骨誘導分化促進因子として有望であり、骨再生医療分野への応用が期待できることを指摘している。

第4章では、BMP-2 を含浸させた2種類の足場材料、コラーゲン Type I ゲルとこれを乾燥してガラス化させたコラーゲンビトリゲルについて、BMP-2 の徐放挙動ならびに徐放された BMP-2 生物活性を検討している。その結果、ゲルマトリックスの網目構造の目開きが小さいコラーゲンビトリゲルのほうがコラーゲンゲルよりも BMP-2 の徐放速度は遅く、徐放速度は時間とともに指数関数的に減少するものの、15日以上にわたって BMP-2 を徐放することが可能であることを明らかにしている。さらに培養液中に徐放された BMP-2 は高い骨誘導分化促進活性を維持していることから、培養液中では1日程度で分解されて失活しやすい BMP-2 を、ゲル中で安定化できることを明らかにしている。また、BMP-2 を含浸させたコラーゲンビトリゲルをマウス頭骨欠損部に移植する *in vivo* 実験の結果、顕著な骨再生が観察されたため、コラーゲンビトリゲルは培養人工骨用の足場材料として有望であると述べている。

第5章では、本研究の纏めと展望について述べている。

以上、本論文は、フラボノイド配糖体イカリン、ヘリオキサンチン誘導体 TH などの低分子生理活性物質を含むコラーゲンビトリゲル、リン酸カルシウムセメントなどの足場材料を用いることにより、生体適合性、骨再生能の高い人工骨を *in vitro*、*in vivo* で作製する技術を開発したものである。これらの成果は再生医療分野をはじめとする化学生命工学分野の発展に寄与するところが多い。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。