

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09442

研究課題名(和文) 線維芽細胞増殖因子誘引フィブロインを用いて作製する移植用細胞シートの開発

研究課題名(英文) Development of cell sheet for autologous implantation using FGF2-inducing silk fibroin sponge

研究代表者

中川 晃一 (Nakagawa, Koichi)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：30400823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) 誘引フィブロインを利用し、より層の厚い移植用ヒト間葉系幹細胞シートを作製することを目的とした。FGF2 誘引フィブロイン上では胞増殖の促進が認められ、対照群と比較して厚い細胞層が形成された。軟骨分化誘導後には、Alcian blue免疫染色で対照群とほぼ同等の染色性を示した。軟骨分化の指標として行ったS100蛋白およびSox9の免疫染色では、陽性細胞数はFGF2 融合フィブロインでやや低下する傾向にあった。FGF2 誘引フィブロインは細胞増殖を促進し、厚い細胞シートを作製することには有効であったが、細胞シート軟骨分化はやや抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

広範囲の軟骨欠損に対する再生治療は非常に困難である。今回研究に用いた絹フィブロインスポンジ上に自家細胞シートを作製し、欠損部を被覆する治療法が確立できれば、従来適応のなかった中高年者の広範囲欠損に対する軟骨再生医療も可能となる。本研究では、FGF2誘引フィブロインをヒト骨髄由来間葉系幹細胞シート形成に応用した。FGF2の持つ細胞増殖効果により厚い細胞シートを作製することで、十分な移植細胞数が確保でき、フィブロイン被覆法を広範囲の軟骨欠損に応用できるようになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine the effect of FGF2-inducing silk fibroin sponge on the formation of cell sheet for autologous implantation. Growth of mesenchymal stem cells was shown to be enhanced on FGF2-inducing silk fibroin sponge compared to wild-type fibroin sponge. After chondrogenesis induction, the staining of the cell layer with alcian blue was similar to the one in the control group. However, the number of positive cells with Sox9 immunostaining slightly decreased. The results of this study suggest possible usefulness of FGF2-incucing silk fibroin sponge to form thicker mesenchymal stem cell sheet.

研究分野：整形外科

キーワード：軟骨再生 フィブロイン 線維芽細胞増殖因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は自己再生能力に乏しい組織であり、大きな軟骨損傷に対する治療は非常に困難である。自家培養軟骨細胞移植術が開発され、軟骨欠損部をより生理的に修復することが可能となったが、移植に用いる軟骨細胞は同じ関節内の正常軟骨(非荷重部)より採取するため、移植可能な細胞数には限界がある。この移植細胞数の問題を解消するために、滑膜由来間葉系細胞を軟骨再生に利用する試みがなされ(Ando W et al., Biomaterials 2007)、近年臨床応用が進んでいる。滑膜細胞を浮遊液として軟骨欠損部に投与する方法(Sekiya I et al., Clin Orthop Relat Res 2015)や、滑膜細胞から細胞シートを作製して軟骨欠損部に移植する方法(Shimomura K et al., Tissue Eng Pt A 2014)が報告されている。これらの適応はまだ比較的小さい軟骨欠損に限られており、広範囲軟骨欠損への適応拡大が今後の課題と考えられている。

我々は、繭糸由来のフィブロインスポンジが軟骨細胞の細胞凝集体形成能と細胞移動能(cell delivery 機能)を有する(Kachi ND, et al., Biomed Mater Eng 2010)ことを利用して、広範囲欠損にも対応可能な軟骨修復法であるフィブロイン被覆法を開発した(Hirakata E et al., J Biomed Mater Res Pt B 2016)。これは、培養軟骨細胞を播種したフィブロインスポンジで軟骨欠損部を被覆し、フィブロインから遊走した細胞により軟骨再生を行う方法である。フィブロインは神経組織や骨組織などの再生に用いる生体材料としても注目されており(Melke J et al., Acta Biomater 2016)、骨髄や脂肪組織由来の幹細胞を播種して用いる報告が散見される(Wang Y et al., Biomaterials 2006)。

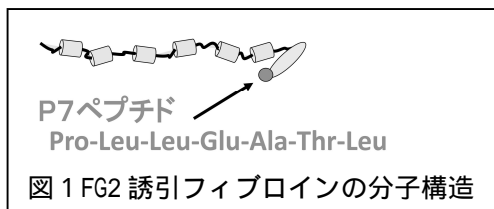
さらに我々は、フィブロインスポンジ上にヒト滑膜細胞を播種して作製した細胞シートから軟骨分化を誘導できることを報告し(中川ほか, 移植 2015)、自家細胞を用いたフィブロイン被覆法開発の可能性を示した。ただし、この細胞シートは動物由来の細胞を用いた場合と比べて層が薄く、ヒト細胞ではフィブロインスポンジ上で細胞層を厚くする工夫が必要と考えられた。

一方、骨髄や滑膜由来の間葉系幹細胞の増殖と軟骨分化を促進する因子として、線維芽細胞増殖因子2(Fibroblast growth factor2, 以下 FGF2)が報告され(Kim JH et al., Tissue Eng Pt A 2011)、軟骨欠損部への局所投与により軟骨修復を促すことも報告されている(Li X, et al., Osteoarthritis Cartilage 2013)。このことから、フィブロインスポンジ内での細胞増殖の促進には FGF2 が有用であると考えられた。

2. 研究の目的

近年、カイコの遺伝子組み換えにより FGF2 融合フィブロインが開発され、マウス線維芽細胞や軟骨細胞に対する生理活性を有することが証明された(Kambe Y et al., J Biomed Mater Res Pt A 2016)。カイコを用いた組み換え蛋白の産生は、エンドトキシンや病原体等の混入がない、組換えウイルスの残存がない、組換えタンパク質の抽出・精製が容易、生産規模の拡大が容易など、安全面、医療経済面での利点が多く、近年注目されている。しかし、FGF2 融合フィブロインの場合は、FGF2 の効果が短期間にとどまることから、周囲に存在する FGF2 を持続的に誘引する合成ペプチドを発現する遺伝子組み換えカイコが新たに開発された。この合成ペプチド(P7 ペプチド、図1)は FGF2 に特異的に結合することが知られている(Wu X et al., J Cell Mol Med, 2010)。研究分担者の玉田らは P7 導入カイコが産生するフィブロインが、FGF2 と高い親和性を有することを確認し、さらに培養液中の FGF2 を誘引することでフィブロインスポンジ上に播種したマウス皮膚線維芽細胞の増殖を促進することを明らかにした(加藤ほか, 第68回高分子学会, 2019)。この FGF2 誘引フィブロインは精製後そのまま生体材料として利用でき、生体内に移植後にも周囲に内因性 FGF2 を誘引する効果が期待される。また、FGF2 誘引フィブロインから作製したスポンジは Wild-type のものと同様の構造および強度特性を持つことが証明されている。

本研究では、FGF2 誘引フィブロインを用いて作製したヒト骨髄由来間葉系幹細胞シートを作製し、その細胞増殖促進効果について検討するとともに、作製した細胞シートの軟骨分化に対する効果を明らかにすることを目的とした。



3. 研究の方法

(1) フィブロインスポンジ上でのヒト骨髄由来間葉系幹細胞培養:

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株である UE6E7-16 を、異なる細胞密度 (0.5 million/disc, 1 million/disc) でフィブロインスポンジ (Wild-type または FGF2 誘引フィブロイン) 上に播種した。培養には cell culture dish を使用した (図2)。フィブロインスポンジ (disc 状) の大きさは径 8mm, 厚さ 3mm とし、孔径は平均 50 μ m と 100 μ m の 2 種類を用いた。12 時間静置後に、DMEM+0.5%FBS 培地にて 14 日間培養した。培養液内には、FGF2 の誘引効果を評価する目的で、hr-FGF2 を異なる濃度で添加 (0ng/ml, 3ng/ml, 30ng/ml) した。その後 12 時間無血清培地とした後、軟骨分化誘導培地 (1%ITS mix, 160 μ g/ml sodium pyruvate, 100 ng/ml dexamethasone, 0.2 mM Asc2-P, 10ng/ml TGF beta-3 添加した DMEM high glucose 培地) に変更し、さらに 14 日間の培養を行った。対照群としては、野生型 (Wild-type) カイコの絹糸より精製したフィブロインスポンジを用いた。



図2 フィブロインスポンジ上での細胞培養

(2) 細胞増殖の評価

培養開始後 2, 4, 7 日目で、WST-8 assay を行った。さらに培養開始後 14 日目の時点で、フィブロインスポンジ内の細胞層を中性ホルマリンにて固定後、HE、Alcian blue 染色を行い、細胞数と細胞層の厚さを計測した。

(3) 軟骨分化の評価 (2 週、4 週時):

得られた滑膜細胞層を中性ホルマリンにて固定後、HE、Alcian blue 染色と、抗 S100 蛋白抗体、抗 Sox9 抗体を用いた免疫染色により、軟骨分化を評価した。抗 Sox9 抗体について、細胞層 1 視野あたりの陽性細胞数を計測し、対照群と比較した。

4. 研究成果

(1) FGF2 誘引フィブロイン上での細胞増殖: WST-8 assay では、培養開始後 2, 4, 7 日目のいずれにおいても、培養液中に hr-FGF2 を添加することにより、細胞増殖能は促進された。培養開始後 4 日目において、対照群 (野生型フィブロイン群) では FGF2 の濃度依存性 (0ng/ml, 3ng/ml, 30ng/ml) に細胞増殖能が上がったのに対し、FGF2 誘引フィブロイン群では、3ng/ml と 30ng/ml の間で有意差は認められなかった (図3)。FGF2 無添加条件、3ng/ml 添加条件のいずれにおいても、FGF2 誘引フィブロイン群において、細胞増殖能の有意な促進が認められた (図3)。培養開始後 14 日目の細胞層の組織染色では、FGF2 無添加条件 (図4A)、3ng/ml 添加条件 (図4B) のいずれにおいても、FGF2 誘引フィブロイン群において、細胞数が多く、細胞層が厚くなる傾向を認めた。

(2) FGF2 誘引フィブロイン上でのヒト骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨分化:

Alcian blue 染色では、野生型フィブロイン群、FGF2 誘引フィブロイン群ともに、同等の細胞外基質染色性を認めた (図5A)。

抗 Sox9 抗体を用いた免疫染色では、野生型フィブロイン群において、陽性細胞がやや多い傾向を認め (図5A)、1 視野あたりの陽性細胞数計測でも同様の結果であった (表1)。

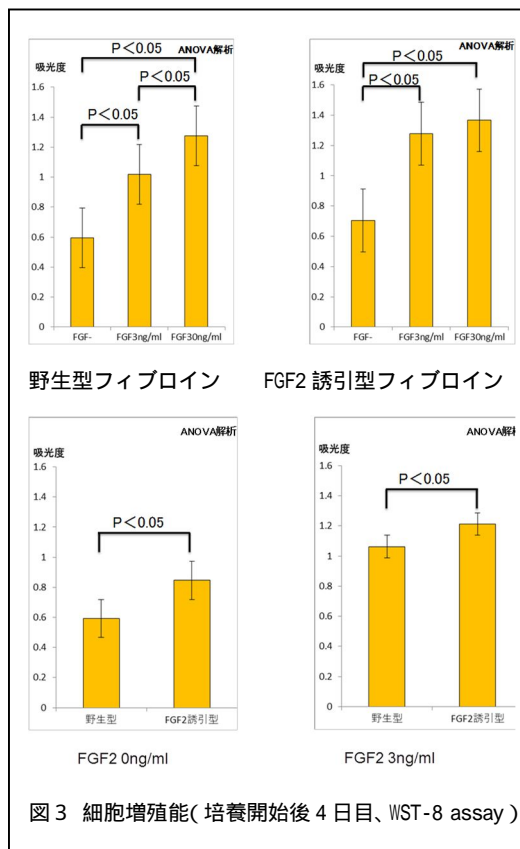


図3 細胞増殖能 (培養開始後 4 日目、WST-8 assay)

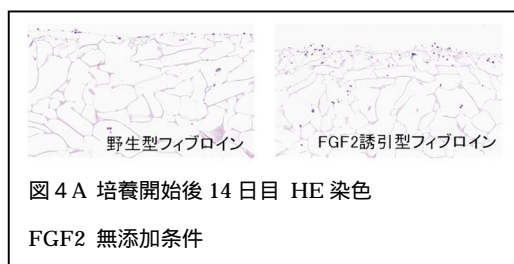


図4A 培養開始後 14 日目 HE 染色
FGF2 無添加条件

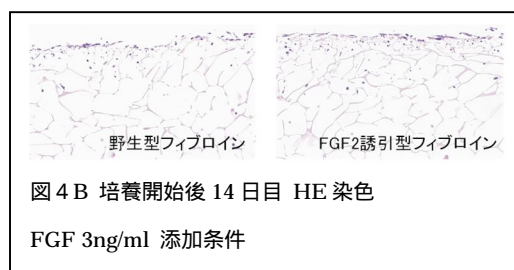


図4B 培養開始後 14 日目 HE 染色
FGF 3ng/ml 添加条件

(3) 結果のまとめと考察:

以上の結果より、FGF2 誘引フィブロイン上で培養した場合は、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の増殖が促進され、より厚い細胞層が形成されることが明らかとなった。軟骨分化誘導を行った結果では、プロテオグリカンの染色性は対照群とほぼ同等であったが、軟骨分化のマーカーである Sox9 の免疫染色では、FGF2 誘引フィブロイン群で陽性細胞の発現がやや減少する傾向を認めた。これは、主に FGF2 によって全体の細胞数が増加したことが要因と考えられるが、FGF2 により軟骨分化抑制が生じた可能性も否定できず、今後の課題と思われた。

現在行われている軟骨再生医療には課題点も多く、特に広範囲の軟骨欠損には対応できない。通常培養軟骨細胞(あるいは間葉系幹細胞)は動物由来コラーゲンや生体吸収性化合物などの足場材料に包埋された形で移植されるが、広範囲欠損ではこの足場材料を固定することが難しいためである。今回研究に用いた生体材料であるフィブロインは、足場材料として用いるのではなく、cell delivery 機能により被覆した部分の組織修復を促す目的で用いられ、従来の培養細胞移植では対応できない広範囲欠損への応用が期待されている (Hirakata E et al., J Biomed Mater Res Pt B 2016)。

本研究の結果から、FGF2 誘引フィブロインスポンジを利用することにより、より細胞層の厚い移植用細胞シートを作製できる可能性が高まると考えられた。本研究の成果を発展させることで、従来適応のなかった中高年者の広範囲欠損に対する軟骨再生医療も行い易くなり、骨切り手術と併用することで、変形性関節症を伴う広範囲軟骨欠損にも応用できる可能性がある。FGF2 が軟骨分化に及ぼす影響など、さらなる検討が必要ではあるが、FGF2 誘引フィブロインスポンジを利用した細胞移植術は、新しい関節軟骨修復法として有用と考えられる。

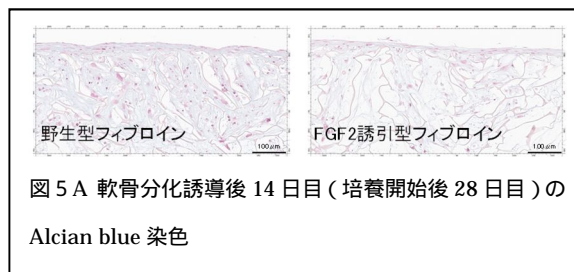


図 5 A 軟骨分化誘導後 14 日目 (培養開始後 28 日目) の Alcian blue 染色

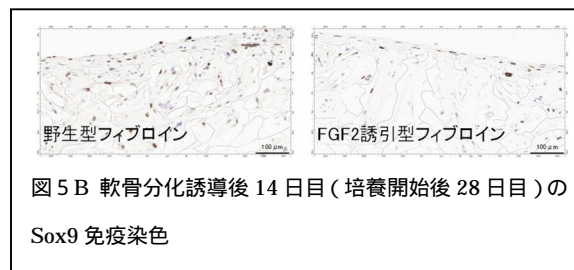


図 5 B 軟骨分化誘導後 14 日目 (培養開始後 28 日目) の Sox9 免疫染色

				平均発現率
野生型	64/124	81/170	74/142	50.2%
FGF2誘引型	30/84	35/95	39/97	37.7%

表 1 軟骨分化誘導後 14 日目 (培養開始後 28 日目) の Sox9 陽性細胞の発現率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima A, Terayama K, Sonobe M, Akatsu Y, Saito J, Norimoto M, Taniguchi S, Kubota A, Aoki Y, Nakagawa K.	4. 巻 19;13(11)
2. 論文標題 Serum Reactive Oxygen Metabolites as a Predictor of Clinical Disease Activity Index, Simplified Disease Activity Index, and Boolean Remissions in Rheumatoid Arthritis Patients Treated With Biologic Agents.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 e19759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.19759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aoki Y, Takahashi H, Nakajima A, Inoue M, Kubota G, Nakajima T, Sato Y, Saito J, Nakagawa K, Ohtori S	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Influence of Spondylolysis on Clinical Presentations in Patients With Lumbar Degenerative Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 e12570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.12570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi H, Aoki Y, Saito J, Nakajima A, Sonobe M, Akatsu Y, Taniguchi S, Yamada M, Koyama K, Akiyama Y, Shiga Y, Inage K, Orita S, Eguchi Y, Maki S, Furuya T, Akazawa T, Koda M, Yamazaki M, Ohtori S, Nakagawa K	4. 巻 24
2. 論文標題 Time Course of Changes in Serum Oxidative Stress Markers to Predict Outcomes for Surgical Treatment of Lumbar Degenerative Disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oxid Med Cell Longev	6. 最初と最後の頁 5649767
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/5649767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田 学, 櫻井香代, 中島 新, 園部正人, 赤津頼一, 齊藤淳哉, 乗本将輝, 小山慶太, 山本景一郎, 玉田 靖, 中川晃一.
2. 発表標題 FGF2誘引型絹フィブロインによるヒト間葉系幹細胞の増殖効果
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 学, 中島 新, 園部正人, 赤津頼一, 齊藤淳哉, 乗本将輝, 小山慶太, 山本景一郎, 山川奈々子, 梅田 涼, 松下容子, 玉田 靖, 中川晃一
2. 発表標題 絹フィブロイン上でのヒト間葉系幹細胞の増殖に対する線維芽細胞増殖因子2の効果
3. 学会等名 第39回日本運動器移植・再生医学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田 学, 中島 新, 園部正人, 赤津頼一, 齊藤淳哉, 乗本将輝, 小山慶太, 山本景一郎, 山川奈々子, 梅田 涼, 松下容子, 玉田 靖, 中川晃一
2. 発表標題 絹フィブロイン上でのヒト間葉系幹細胞の増殖に対する線維芽細胞増殖因子2の効果
3. 学会等名 第48回日本関節病学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	赤津 頼一 (Akatsu Yorikazu) (20795190)	東邦大学・医学部・講師 (32661)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	玉田 靖 (Tamada Yasushi) (70370666)	信州大学・学術研究院繊維学系・教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関