

学位論文

Stromal cell-derived factor-1
担持スキャホールドを用いた
骨組織誘導の促進

学位申請者 伊達 智美

広島大学大学院医歯薬保健学研究院

応用生命科学部門歯科矯正学

主指導教員：谷本 幸太郎 教授

2016 年度

目次

1. 緒言	1
2. 実験	
2. 1 SDF-1-KL5 の作製とキャラクタリゼーション	3
1-1 スキャホールド結合性 SDF-1-KL5 の合成	
1-2 円二色性分光分析 (CD 分析)	
1-3 Boyden chamber 法による細胞走化性試験	
1-4 受容体の発現解析	
2. 2 SDF1-KL5/P(LA/CL) を複合化した多孔質性スキャホールドの作製	5
2-1 生体分解性多孔質スキャホールド	
2-2 走査型顕微鏡 (SEM) 観察	
2-3 表面プラズモン (SPR) 共鳴分析	
2-4 SDF1-KL5/P(LA/CL) スキャホールド複合体の作製	
2. 3 SDF1-KL5 担持 P(LA/CL) スキャホールドを用いた動物内骨再生試験	7
3-1 ラット頭蓋骨内埋入試験	
3-2 マイクロ CT 解析	
3-3 組織学的観察	
3. 結果および考察	
3. 1 SDF-1-KL5 の作製および構造・機能分析	10
1-1 SDF-1-KL5 の設計および作製	
1-2 CD 分析	
1-3 SDF1-KL5 の機能評価	

3. 2	SDF1-KL5/P(LA/CL) 複合化スキャホールドの作製	14
2-1	SDF1-KL5 の P(LA/CL)への吸着	
2-2	P(LA/CL) スポンジへ SDF1-KL5 の担持	
3. 3	SDF1-KL5 担持 P(LA/CL) スキャホールドによる骨再生誘導に関する動物実験	17
4.	結論	22
5.	参考文献	24

1. 緒言

現在、骨欠損を伴う口唇口蓋裂の治療には自家骨移植が一般的である。Boyneら¹⁾は新鮮自家腸骨海綿骨を用いることで顎裂部の再建が可能であることを報告している。しかしながら、この治療法では、骨採取時の患者への外科的侵襲が大きい上に、移植骨の吸収など移植部位の形態維持が難しく、また術後に良好な骨架橋形成が起こりにくい²⁾など様々な問題を抱えている。

このような問題を解決する新たな手段として、生体分解性スキャホールドを用いた組織工学による治療が注目されている³⁾。スキャホールドの力学的性質を制御することによって、移植体の形態維持が容易なことから、各種の口腔内組織の再生治療研究が盛んに行われている^{4,5)}。口唇口蓋裂のような比較的大きな骨欠損の場合、スキャホールド内部での骨形成には長時間を要するため、骨組織の新生を促進する細胞、ならびに、細胞増殖・分化制御の可能な因子を併用する試みも数多くみられる^{6,7)}。

1988年、Langerら⁸⁾は、生分解性ポリマーであるポリグリコール酸(PGA)に単離軟骨細胞を播種し、免疫不全マウス背部皮下に移植することによって、軟骨の再生誘導に成功した。その後1993年にLangerおよびVacanti⁹⁾によって、細胞、足場、誘導因子などを用いて組織を再生させる組織工学(Tissue Engineering)という方法が提唱された。またMikosら¹⁰⁾は、細胞が育つ足場として塩溶出法により多孔質化した生体分解性ポリ乳酸スキャホールドを作製し、骨組織再生を行った。しかしながら、これらの組織工学的手法は、比較的小さな骨組織の再生にとどまっており、大きい骨欠損を治療するには十分ではない。

一方で、ケモカインの一種であるstromal cell-derived factor-1(SDF-1)が骨髄幹細胞や骨芽細胞の遊走を促進するという多くの報告がある^{11,12,13,14)}。例えばRatanavarapornら¹⁴⁾は、SDF-1と骨形成因子(BMP-2)をゼラチンハイドロゲルから徐放させることで細胞遊走の促進および骨誘導の活性化が起こり、その結果、骨再生が促進したと報告している。これらの既往の研究から、大きな骨欠損の修復には、骨形成に関与する細胞を周囲組織から欠損部に供給することが重要であると考えられ、本研究では、それを可能にする細胞誘引因子と

して SDF-1 に着目することとした。SDF-1 を担持した組織工学スキャホールドを用いることによって、スキャホールド内における骨形成速度が増大するとの仮説を立てた。

SDF-1 担持スキャホールドへの骨形成細胞の誘引にとって、以下の2つの点が重要であると考えられる。

一つは、スキャホールド内への細胞の浸潤にとって好適な環境を提供することである。スキャホールドを構成する成分がハイドロゲルのような分子ネットワークの場合、それが物理的な障壁となって細胞の浸潤を妨げるものと懸念される。そこで本研究では、細胞の侵入にとって十分なサイズの空孔をもつ生体分解性スキャホールドを用い、その内部表面に SDF-1 を担持することによって骨形成の促進を図ることとした。

二つ目の問題は、スキャホールド内における SDF-1 濃度をいかに維持するかという点である。スキャホールドと SDF-1 との間に何らかの相互作用が期待できない場合、担持された SDF-1 がスキャホールドから早期に溶出してしまい、骨再生が効率的に行われぬものと予想される。そこで本研究では、遺伝子組み換え技術を活用して、スキャホールド親和性ペプチド (KLKLLKLLKLL; KL5) と SDF-1 とのキメラタンパク質を作製し、その親和性を利用することによって SDF-1 濃度を長期にわたって維持することを試みた。

以上のように、本研究では、組織工学による骨組織再生において、骨の再生速度を増大させるための新手法の提案を目的とし、スキャホールド親和性 SDF-1 および多孔質性スキャホールドの骨形成促進に及ぼす効果について検証した。

2. 実験

2.1 SDF-1-KL5 の作製とキャラクタリゼーション

2.1.1 スキャホールド結合性 SDF-1-KL5 の合成

本研究で設計した SDF-1-KL5 キメラタンパク質の構造を図 1 に示す。以下に述べるように、大腸菌発現系を利用して SDF-1-KL5 を作製した。

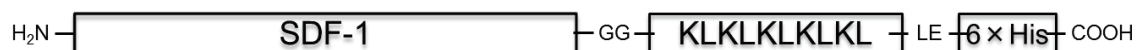
まず、ヒト胎盤 cDNA ライブラリー (タカラバイオ) より PCR 法によって SDF-1 をコードする DNA を増幅した。用いたプライマーは次の通りである。上流プライマー：agatatacatatgaagccccgtcagcctgagcta、下流プライマー：ggtgctcgagcagctttagcttgagcttcagcttgagctttccacccttggttaagctttctcca。ただし、下線 (実線) を付した配列は制限酵素切断配列 (上流：*Nde*I、下流：*Xho*I)、太字は高分子親和性ペプチド (KLK**LKLKLKL**) をコードする配列、二重下線はリンカー配列 (GG)、点下線は SDF-1 cDNA の 5'および 3'末端の配列である。得られた PCR 断片を T7 プロモーターをもつ pET22b プラスミド (Novagen) のマルチクローニングサイトに挿入し、pET22b-SDF-1-KL5 を得た。なお、挿入部位の下流には 6×His タグ配列および終始コドンが配置されており、本プラスミドの転写・翻訳によって、[SDF-1]-GG-KL**LKLKLKL**L-LE-HHHHHH の配列からなるキメラタンパク質が生成する。

次に、大腸菌 [BL21(DE3)pLysS 株] にプラスミド pET22-SDF-1-KL5 をヒートショック法で導入した後、大腸菌をアンピシリンを含む寒天培地上で培養した。colony pick PCR 法により pET22b-SDF-1-KL5 プラスミドを保有することの確認されたコロニーを増幅し、100 mL スケールで培養した。対数増殖期に isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (1 mM) を添加して、キメラタンパク質の発現を誘導した。培養終了後、大腸菌を凍結融解したのち、リゾチームおよびベンズナーゼ (DNA 分解酵素) によって菌体を処理し、最終的にインクルージョンボディを得た。これを 5 mM 2-mercaptoethanol を含む 8 M 尿素溶液中で変性・可溶化させた。その後、ニッケルキレートカラム (His Trap HP, GE Helthcare) を用いて精製を行った。得られた精製物透析することにより尿素の除去ならびにリフォールディングを行った。

タンパク質の分子サイズおよび純度はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリ

ルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE 法) により調べた。SDS-PAGE 法には 16.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、電圧 200 V、泳動時間 30 min の条件で泳動し、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色を行った。タンパク質の濃度は BCA 測定法 (Thermo Fisher 23252) により測定した。

(A)



(B)

```

1  KPVSL SYRCP CRFFE SHVAR ANVKH LKILN
30 TPNCA LQIVA RLKNN NRQVC IDPKL  KWIQE
60 YLEKA LNKGG KLKLK LKLKL  LEHHH  HHH

```

図 1. SDF-1-KL5 の構造. (A) SDF-1-KL5 分子中のポリペプチドの配置, (B) SDF-1-KL5 の一次構造.

2.1.2 円二色性分光分析 (CD 分析)

大腸菌で発現させた SDF1-KL5 の二次構造に関する情報を得るため、円二色性分光分散計 (J-805, 日本分光, 東京) を用いて発現タンパク質を分析した。測定は、タンパク質濃度 141 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、セル長 0.2 mm、スキャン波長 190~250 nm、バンド幅 0.1 nm、レスポンス 1 sec にて行った。

2.1.3 Boyden chamber 法による細胞走化性試験

ヒト不死化間葉系幹細胞 (UE6E7T-3 株, 理研細胞バンクより分譲) およびヒト骨芽細胞 (MG63 株, JCRB 細胞バンクより分譲) を Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) に 10%ウシ胎児血清 (FBS)、L-グルタミン (2 mM)、ペニシリン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した培地中、37°C、5%CO₂ の条件下で培養し、4~6 継代したものを以下の実験に用いた。

24 ウェル細胞培養用プレートへのタンパク質の非特異的な吸着を抑制するため、2% Pluronic F-127 (Sigma) を用いて各ウェルの表面を処理した。それらのウェルにセルカルチャーインサート (膜の孔径: 8 μm) を設置した。ヒト不死化間葉系幹細胞あるいはヒト骨芽細胞を 0.1% bovine serum albumin を含む DMEM に懸濁し、各ウェルに 2×10^3 個ずつカルチャーインサート内に播種し、種々の濃度の SDF-1 (0~100 ng/mL) を添加した培地 0.5 mL (DMEM, 2 mM L-グルタミン, 100 units/mL ペニシリン, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン, 0.1% bovine serum albumin) を加えた。24 時間培養した後、4%ホルムアルデヒドを用いて細胞を固定し、アクリルオレンジ染色を行った。インサート膜下面を蛍光顕微鏡 (IX73, オリンパス, 東京) を用いて観察し、膜下面に移動した細胞を計数した¹⁵⁾。

2.1.4 受容体の発現解析

ヒト間葉系幹細胞 (UE6E7T-3 株) およびヒト骨芽細胞 (MG63 株) における SDF-1 受容体 (CXCR4) の発現を調べるため、それらの細胞における CXCR4 mRNA の発現を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) により分析した。ヒト不死化間葉系幹細胞およびヒト骨芽細胞から SV Total RNA isolation system (Promega) を用いて total RNA を抽出・精製し、cDNA synthesise kit (Roche) を用いて逆転写反応を行い cDNA を得た。作成した cDNA を鋳型とし、CXCR4 に対するプライマー (上流プライマー: ggcagcaggttagcaaagtga, 下流プライマー: tgatgacaaagaggaggtcgg)¹⁶⁾ を用い、DNA 変性 (94°C, 30 sec)、アニーリング (64°C, 30 sec)、伸長反応 (72°C, 30 sec)、35 サイクルの条件で PCR 反応を行った。PCR にて増幅した DNA 断片を 2%アガロースゲル電気泳動により分離した後、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線下で写真撮影を行った。

2.2 SDF1-KL5 を複合化した多孔質性スキャホルドの作製

2.2.1 生体分解性多孔質スキャホルド

L-lactide- ϵ -caprolactone 共重合体スポンジ [P(LA/CL)スポンジ、株式会社ジェイ・エム・エスより供与] を用いた。スキャホルドは直径 5 mm、厚さ 0.5 mm の円盤状であり、気孔率 95.2%、ポアサイズ 300 μm 以上、表面積 186.78 mm^2 であった。

2.2.2 走査型顕微鏡(SEM)観察

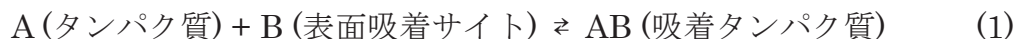
スキャホールドを SEM (VE-8800, KEYENCE) を用いて観察した。SEM 用試料ホルダーにカーボン製両面テープを張り付け、その上にスキャホールド断片を接着させた。その後、表面コーティングを行うことなく、加速電圧 1.7 kV の条件で反射電子像を撮影した。

2.2.3 表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析

SDF-1-KL5 の P(LA/CL)への結合性について表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて調べた。

P(LA/CL)を CH_3Cl に溶解し、0.4 %の溶液を得た。これを SPR 分析用センサーの表面に滴下し、4000 rpm、90 sec の条件でスピコーティングすることにより、P(LA/CL)の薄膜を形成させた。このセンサーを SPR 分析装置に設置し、反射光強度の測定を開始した。まず、表面にリン酸緩衝食塩水 (PBS) を 1 分間灌流し、次に、溶液を SDF-1-KL5 の PBS 溶液に変更して 10 分間測定した。その後、溶液を PBS に切りかえ測定を 9 分間続けた。SDF-1-KL5 に暴露する前後の反射光強度の変化から、同タンパク質の吸着に伴うプラズモン共鳴角のシフト量を求め、フレネルの式に基づいて吸着量を算出した²⁰⁾。(文献番号の変更が必要?) 同様の SPR 測定を種々の濃度の SDF-1-KL5 溶液を用いて行い、吸着等温線を作成した。

SDF-1-KL5 と P(LA/CA)との相互作用定数の算出は、Langmuir 型の吸着様式にもとづき行った。すなわち、タンパク質 A が表面吸着サイト B に吸着して複合体 AB が形成される平衡反応は次のよう表すことができる。



ただし、[A]、[B]および[AB]は平衡状態での各成分の濃度である。式(1)について解離定数 K_d は次式で表される。

$$K_d = [A][B] / [AB] \quad (2)$$

一方、質量作用の法則によって、

$$[B] + [AB] = [B]_0 \quad (3)$$

である。ただし、 $[B]_0$ は最大結合量（吸着サイトの総数）を意味する。式(2)に式(3)を代入することにより、以下の式を得る。

$$K_d = [A] ([B]_0 - [AB]) / [AB] \quad (4)$$

式(4)を整理すると、

$$1 / [AB] = (K_d / [B]_0) / [A] + 1 / [B]_0 \quad (5)$$

となる。ここで、 $[A]$ および $[B]$ は変数であるため、式(5)は、傾き $K_d / [B]_0$ 、 Y 切片 $1 / [B]_0$ の一次関数である。そこで、 $X = 1/[A]$ に対して $Y = 1/[AB]$ をプロットし（逆数プロット）、その傾きと Y 切片から解離定数 K_d を求めた。

2.2.4 SDF1-KL5/P(LA/CL) スキャホールド複合体の作製

円盤状のP(LA/CA)スキャホールド（直径5 mm、厚さ0.5 mm）に200 μ LのSDF-1-KL5溶液（0.5、1、あるいは10 μ g/mL）を滴下し、24時間静置することによってスキャホールド内部にSDF-1-KL5を吸着させ、SDF-1-KL5-P(LA/CA)スキャホールド複合体を得た。

スキャホールド内のSDF-1-KL5吸着量は、Micro BCA Protein Assay Kit（Thermo Scientific）を用いて測定した。ビスシンコニン酸-銅錯体を含む発色液200 μ L中にスキャホールドを37°Cで2時間浸漬し、錯体とタンパク質との結合にもとづく呈色反応を行った。反応液の562 nmにおける吸光度を測定し、既知の濃度のウシ血清アルブミン溶液を用いて作成した標準曲線をもとに、スキャホールド内のSDF1-KL5吸着量を求めた。

2.3 SDF1-KL5担持P(LA/CL) スキャホールドを用いた動物内骨再生試験

2.3.1 ラット頭蓋骨内埋入試験

実験動物は4週齢雄性Fischerラット（日本チャールス・リバー）を用いた。

動物実験は広島大学動物実験委員会の承認を得て行った。

ラットにジエチルエーテルによる浅麻酔後、ネンブタール深麻酔下にて、頭頂部の剃毛、および皮膚切開を行った。頭頂骨の骨膜を剥離した後、歯科用低速エンジンと直径 5 mm のトレフィンバーを用いて、滅菌生理的食塩水を注水しながら、頭頂骨正中矢状縫合部を境にして左右 2 か所に直径 5 mm の骨欠損部を作製した。この骨欠損部に SDF-1-KL5-P(LA/CL)スキャホールドを埋植した。比較のため、欠損部に何も埋植しないコントロール群、および、PBS 適用群についても実験を行った。その後、骨膜、皮膚の 2 層縫合により皮切部を閉鎖した。

2.3.2 マイクロ computed tomography (CT) 解析

SDF-1-KL5-P(LA/CL)スキャホールドの埋植直後、および 8、12、16、20、24、28 週後に動物実験用マイクロ CT (Skyscan 1176, Bruker, Kontich, Belgium) 撮影を行い、Digital Imaging and Communication in Medicine (DICOM) データに変換した。CT 画像の画像解像度は 512 × 512 pixel であり、スライス厚は 0.01 mm であった。次に、DICOM データに変換した二次元断層データをもとに、三次元再構築ソフトウェア (Zedview, LEXI) を用いて、骨部分のデータを分離・抽出し、骨部の三次元再構築を行った。この三次元モデルを STL (Standard Template Library) 形式で出力し、三次元データ処理ソフトウェア (Rapidform, INUS, Technologies) を用いて、骨欠損部を補完した三次元骨充填モデルを作成した。骨欠損部の補完には、元の三次元骨モデルの骨欠損部周縁の曲率を用いた。頭蓋骨外側と内側に既存骨と連続性をもつ仮想の曲面を作成し、元の三次元骨モデルと組み合わせることにより三次元骨充填モデルを作成した。その後、三次元モデリングソフトウェア (FreeForm, SensAble Technologies) を用いたブーリアン演算によって、三次元骨充填モデルから元の三次元骨モデルを差し引き、欠損部の三次元モデルを作成して、その体積を測定した。

2.3.3 組織学的観察

SDF-1-KL5-P(LA/CL)スキャホールドの埋植 28 週目に、ラットを 4% 中性ホルマリン溶液にて灌流固定した後、頭頂骨を摘出し、さらに浸漬固定を行った。

その後、組織片を 14%エチレンジアミン四酢酸で脱灰した後、凍結組織切片作製用包埋剤（ティシュー・テック、Optimal Cutting Temperature コンパウンド）に包埋し、前頭断で厚さ 30 μm の組織切片を作製した。組織切片をヘマトキシリン-エオジン（HE）染色した後、倒立型位相差光学顕微鏡（IX73, オリパス, 東京）により観察した。

3. 結果および考察

3.1 SDF-1-KL5 の作製および構造・機能分析

3.1.1 SDF-1-KL5 の設計および作製

SDF-1 を組織工学スキャホールド表面に担持させるため、生体分解性高分子に対して親和性を有するペプチドと SDF-1 との融合を試みた。

一般に合成高分子の表面は疎水性であり、また、水媒体中では塩化物イオン等の陰イオンの吸着によって表面電位は負の値をもつことが知られている¹⁷⁾。そこで、塩基性アミノ酸の一種であるリシン (K) および疎水性アミノ酸の一種であるロイシン (L) を交互に連結させたペプチド KLKLKLKLKL (KL5) がポリエステル系生体分解性高分子に対して親和性を有するものと予測した。

また、SDF-1 は細胞表面の受容体 CXCR4 との結合を介してシグナル伝達を行うことが知られているが、その結合には SDF-1 の N 末端領域が主に関与することが報告されている¹⁸⁾。そこで本研究では、SDF-1 と KL5 とのキメラタンパク質 SDF-1-KL5 において、SDF-1 としての機能への悪影響を避けるため、SDF-1 の C 末端に KL5 を連結することとした。

以上のような設計にもとづき、キメラタンパク質の作製を行った。大腸菌内で発現させ、精製した組み換えタンパク質を SDS-PAGE 法にて分析した結果、図 2 に示すように、発現タンパク質は単一バンドとして分離され、その泳動度は SDF-1-KL5 のアミノ酸配列から予測される分子量に一致した。

以上の結果から、目的通り SDF-1-KL5 が得られたものと考えられる。

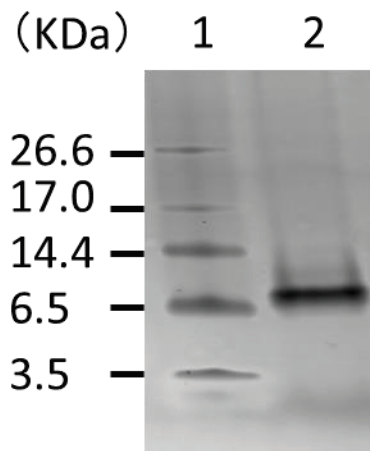


図 2. SDS-PAGE の結果. Lane 1 : 分子量マーカー, Lane 2 : 精製した組み換えタンパク質.

3.1.2 CD 分析

大腸菌内で発現させた SDF-1-KL5 の二次構造に関する情報を得るため、CD スペクトルを測定した。その結果、図 3 に示すように、200 nm 付近から 230 nm 付近にかけてブロードな負のコットン効果が観測された。

このスペクトル形状は、 α ヘリックス構造に由来する 208 nm 付近および 220 nm 付近の極小、および、 β シート構造に由来する 216 nm 付近の極小を含むものと考えられ¹⁹⁾、 α ヘリックスおよび β シートを共に含むタンパク質に典型的な形状である。さらに、図 3 のスペクトルは、天然型 SDF-1 について報告されているスペクトルとよく一致する²⁰⁾。

以上の結果から、本研究で作製した SDF-1-KL5 には、天然型 SDF-1 と類似の構造が含まれると同時に、その領域の構造は、KL5 ペプチド、His タグおよびその前後に挿入されたペプチドによって大きな影響は受けないことを示している。

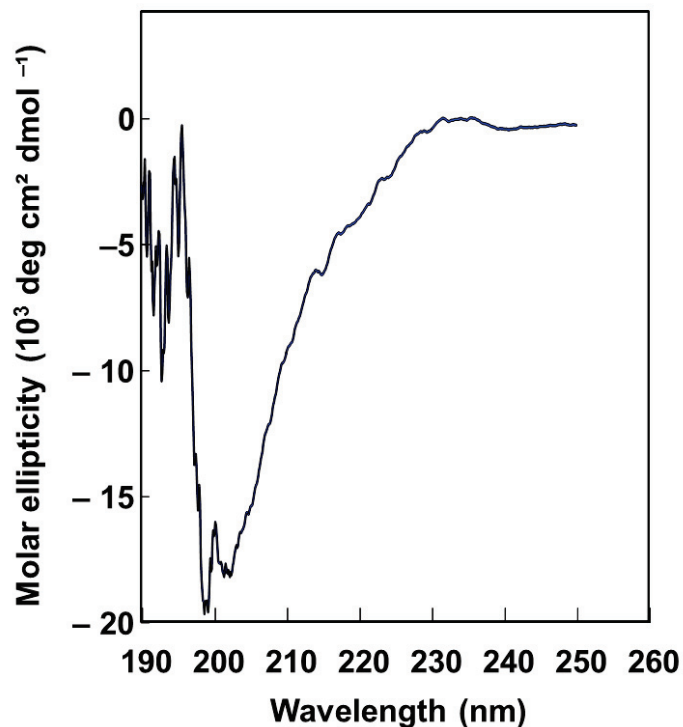


図 3. SDF-1-KL5 の CD スペクトル測定結果.

3.1.3 SDF-1-KL5 の機能評価

前節までに、本研究で作製した SDF-1-KL5 キメラタンパク質の一次構造および二次構造の観点から分析を行い、目的通りのタンパク質の得られたことがわかった。そこで次に、同キメラタンパク質の機能に関する評価を行った。

SDF-1 は、白血球の活性化や造血幹細胞の走化性を促す作用をもつことに加え、間葉系幹細胞および骨芽細胞の走化性因子としての機能も有することが知られている。そこで、本研究で作製した SDF-1-KL5 にも、天然型 SDF-1 と同様に、間葉系幹細胞および骨芽細胞の走化性を亢進させる作用があるかについて調べることにした。

SDF-1 は、細胞膜表面の受容体 CXCR4 との結合を介してシグナル伝達を行うことが知られている^{21,22}。そこでまず、走化性試験に用いる細胞（間葉系幹細胞 UE6E7T-3 株、骨芽細胞 MG63 株）における CXCR4 の発現について RT-PCR 法によって分析した。図 4 に示すように、CXCR4 mRNA の発現にもとづくバ

ンドが検出された。よって、間葉系幹細胞および骨芽細胞には CXCR4 が発現し、これらの細胞は SDF-1 に対する応答性をもつものと考えられる。

これらの細胞を用いて、SDF-1-KL5 の走化性亢進作用について調べた。その結果を図 5 に示す。図からわかるように、いずれの細胞においても、SDF-1-KL5 の培地への添加濃度が高くなるにつれて、セルカルチャーインサートの下面に移動した細胞数が増加した。この結果より、本研究で作製した SDF-1-KL5 が機能を有することが示された。

一方、KL5 および His タグの双方を欠く天然型 SDF-1 を用いて同様の実験を予備的に行った結果、図 5 に示す濃度領域の 1/10 程度の濃度範囲で間葉系幹細胞および骨芽細胞の走化性が亢進した。この結果は、KL5 ペプチドや His タグの存在が SDF-1-KL5 と受容体との結合に悪影響を与えていることや、SDF-1-KL5 のリフォールディングにもとづく 3 次元構造の形成が十分ではなかった可能性を示唆する。

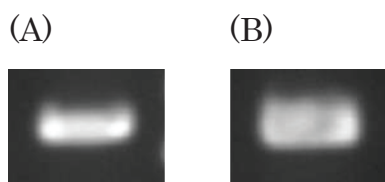


図 4. RT-PCR による CXCR4 の発現解析. (A) ヒト不死化間葉系幹細胞 (UE6E7T-3), (B) 骨芽細胞 (MG63).

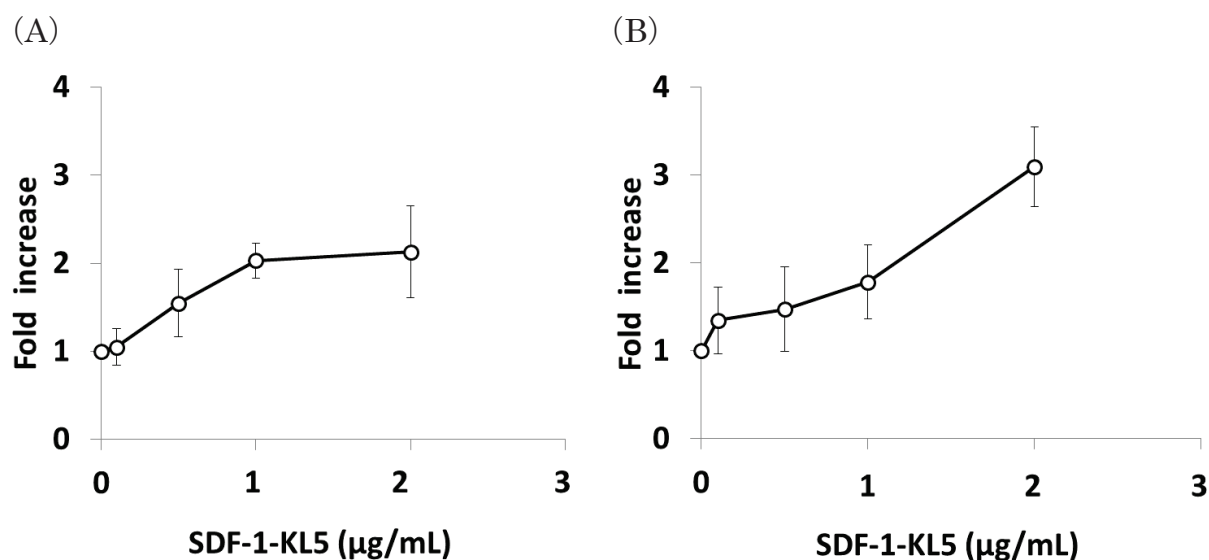


図 5. 細胞走化性試験の結果. (A) 間葉系幹細胞、(B) 骨芽細胞. SDF-1-KL5 を添加しなかった場合の移動細胞数を 1 として、種々の濃度の SDF-1-KL5 を添加した場合の移動細胞数を倍数で示す. 値は平均値 \pm 標準偏差 (n = 5).

3.2 SDF1-KL5-P(LA/CL) 複合化スキャホールドの作成

3.2.1 SDF1-KL5 の P(LA/CL)への吸着

SDF-1-KL5 の P(LA/CL)への結合性について SPR 法を用いて調べた。その結果を図 6 に示す。P(LA/CA)の表面に PBS を灌流し、反射光強度 (すなわち SPR 角度) が安定した後、灌流液を PBS から SDF-1-KL5 溶液に変更した結果、SPR 角度が急激に上昇し、およそ 5 分後にはそのシフト値が 190 mdeg 程度に達した。SDF-1-KL5 溶液を 10 分間灌流した後、再度、PBS を灌流した結果、SPR 角度は低下することなく高い値が維持された。このセンサーグラムから、SDF-1-KL5 が P(LA/CA)表面に吸着し、吸着した SDF-1-KL5 は PBS に暴露しても容易には溶出しないことがわかった。

Azzam ら²³⁾および Knoll²⁴⁾は、光の屈折に関するフレネルの式を用いて、SPR センサー表面にタンパク質が吸着した場合の SPR 角のシフト量を計算する方法を提案した。これを本研究における実験系に当てはめると、SPR 角のシフト量 1 mdeg あたり 1.1 ng/cm² のタンパクが吸着していると考えることができ、図 6 に示した SPR 角シフト量から SDF-1-KL5 の表面密度を算出すると 0.22 µg/cm²であった。

種々の濃度の SDF-1-KL5 溶液を用いて同様な吸着実験を行い、図 7A に示す吸着等温線を得た。さらに、この結果をもとに逆数プロットを行った (図 7B)。図 7B の近似直線および 2.2.3 で述べた式(5)より、解離定数 (K_d) の値を求めた結果、 $K_d = 9.8 \times 10^{-8}$ mol/L となった。この値は、タンパク質間相互作用の解離定数の範囲と比較して、その標準的な値の範囲にある。

以上のように、SDF-1-KL5 は P(LA/CA)表面に対して比較的高い親和性をもつことが示された。

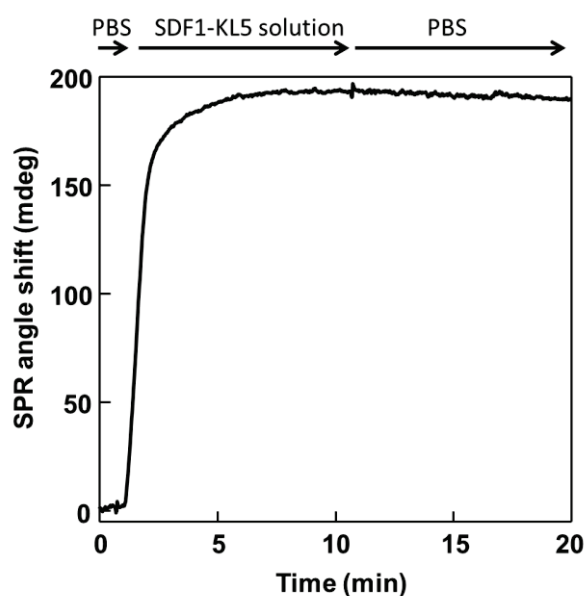
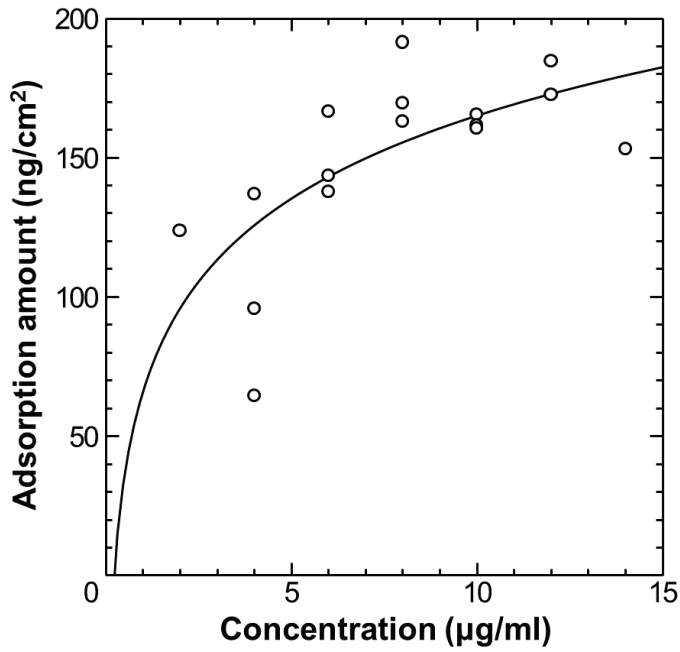


図 6. SDF-1-KL5 の P(LA/CA)表面への吸着に関する SPR センサーグラム.

(A)



(B)

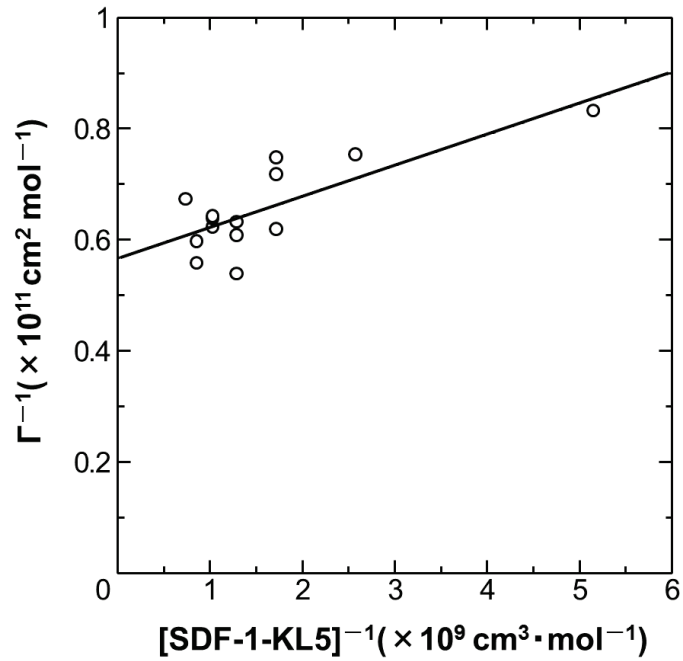


図 7. SDF-1-KL5 の P(LA/CA)表面への吸着. (A) 吸着等温線. 実線は近似曲線. (B) 吸着等温線をもとに作成した逆数プロット. Γ は吸着した SDF-1-KL5 の表面密度. 実線は近似直線.

3.2.2 P(LA/CL)スポンジへ SDF1-KL5 の担持

本研究で用いた P(LA/CL)スポンジの写真を図 8A に、SEM 画像を図 9B に示す。ソルトリーチング法で作成された P(LA/CA)スポンジは多孔質であり、その孔径は 300 μm 以上であるとの供給元データと一致した。

この P(LA/CA)スポンジに、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の SDF-1-KL5 溶液を用いて SDF-1-KL5-P(LA/CL)複合体を作成した。SDF-1-KL5 の担持量を Micro BCA 法によって調べた結果、直径 5 mm、厚さ 0.5 mm の円盤状の P(LA/CL)スポンジあたり 0.3 μg であり、表面密度は 0.16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。

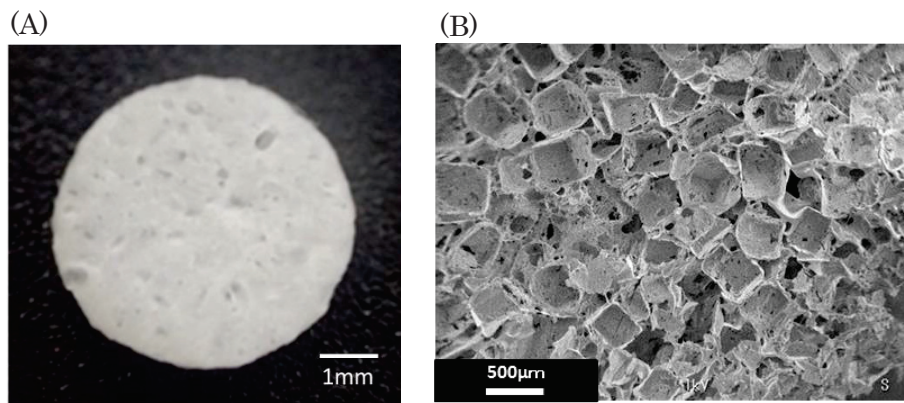


図 8. P(LA/CL) スポンジ. (A) 外観の写真, (B) SEM 像.

3.3 SDF-1-KL5 担持 P(LA/CL)スキャホールドによる骨再生誘導に関する動物実験

種々の濃度 (0, 0.5, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の SDF-1-KL5 溶液を用いて SDF-1-KL5 担持 P(LA/CL)スキャホールドを作製し、ラット頭蓋骨内に埋植した。その直後、および 8~28 週後に頭蓋部のマイクロ CT 像を撮像した。その結果を図 9 に示す。

埋植直後 (0 週) では、どの群においても、欠損部周囲の輪郭が明確な円形であったが、埋植後 8 週から 28 週では、輪郭および形状の乱れが観察された。これは骨欠損部周囲から骨の再生によるものと思われる。一方、骨欠損部の中心部では、CT 画像から判断する限り、骨の形成はほとんど認められなかった。

これらの画像を元に、骨欠損部の体積を求め図 10 に示す。まず、スキャホールドを埋植せず、PBS だけを滴下したコントロール群では、時間とともに骨欠損部の体積が増大していた。これは、ラットの成長に伴って頭蓋骨が大きくなることにもとづくものである。このような頭蓋骨の成長に伴う欠損部の拡大は、スポンジを埋植したいずれの群においても認められた。しかしながら、図からわかるように、SDF-1-KL5 を担持した P(LA/CA)スポンジを埋植した頭蓋骨では、成長に伴う骨欠損部の拡大が 8~28 週において抑えられていた。とくに 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の SDF-1-KL5 溶液を用いて P(LA/CA)スポンジとの複合化を行ったものでは、SDF-1-KL5 を担持しなかったスポンジを埋植した場合と比較して、8~28 週のいずれの週においても有意に小さい値を示した。また、スポンジのみを埋植した場合には、コントロール群と同じように骨の形成は求められなかった。以上のことから、SDF-1-KL5 の担持によって、P(LA/CA)スポンジ内での骨形成が促進されたことが示された。

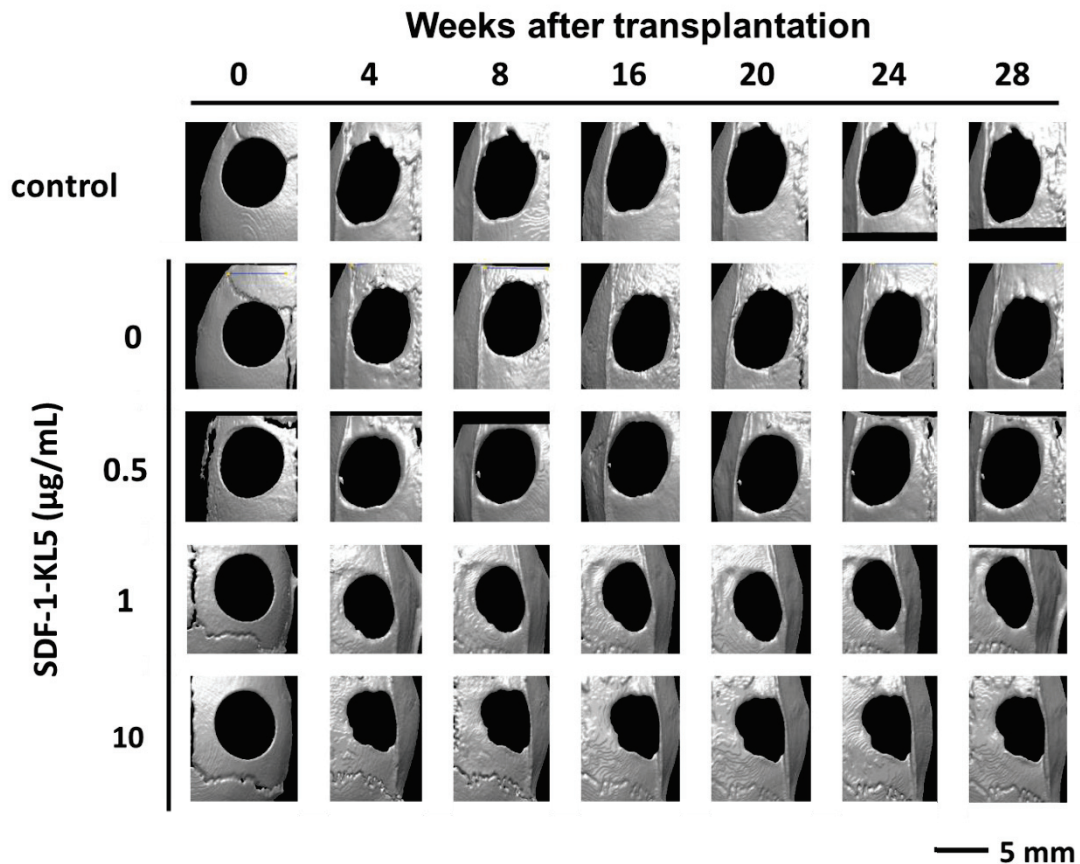


図 9. 骨欠損部のマイクロ CT 画像.

CT 画像の解析の結果、有意に骨形成誘導効果があると判断された実験群、すなわち、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の SDF-1-KL5 溶液を用いて P(LA/CA) スポンジとの複合化を行った群について、移植後 28 週目の埋植部位の脱灰標本を作製した。その HE 染色像を、コントロール群の結果とともに図 11 に示す。コントロール群では、骨様組織は観察されず、本来の骨面の外側に相当する部位に結合組織のみが認められた。一方、SDF1-KL5 担持スキャホールドを埋植した群では、骨基質に類似した構造が、既存骨から連続して形成されているのが観察された。28 週目のマイクロ CT 画像に示したように (図 9)、この実験群においても骨欠損中央部では未だ石灰化はみられない。しかし、組織像からわかるように (図 11)、骨欠損中央部においても骨様組織の形成が進行していることを示している。以上の結果より、SDF-1-KL5 担持 P(LA/CA) スキャホールドは、主に骨欠損部周縁からの骨再生を促すことがわかった。埋植されたスキャホールドの表面には骨膜が存在するが、骨膜からの骨芽細胞の浸潤にもとづく骨再生は起こり難いことを示し、主に欠損部骨端からの細胞浸潤によって骨再生が進行するものと考えられる。その場合、欠損部骨端に存在すると思われる間葉系幹細胞が重要な働きを担うものと推測される。

これまで、間葉系幹細胞を用いた骨再生に関する研究が盛んに行われてきたが^{25,26,27}、間葉系幹細胞は骨を形成する細胞へ分化するのみならず、細胞機能調節因子の供給源となり²⁸、また、炎症の制御に関与するなど、多面的な効果のあることが報告されている²⁹。これらのことから、本研究でみられた骨再生誘導は、スキャホールド内に浸潤した間葉系幹細胞による複合的な効果にもとづくものと考えられる。

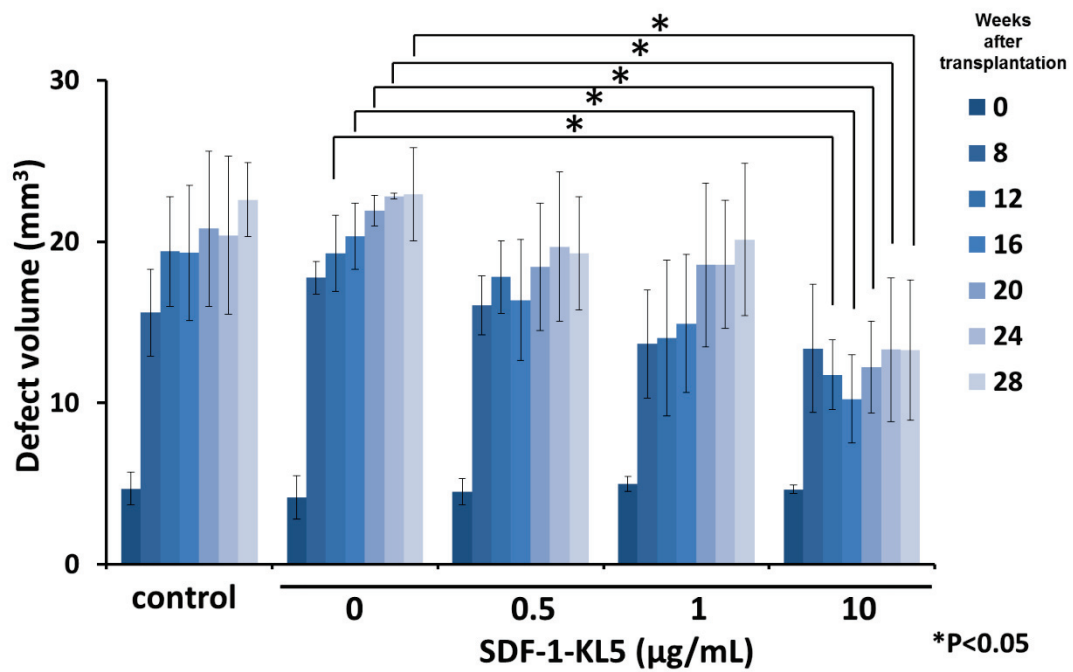


図10. マイクロCT画像から求めたラット頭蓋骨欠損部の体積. 値は平均値 ± 標準偏差 (n = 3). 統計学的検定は Student's t-test により行った (p < 0.05).

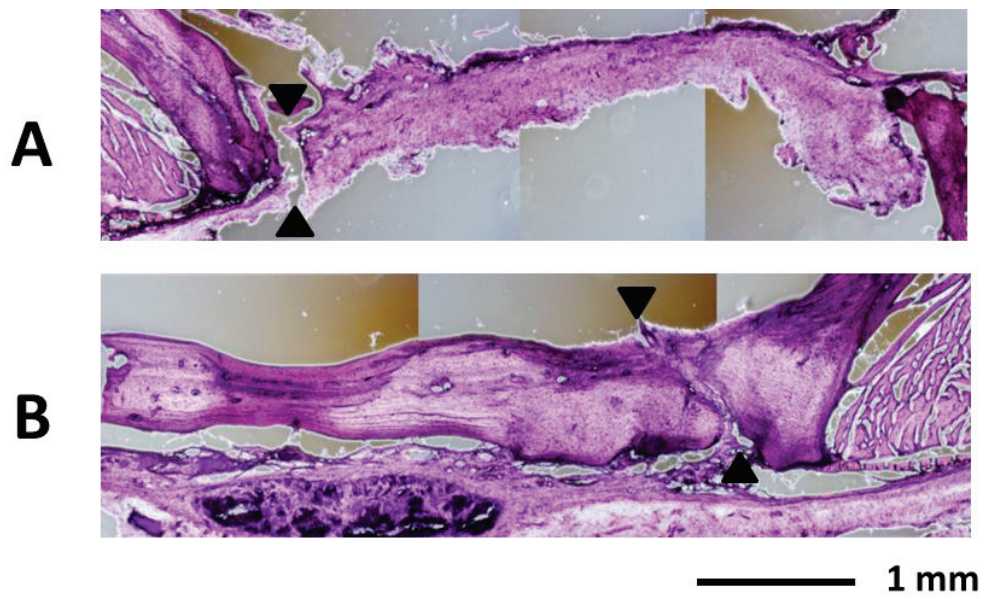


図 11. 術後 28 週目の骨欠損部の組織切片像. 脱灰標本の HE 染色像を示す. (A) 骨欠損部にスキャホールドを埋植せず、PBS を滴下したコントロール群, (B) SDF-1-KL5 担持 P(LA/CA)スキャホールド埋植群 (作製時の SDF-1-KL5 の濃度は $10 \mu\text{g}/\text{mL}$). ▼印は、既存骨と埋植部位との境界.

4. 結論

口唇口蓋裂の治療法として、組織工学による骨組織の再生治療に期待が寄せられているが、そのような治療では骨組織の形成速度を速めることが臨床的な観点から重要である。そこで本研究では、骨形成能をもつ内在性細胞を生体分解性スキャホールドへ誘引し、それによって骨組織の再生を促進する方法の確立を目的として研究を行った。

骨形成能をもつ細胞として骨芽細胞および間葉系幹細胞を想定し、それらの誘引に効果のあると考えられる SDF-1 に着目した。一方、生体分解性スキャホールドには、細胞浸潤の起こりやすい高分子多孔質体を選択した。このキャホールドの内部に SDF-1 を担持し、その局所濃度を高く維持することによって、内在性の骨形成細胞がスキャホールド内へ誘引し、スキャホールド内部における骨再生速度を向上させることを試みた。

その結果、以下の知見を得た。

1) 生体分解性高分子の一種である P(LA/CA)の表面に親和性があると予想されるペプチド KL5 を SDF-1 の C 末端に融合したキメラタンパク質 SDF-1-KL5 を大腸菌発現系を用いて作製することができた。このキメラタンパク質は設計通りの構造を有し、骨芽細胞および間葉系幹細胞の走化性を促進する機能を備えていた。

2) SDF-1-KL5 は P(LA/CL)表面に親和性があり、その解離定数は $K_d = 9.8 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ であった。この性質を利用することによって、P(LA/CL)多孔質体内に SDF-1-KL5 を担持させることが可能であった。担持された SDF-1-KL5 の表面密度は $0.16 \mu\text{g/cm}^2$ ($0.61 \mu\text{g/g sponge}$) であった。

3) SDF-1-KL5 を担持した P(LA/CL) スキャホールドをラット頭蓋骨欠損部に埋植した結果、術後 8~28 週において、欠損部周囲からの骨再生が認められ、その再生速度は SDF-1-KL5 の担持量に依存して増大した。骨膜と接触する部位での骨再生がほとんど認められなかったことから、骨再生には骨芽細胞の誘引ではなく、既存骨辺縁部からの間葉系幹細胞の誘引が重要な鍵を握っていると推測された。

以上の知見をもとに、骨組織の再生速度の向上には、細胞誘引作用のある SDF-1 を生体分解性高分子からなる多孔質体に担持する方法が有効であると結

論した。

5. 参考文献

1. Boyne PJ, Sands NR. Secondary bone grafting of residual alveolar and palatal clefts. *J. Oral Surg* 30:87-92 (1972)
2. 飯野光喜, 寺地省子, 松井桂子, 玉木祐介, 高橋哲, 山口泰, 越後成志, 手島貞一. 顎裂部に対する自家腸骨海面骨細片移植術-X線CTによる骨架橋の評価. *J Jpn Cleft Palatal Association* 19: 22-31 (1994)
3. Dietmar W. Hutmacher. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21:2529-2543 (2000)
4. Zeller SD, Hiatt WR, Moore DL, Fain DW. Use of preformed hydroxyapatite blocks for grafting in genioplasty procedures. *Int J Oral Maxillofac Surg* 15:665-668 (1986)
5. Zaman CT, Takeuchi A, Matsuya S, Zaman QHMS, Ishikawa K. Fabrication of B-type carbonate apatite blocks by the phosphorization of free-molding gypsum-calcite composite. *Dent Mater J* 27:710-715 (2008)
6. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *New Eng J Med* 344:385-386 (2001)
7. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry-Part I: Stem cell sources. *J Prosthodont Res* 56:229-248 (2012)
8. Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatric Surg* 23:3-9 (1988)

9. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 260:920-926 (1993)
10. Mikos A, Thorsen A, Czerwonka L, Bao Y, Winslow N, Vacanti J, Langer R. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams for cell transplantation. *Polymer* 35:1068-1077 (1994)
11. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382:635-638 (1998)
12. Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercurio A, Melzi R, Giordano T, Belmonte N, Ferrari G, Leone BE, Bertuzzi F, Zerbini G, Allavena P, Bonifacio E, Piemonti L. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 106:419-427 (2005)
13. Wang J, Loberg R, Taichman RS. The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25:573-587 (2006)
14. Ratanavaraporn J, Furuya H, Kohara H, Tabata Y. Synergistic effects of the dual release of stromal cell-derived factor-1 and bone morphogenetic protein-2 from hydrogels on bone regeneration. *Biomaterials* 32:2797-2811 (2011)
15. Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, Tsutsumi R, Yoshitomi H, Oishi S, Nakano M, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum* 60:813-823 (2009)
16. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis

to bone. *Cancer Res* 62:1832-1837 (2002)

17. Otsuka H. Surface organization of poly(ethylene glycol) (PEG)-based block copolymers for biomedical applications. In *Electrical Phenomena at Interfaces and Biointerfaces: Fundamentals and Applications in Nano-, Bio-, and Environmental Sciences*. Ohshima H. ed. 2012. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, pp. 810-814
18. Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Baggiolini M, Sykes BD, Clark-Lewis I. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 16:6996-7007 (1997)
19. Townend R, Kumosinski TF, Timasheff SN, Fasman GD, Davidson B. The circular dichroism of the β structure of poly-l-lysine. *Biochem Biophys Res Commun* 23:163-169 (1966)
20. Holmes WD, Consler TG, Dallas WS, Rocque WP, Willard DH. Solution studies of recombinant human stromal-cell-derived factor-1. *Protein Expr Purif* 21:367-377 (2001)
21. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382:829-33 (1996)
22. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382:833-835 (1996)
23. Azzam RMA, Bashara NM. Reflection and transmission of polarized light by stratified planar structures. In *Ellipsometry and Polarized Light 4th Ed.* 1977,

North-Holland Publishing, Amsterdam, pp. 269-359

24. Knoll W. Polymer thin films and interfaces characterized with evanescent light . *Makromol Chem* 192:2827-2856 (1991)
25. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Khoshzaban A, Keshel SH, Atashi R. Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108:e1-6 (2009)
26. Kawaguchi H, Hayashi H, Mizuno N, Fujita T, Hasegawa N, Shiba H, Nakamura S, Hino T, Yoshino H, Kurihara H, Tanaka H, Kimura A, Tsuji K, Kato Y. Cell transplantation for periodontal diseases. A novel periodontal tissue regenerative therapy using bone marrow mesenchymal stem cells. *Clinical Calcium* 15:99-104 (2005)
27. Baba S, Inoue T, Tanaka N, Hiwa C, Adachi T, Hojo M, Morikuni H, Nishiura A, Matsumoto N, Kawazoe T. In-vitro assessment of fabric structural composite scaffold applicable to tissue regeneration around implants. *J Osaka Dent Univ* 42:107-112 (2008)
28. Meyerrose T, Olson S, Pontow S, Kalomoiris S, Jung Y, Annett G, Bauer G, Nolte JA. Mesenchymal stem cells for the sustained in vivo delivery of bioactive factors. *Adv Drug Deliv Rev* 62:1167-1174 (2010)
29. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 5: 54-63 (2009).

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻ならびにご支援を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門（歯科矯正学）谷本幸太郎 教授、ならびに同研究院基礎生命科学部門（生体材料学）加藤 功一教授に謹んで感謝の意を表します。また本論文作成にあたり、ご助言、ご高閲を賜りました、同研究院応用生命科学部門（歯周病態学）栗原 英見 教授、同研究院統合健康科学部門（公衆口腔保健学）杉山 勝 教授、同研究院基礎生命科学部門（硬組織代謝生物学）吉子 裕二 教授に深謝申し上げます。

本研究の計画、遂行において貴重な御助言を頂くとともに、直接ご指導を賜りました同研究院基礎生命科学部門（生体材料学）平田 伊佐雄 助教、ならびに同研究院総合健康科学部門（口腔生物工学）木原 琢也 特任助教に心より感謝いたします。また、本研究の遂行に御理解、ご協力を頂きました基礎生命科学部門（生体材料）、応用生命科学部門（歯科矯正学）の皆様方と関係各位に厚く御礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えるとともに、常に私を支えてくれた母 小夜子に心から感謝いたします。

2016 年

広島大学大学院医歯薬保健学研究院

応用生命科学部門

歯科矯正学

伊達 智美