

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

分担研究者 木全 弘治 愛知医科大学分子医科学研究所 教授

研究要旨

軟骨の基質マーカーの生化学的および分子生物学的研究を詳細に行い、細胞分化の評価を行っていく。今後、MSC から軟骨細胞への分化度を測定する上で、各種軟骨マーカーの動態を明らかにしておく必要がある。軟骨細胞中のタンパク量および RNA 量などを調べた結果、軟骨マーカーとして、コンドロカルシン、ムコ多糖、コンドロイチン硫酸、II 型コラーゲン量が軟骨評価できる候補として決定する事ができた。

A. 研究目的

MSC の軟骨分化過程に及ぼす種々の影響を評価するためには、軟骨細胞を評価できるマーカーが必要である。今回は軟骨細胞マーカーの決定を目的に実験を行った。

B. 研究方法

牛軟骨細胞またはヒト MSC から軟骨へ分化させた細胞からタンパク質および RNA を抽出し、ウエスタンブロット、ノーザンブロット法により各種マーカー候補の検定を行った。

（倫理面への配慮）

採取したすべての組織についてドナー情報は秘密にて行うこととした。また動物実験においては使用動物および使用法に関して慣例を逸脱しないように配慮した。

C. 研究結果

軟骨細胞に分化した細胞中においては、タンパク量当たりのコンドロカルシン、ムコ多糖、コンドロイチン硫酸、II 型コラーゲン量が有意に増加していた。それぞ

れの RNA においてもタンパクの増加と同様に、各 RNA の上昇が見られた。

D. 考察

軟骨細胞や MSC から軟骨へ分化を試みた細胞において、一般的に軟骨マーカーであると言われているコンドロカルシン、ムコ多糖、II 型コラーゲンなどの上昇が認められた。本研究の結果からこれら細胞は軟骨細胞への細胞変化を認め、どのような細胞の位置づけか同定できることが予想された。移植後これらのマーカーが軟骨形成時にも上昇する事が明らかとなったため、新しい人工軟骨作成の上で役に立つであろう。

E. 結論

軟骨細胞分化時に各種軟骨マーカーの上昇を認め、人工軟骨作製時および細胞同定にこれらのマーカーを測定することが有用である事が分かった。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大

な影響を及ぼす事項は発生しておりません。

G. 研究発表

1. 論文発表

L. Zhuo, M. Yoneda, M. Zhao, W. Yingsung, N. Yoshida, Y. Kitagawa, K. Kawamura, T. Suzuki, K. Kimata. Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility. J Biol Chem 2001; 276:7693-7696.

J. Rong, H. Habuchi, K. Kimata, U. Lindahl, M. Kusche-Gullberg. Substrate specificity of the heparan sulfate hexuronic acid 2-O- sulfotransferase. Biochemistry 2001; 40:5548-5555

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

総括研究報告書に記す

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

分担研究者 春日 敏宏 名古屋工業大学工学部材料工学科

ハイブリッド機能機構学講座 助教授

研究要旨

注入型骨作製に関わる新規マトリックスの開発を行った。今までに注入型骨材料として検討を行ってきた、アルギン酸+ β TCP+MSC などの注入型マトリックスでは骨が十分にできていないことより、新しい材料の作製が期待されている。今回バテライトを多く含む炭酸カルシウム複合材(CPC)を作製し、アパタイト生成能を比較検討したところ、大きく向上した。

A. 研究目的

注入型骨移植は臨床現場で有効かつ使用が簡便な材料形状を念頭に置いた人工骨の開発を目指す上で重要な位置を占める。そこでよりよい新規注入型骨材料の開発を行った。

B. 研究方法

メタノール中に水酸化カルシウムを懸濁しし、炭酸ガスを吹き込んだものに分子量 16 万の PLA の溶液を加え攪拌させた後、乾燥させた。PLA:CC の重量比は 1:3 とした。乾燥物を粉碎したものを金型成型したのち熱処理しディスク上の資料とした。作製した試料を SBF に浸漬後、試料表面の状態を XRD, FT-IRRS により調べた。

(倫理面への配慮)

本研究において倫理面で問題となるようなことは行っていない。

C. 研究結果

20 分バブリングした試料にはカルサイ

トが多く存在しており、6 時間バブリングした試料はバテライトが多く存在することがわかった。後者では、XRD, FT-IRRS より、SBF 浸漬一日でアパタイトに起因するピークがはっきりと見られるようになった。CPC のアパタイト生成能は、バテライト含有量によって制御でき、カルサイトが多く存在する試料がアパタイト生成に 2 日を要したのに比べて、今回その生成能は大きく向上した。

D. 考察

新規炭酸カルシウム複合材(CPC)がアパタイトの析出において良好な結果を得る事ができた。新しい骨移植材料として注目される。

E. 結論

MSC とアルギン酸と新規 CPC とを混ぜ、骨を作製した群に置いては、アパタイトの析出はみられたものの、まだ良好な骨ができたとは言えず、CPC と混ぜ合わせる注入

型材料の検討がさらに必要である。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす事項は発生しておりません。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kasuga T. Ota Y. Nogami M. Abe Y.
Preparation and mechanical properties of
polylactic acid composites containing
hydroxyapatite fibers. *Biomaterials*.
22(1):19-23, 2001

Kasuga T. Mizuno T. Watanabe M. Nogami M.
Niinomi M. Calcium phosphate invert
glass-ceramic coatings joined by
self-development of compositionally gradient
layers on a titanium alloy. *Biomaterials*.
22(6):577-82, 2001

2. 学会発表

Maeda,K., Kasuga,T., Nogami,M., Hibino, Y.,
Okada,K., Hata, K.Ueda, M., Ota,
Y.:Biomimetic apatite formation on calcium
carbonate composites (CPC)

セラミックス学会

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特許出願予定中

研究成果の刊行に関する一覧表

Ueda M., Tohnai I., Nakai H. Tissue engineering research in oral implant surgery. *Artificial Organs*. 25(3): 164-71, 2001

Sumi, Y., Muramatsu, H., Hata, K., Ueda, M., Muramatsu, T.

Midkine Enhances Early Stages of Collagen Gel Contraction *J. Biochem* 2000 127 : 247-251

Ueda, M., Sumi, Y., Mizuno, H., Honda, M., Oda, T., Wada, K., Boo, J., Hata, K.

Tissue engineering: application for maxillofacial surgery

Materials Science and Engineering 2000 C13 7-14

Sumi, Y., Muramatsu, H., Hata, K., Ueda, M., Muramatsu, T.

Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Is a Novel Inhibitor of Fibroblast-mediated Collagen Gel Contraction. *Experimental Cell Research* 2000 256 : 203-212

Minoru Ueda, et al.: Establishment of Bioskin bank: How we do it in our hospital.

Ann. Plast. Surg. 1999, 42, 5, 574-576

Honda, M., Yada, T., Ueda, M., and Kimata, K.:

Cartilage formation by cultured chondrocytes in a new scaffolds made of poly (L-lactide-ε-caprolactone) sponge, *J. Oral Maxillofac., Surg*, 58, 767-775, 2000.

夫 才成, 日比野祥敬, 山田陽一, 新美 敦, 本田雅規, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 吉川隆章, 上田 実.

生体吸収性セラミック β-TCP を足場に用いた培養人工骨に関する実験的研究.

日本口腔外科学会誌, VOL47, 2000

(分担研究者)

(畠 賢一郎)

Maeda, H., Kasuga, T., Nogami, M., Hibino, Y., Hata, K., Ueda, M., Ota, Y. Biomimetic apatite formation on polylactic acid composites containing calcium carbonates

Journal of Materials Research, (as a Rapid Communication)(in press)

Boo JS, Yamada, Y., Okazaki, Y., Hibino, Y., Okada, K., Hata, K., Yoshikawa, T., Sugiura, Y.,

Ueda, M. Tissue Engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold *J. Cranio-fac. Surg.* (in press)

Hiramatsu. Kagami H. Horie K. Okazaki Y. Shigetomi T. Hata K. Kobayashi S. Ueda M. Effects of basic fibroblast growth factor on cultured rat and human submandibular salivary gland cells.

Archives of Oral Biology. 45(7): 593-9, 2000

M. Matsuno, K. Hata, et al: In vitro analysis of distraction osteogenesis

J. Craniofac. Surg. 2000 11(4): 303-307

H. Mizuno, N. Emi, A. Abe, I. Takahashi, T. Kojima, H. Saito, Y. Sumi, K. Hata, M.

Ueda: Successful Culture and Sustainability in Vivo of Gene-Modified Human Oral Mucosal Epithelium. *Human Gene Therapy*, 1999 10, 825-830,
 Ueda, M., Matsuno, M., Sakai, K., Hata, K.
 Mechanism of New Bone Formation During Distraction Osteogenesis
 Craniofacial Distraction osteogenesis: 37-41, 2001
 Yukio Sumi, Ken-ichiro Hata, Yoshihiro Sawaki, Hirokazu Mizuno, Minoru Ueda: Clinical application of cultured oral epithelium for palatal wounds after palatoplasty: a preliminary report.
Oral Diseases, 1999,5,307-312
 (鳥居 修平)
 Ando H. Ito K. Torii S. Kasai Y. Akiyama S. Nakao A. Pedicle myocutaneous flaps for reconstruction following total pelvic exenteration of intrapelvic recurrent rectal cancer: report of a case. *Surgery Today*. 31(4): 363-6, 2001.
 Kato H. Takada T. Yukawa Y. Yanase M. Torii S. External venous shunt as a solution to venous thrombosis in microvascular surgery. *British Journal of Plastic Surgery*. 54(2): 164-6, 2001
 Kamei Y. Torii S. Hasegawa T. Aoyama H. Yokoo K. Endoscopic correction of pectus excavatum. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2001 107(2): 333-7
 Kamei Y. Torii S. Natural skin reduction and breast recovery using a tissue expander after enucleation of a giant breast tumour. *Scandinavian Journal of Plastic & Reconstructive Surgery & Hand Surgery*. 2000 34(4):383-5
 Iwashita N., Muramatsu H., Toriyama K., Torii S., Muramatsu T.: Expression of midkine in normal and burn sites of rat skin. *Burns*: 1999, 25(2):119-124
 (小林 猛)
 Hirokazu Kikuta, Kenjiro Kano, Hiroyuki Honda and Takeshi Kobayashi : Optimization of bovine cathepsin C production by cultivation of recombinant methylotrophic yeast *Candida boidinii*, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 2001 34(6), 848-851
 Masataka Suzuki, Masashige Shinkai, Hiroyuki Honda, Masamichi Kamihira, Shinji Iijima and Takeshi, Kobayashi : Construction of tumor- specific cells expressing a membrane- anchored single-chain Fv of anti-ErbB-2 antibody, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001 1525, 191-196
 Eiji Nagamori, Mariko Omote, Hiroyuki Honda and Takeshi Kobayashi : Enhanced and prolonged production of regenerated plantlet from carrot callus in viscous additive-supplemented medium, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001 91(3), 283-287
 (高井 治)
 Gomez-Vega JM. Hozumi A. Saiz E. Tomsia AP. Sugimura H. Takai O. Bioactive glass-mesoporous silica coatings on Ti6Al4V through enameling and triblock-copolymer-

templated sol-gel processing. *Journal of Biomedical Materials Research*. 56(3): 382-9, 2001

N.Asai,Y.Inoue,H.Sugimura, O.Takai:Structural and Electrochromic Properties of InN Thin Films *Thin Solid Films*,:1999,Vol.332 No.1 267

H.Sugimura,O.Takai,N.Nakagiri:Scanning Probe Lithography for Electrode Surface Modification.*J.Electroanal.Chem*:1999, Vol.473 No.1-2,230 234

H.Sigimura,Y.Sato,K.shiyama,O.Takai,Y.Sakamoto,M.Takaya,N.Nakagiri:Characterization of Individual Diamond Crystals in Micro Diamondrrays Using an AFM-based Technique. *Appl.Surf. Sci.*: 1999,1, 144-145,593-597

(木全 弘治)

L. Zhuo, M. Yoneda, M. Zhao, W. Yingsung, N. Yoshida, Y. Kitagawa, K. Kawamura, T. Suzuki, K. Kimata. Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility. *J Biol Chem* 2001; 276:7693-7696.

J. Rong, H. Habuchi, K. Kimata, U. Lindahl, M. Kusche-Gullberg. Substrate specificity of the heparan sulfate hexuronic acid 2-O- sulfotrans- ferase. *Biochemistry* 2001; 40:5548-5555

(春日 敏宏)

T. Kasuga, Y. Hosoi, M. Nogami, and M. Niinomi, *J. Am. Ceram. Soc.*, Apatite Formation on Calcium Phosphate Invert Glasses in Simulated Body Fluid, Soc 2001., 84, 450-452

T. Kasuga, Y. Ota, M. Nogami, and Y. Abe, Preparation and Mechanical Properties of Polyactic Acid Composites Containing Hydroxyapatite Fibers, *Biomaterials*, 2001 22, 19-23

T. Kasuga, T. Mizuno, M. Watanabe, M. Nogami, and M. Niinomi, Calcium Phosphate Invert Glass-Ceramic Coatings Joined by Self-Development of Compositionally Gradient Layers on a Titanium ALLOY, *BIOMATERIALS*, 2001 22, 577-582

(小林 一清)

Yoshihiro Nishida, Kideaki Tamakoshi, and Kazukiyo Kobayashi
A Novel Bovin b1, 4-Galactosyltransferase Reaction with an Acyclic Amino Alcohol to Yield 3-O-b-D-Galactosyl-sn-glycerol Skeleton *Org. Lett.* 2001 3, 1-3

Kazunori Matsuura, Miki Hibino, Yoshinao Yamada, and Kazukiyo Kobayashi
Construction of Glyco-clusters by Self-organization of Site-sepcifically Glycosylated Oligonucleotides and Their Cooperative Amplification of Lectin-recognition *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 357-358

Yoshihiro Nishida, Masaya Suzuki, Kazukiyo Kobayashi, Yoshiharu Toriumi, and Hideki Hashimoto
Crystal Structure of Methyl 5-Acetamido-2-t-butyl-2-methyl-1, 3-benzodioxole-4-carboxylate *Anal. Sci.* 2001, 17, 685-686

知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特許取得

特願 2002-64235

骨又は歯周組織形成用の組成物

PCT/JP01/07289

骨又は歯周組織形成用医薬組成物及びその調整方法、並びに、骨又は歯周組織形成用注射剤及びその調整法

PCT/JP01/9800

骨又は歯周組織形成用組成物及び骨又は歯周組織形成用注射剤

実用新案登録

当該数件について登録出願検討中である

その他

特になし