



## スキャフォールドなしの骨再生研究 —ウシのセレンディピティ

大阪歯科大学 歯科理工学講座  
講 師 秋山 真理 (大45)

### はじめに

筆者は2002年4月～2003年2月までマサチューセッツ大学医学部Center for Tissue Engineeringに留学して以来、骨膜由来細胞を用いた骨再生の研究を行ってきました。当初、Tissue Engineeringの定義では、組織再生には「幹細胞」、「スキャフォールド（足場となる材料）」、「移植による血流」の3本柱が必須と言われていました<sup>1)</sup>。これは2017年に実写映画化もされた「鋼の錬金術師」（ISBNコード4757506201他）の世界観に例えるなら、「幹細胞」が「原材料」、「スキャフォールド」が「錬成陣」、「移植による血流」が「術者自身のエネルギー」になります（図1.）。筆者はアメリカ滞在中に偶然、スキャフォールドなしで骨再生を行う方法を思いついたので「錬成陣なしで生体錬成を行っている国家錬金術歯科医師」と名乗ることにしました（マンガを読んだ人とアニメか映画を見た人にしか理解できない会話）。

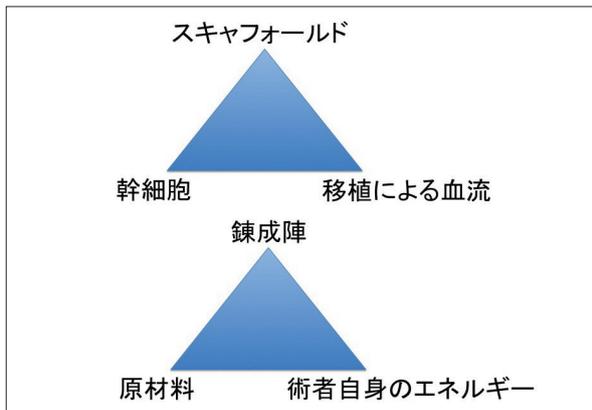


図1. Tissue Engineering の定義と錬金術の比較

### 骨膜由来細胞とは？

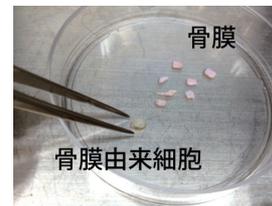


図2. 骨膜由来細胞  
骨膜由来細胞はかき集めただけで1つの塊になる。

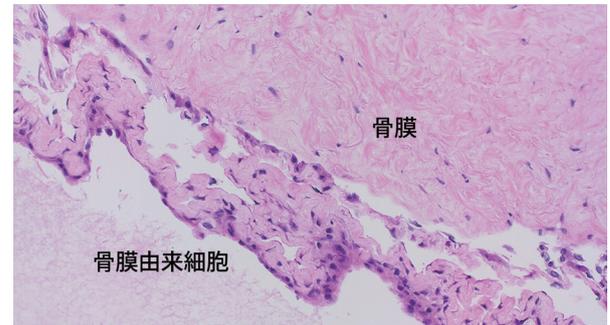


図3. 骨膜由来細胞の組織像（ヘマトキシリンエオジン染色）

図2. に骨膜由来細胞の写真、図3. に同じ細胞の顕微鏡像を示します。この細胞の特徴は、とにかく丈夫で手がかからないこと。培養液は週に一度しか交換しなくても、死細胞はほとんど見あたりません（普通の培養細胞は2、3日に1度培養液を交換する必要がある）。さらに高価な成長因子を添加せずに、アスコルビン酸（ビタミンC）添加のみで、培養シャーレ上で3次元構造を形成すること。アメリカ留学中にこの細胞と初めて出会って以来、アスファルトの隙間から咲くペンペン草のような、ダイハードで、野生の証明な細胞だと思ってきました。筆者の留学先のラボは突然閉鎖したのでヤケになって、培養液を交換せずに2、3週間放置したのち、細胞とスキャフォール

ドを混ぜようとしたら、細胞同士が強固にくっついて混ざらなかったことから、なんとなく（あるいは仕方なく）スキヤフォールドフリーでヌードマウスへの皮下移植をやってみたら、その結果、偶然骨ができました<sup>2, 3)</sup>。移植前の骨膜由来細胞は真っ白に見えました。細胞同士が重なって分厚い膜を作るからです。

## タンパク質の足跡を追いかけて

骨膜由来細胞の塊をヌードマウスの皮下に移植すると、骨が再生することはすでにCell Transplantation (2006年、2009年)に印刷公表済みですが<sup>2, 3)</sup>、答えだけが分かっている、『なぜそのような答えが導き出されるのか?』この疑問に答えることができませんでした。そこで、骨膜由来細胞がスキヤフォールドフリーで骨再生を行うために必要不可欠なタンパク質の発見とそのタンパク質の役割を検討するために、数年前から質量分析法を導入しています。質量分析法とは、正体の分からないタンパク質を酵素によってペプチドのレベルまで分解し(図4.)、イオン化して飛ばすことで飛行時間を測定すると、軽いペプチドは速く飛行し、重いペプチドはゆっくり飛行することからペプチドの質量を決定するという方法です。われわれ現代科学者の遠い祖先である錬金術師たちは、物質を分解し、理解し、再構築することで錬成を行います。現代の質量分析法では、タンパク質を分解し、質量を分析し、測定した結果をマトリックスサイエンス社 (<http://www.matrixscience.com/>) のデータベースで検索することで、マッチしたタンパク質の再構築をネット上で行います(図5.)。質量分析法で一度に複数のタンパク質を調査する手法をプロテオームあるいはプロテオミクスと呼んでいます。



図4. ペプチド



図5. タンパク質の再構築

【と、ここまでは教科書的な知識ですが、プロテオームに携わる多くの研究者が実際には教科書どおりにはいかずに悩むこととなります(まるで数年前の筆者のように)。散々時間と科研費を使ったにもかかわらずタンパク質について何も分からずに、あわやお蔵入り寸前と思われた状態からどうやって解決済み事件ファイル(論文)を作成したのか、2013年に神戸の学会で発表したときの勝負スライドを基に述べます。】

「セレンディピティ」という語句は、今でこそ、棚からぼた餅式に何もしなくても幸運が上から降ってきて偶然ノーベル賞級の発見をするような意味で使われていますが、語源となった昔話「セレンディップの3人の王子たち」ではむしろ観察力と推理力を駆使して、行方不明のラクダの特徴を言い当てています。王子様たちはラクダ本体を一度も見たことがないのですが、ラクダの足跡だけを見て発見した、それがセレンディピティの本来の意味であり、ラクダは研究者にとってはセレンディピティを象徴する動物です(図6.)。プロテオームの研究で行き詰まったときに筆者は以下の通り推察しました(図7.)。



図6. ラクダを追いかける三毛猫の王子様



図7. 様々なタンパク質のカケラ  
ほぼ同じ図が論文投稿の際に査読者に怒られて削除された。

- ア) 質量分析法によって得られた結果は断片的なものであり、タンパク質の切れ端のようなものを測定しているだろう。
- イ) 様々なタンパク質の断片的な寄せ集めの情報をコンピューターで検索しても、コンピューターは融通が効かないので、「こんなタンパク質はこの世に存在していない。」と答えるだろう。
- ウ) 質量分析の対象としたのは、培養液の中に含まれるタンパク質であったため、細胞から離れた場所を測定していたが（培養液中にはタンパク質の切れ端が含まれ）、タンパク質本体は細胞の近くに存在するだろう。

そこで、調べる場所を変え、タンパク質本体が存在すると考えられた場所を、抗体を用いて探索したところ、予想どおり細胞付近に見つかりました<sup>4)</sup>。その後は同様の手口で次々とタンパク質を見つけることが出来ました<sup>5, 6)</sup>。筆者の所属する日本医用マススペクトル学会でも「血液などのサンプルは、ゴミがぶかぶか浮いている生活排水と同じ。いろいろな生活の痕跡が流れてくる。」と言っていた研究者もいました。同様に、細胞を培養した後の培養液の中には、そこにタンパク質本体がなかったとしても、タンパク質のカケラや代謝物の一部、以前タンパク質が存在していた証拠などが含まれます。ウシのタンパク質の足跡を追跡してタンパク質の同定を行った時のケースが、本来の意味でのセレンディピティを最も発揮した瞬間でした。この解決済み事件ファイルも *Analytical Bioanalytical Chemistry* (2014年) において(無

事) 印刷公表されました<sup>4)</sup>。今後は骨をガンガンに再生させてくれるタンパク質を明らかにし、インプラントしたくても骨量の不足している患者さんや歯周病で骨欠損を生じた患者さんの治療に役立つ研究をしたいと思います。

## おわりに

当時好きだった現代版ホームズの英国ドラマ「シャーロック」では、ホームズはモリアーティ教授の情報をいつもインターネットで検索している(はず)、という設定でした。プロテオームの研究は想像以上に時間のかかる研究で、研究テーマのお蔵入りが迫りつつあるなか、インターネットでタンパク質の検索をしていた時には、約1週間、朝から晩までパソコンの画面を見続けました。執念でタンパク質の検索を続けながら思っていたのは、「このガセネタも含めた雑多な情報の波の中に、真実への手掛かりが隠れているはずだ。」ということでした。今まで追い続けた骨膜由来細胞が筆者にとってのモリアーティ教授だったのかもしれない。

## 謝辞

ウシ骨膜を提供していただきました神戸中央畜産荷受株式会社様に心より感謝申し上げます。また、ごく一部のペプチドから正確にアミノ酸配列を検出することのできた北海道システム・サイエンス株式会社様の技術力に対して心より敬意を表します。

## 参考文献

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993. 260: 920-6.
2. Akiyama M, Nonomura H, Kamil SH, Ignatz RA. Periosteal Cell Pellet Culture System: A New Technique for Bone Engineering. *Cell Transplant* 2006. 15: 521-532.
3. Akiyama M and Nakamura M. Bone regeneration and neovascularization processes in a pellet culture system for periosteal cells. *Cell Transplant* 2009. 18: 443-452.
4. Akiyama M. Identification of UACA, EXOSC9, and TMX2 in bovine periosteal cells by mass spectrometry and immunohistochemistry. *Anal Bioanal Chem* 2014. 406: 5805-5813.
5. Akiyama M. Association of  $\beta$ -tubulin, F-box/leucine-rich repeat protein 14, and Type 1 procollagen C-peptide in bovine periosteal cells. *Curr Tissue Eng* 2014. 3: 2-6.
6. Akiyama M. Characterization of the F-box proteins FBXW2 and FBXL14 in the initiation of bone regeneration in transplants given to nude mice. *Curr Tissue Eng* DOI: 10.2174/2211542005666161018130010(オープンアクセスジャーナル)