

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10982

研究課題名(和文)高齢者脊椎固定術において確実な骨癒合を実現する機能性間葉系幹細胞シートの創生

研究課題名(英文)Development of functional multilayered mesenchymal stem cells sheet for lumbar fusion surgery

研究代表者

井上 玄(Inoue, Gen)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：80594209

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文): 超高齢社会を迎えた我が国において、高齢者の脊椎固定術が確実に増加している。間葉系幹細胞分離技術と細胞積層技術、成長因子アンカーリング技術を用いて機能性間葉系幹細胞(MSCs)シートを作製した。マウス後側方固定術(PLF)モデルに移植し、骨癒合促進能を検討した。積層細胞では単層培養細胞に比べ有意にBMP2, TGFβ, VEGFの発現が高かった。特にBMP2発現は単層細胞に比べ60倍高かった。コラーゲン結合型bFGF(CB-bFGF)およびBMP-2を結合、吸着させた積層細胞シートは高い骨形成能を有していた。CB-bFGF/BMP-2/hMSCs複合体は脊椎固定術における骨癒合に有用かもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢社会を迎えた我が国において、高齢者の脊椎固定術が確実に増加している。また、高齢者は若年者に比べ骨癒合が遅延することが知られている。治療の長期化に伴う患者の社会復帰の遅延や、続発する合併症は、患者に肉体的・精神的苦痛を与えたとともに医療費の増加と社会経済的損失に直結する。従って、本シーズは国民の健康寿命の延長に向けて重要な意義を持つ。

研究成果の概要(英文): Cell-based regenerative therapy has the potential to promote bone formation in spinal fusion. Here, we developed a multilayered cell-based bone formation system using cells coated with fibronectin-gelatin (FN-G) nanofilms. The multilayered human mesenchymal stem cells (hMSCs) were formed after two days of culture and were shown to express higher levels of BMP-2, TGFβ, bFGF and VEGF compared to monolayer cultures of hMSCs. The MLMCs were used as a graft material in combination with a collagen-binding bFGF and BMP-2. In grafted with the hMSCs, significantly higher levels of callus volume and bone mineral content were observed compared to the sham controls. The callus volume and bone mineral content were further increased in situ grafted with bFGF-PKD-CBD/BMP-2/hMSCs. Taken together, these results suggest that bFGF-PKD-CBD/BMP-2/hMSC may offer novel therapeutic approaches to augment spinal fusion.

研究分野：整形外科

キーワード：細胞シート 積層 脊椎固定術 骨癒合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国において、高齢者の脊椎固定術が確実に増加している。また、高齢者は若年者に比べ骨癒合が遅延することが知られている。治療の長期化に伴う患者の社会復帰の遅延や、続発する合併症は、患者に肉体的・精神的苦痛を与えるとともに医療費の増加と社会経済的損失に直結する。従って、確実な骨癒合を達成する技術革新は国民の健康寿命の延長に向けて解決すべき重要課題である。申請者等は塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) と細菌性コラーゲナーゼの基質結合ドメインの融合タンパク質 (コラーゲン結合型 bFGF, CB-bFGF) と高密度コラーゲン材料を組み合わせることで骨膜間葉系幹細胞による骨形成を促進できることを示してきた。また、マウスおよびヒトの骨髄から培養を経ずに間葉系幹細胞を高純度に分離、新規細胞積層技術を開発し、高密度コラーゲンに細胞を埋入し、結合組織層を作製することに成功してきた。これらでシーズを融合し、間葉系幹細胞 (MSC)/コラーゲンシート (CS)/コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子 (CB-bFGF) 複合体を作製することにより高齢者の骨癒合促進が可能であると考えた。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞分離技術と細胞積層技術、成長因子アンカーリング技術を駆使して機能性間葉系幹細胞シートを作製し、その有用性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 間葉系幹細胞積層コラーゲンシートの作製と栄養因子産生能検討

ヒト間葉系幹細胞を分離後、3 継代行った細胞を実験に用いた。フローサイトメトリーを用いて 3 継代行った細胞の表現型を解析した。その結果、98%以上は CD45-CD90+陽性であった。コラーゲン膜に 200 万個のヒト骨髄間葉系細胞を播種し積層を行った。単層培養を行ったものをコントロールとして用いた。積層細胞から産生される栄養因子を検討するために BMP2, BFGF, TGFB, VEGF mRNA の発現をリアルタイム PCR を用いて検討した。

(2) bFGF 結合間葉系幹細胞積層コラーゲンシートの作製

間葉系幹細胞を積層後、0.58 nmole CB-bFGF 溶液に 30 分浸漬した。浸漬後、マウス後側方固定術 (PLF) モデルに移植した。

(3) BMP-2 吸着間葉系幹細胞積層コラーゲンシートの作製

上記細胞積層シートを作製後、BMP2 溶液に 30 分間浸漬した。浸漬後、BMP 吸着細胞積層シートに移植した。また、細胞シートおよび 10 μ g BMP-2 含有コラーゲンゲルを投与した群、細胞シートのみを移植した群を作製した。PLF モデルを作製したのみの群をコントロールとして用いた。

(4) コラーゲン結合型 BMP-2 様ペプチドの作製と併用効果の検討

機能性間葉系幹細胞シートの機能向上には BMP とコラーゲンの親和性を向上させる必要があった。BMP2-like peptide (knuckle peptide) とコラーゲン結合ドメインの融合タンパク (knuckle-CBD) を作製し、検討を行った。ヒト間葉系幹細胞を分離後、3 継代行った細胞を実験に用いた。200 万個のヒト骨髄間葉系細胞をコラーゲンシートに播種し積層を行った。積層後 1 mg knuckle-CBD をコラーゲンシートに吸着後移植した群を作製した。PLF モデルを作製したのみの群をコントロールとして用いた。また、骨髄間葉系幹細胞を用いて knuckle-CBD の BMP 活性を検討した。骨髄間葉系幹細胞を knuckle-CBD 刺激後、アルカリフォスファターゼ (ALP)、Dlx5, osterix の mRNA 発現を検討した。BMP2 で刺激した群をポジティブコントロールとした。

4. 研究成果

(1) 間葉系幹細胞積層コラーゲンシートの栄養因子産生能検討

2 日間培養後、ヒト骨髄間葉系幹細胞の積層が認められた。また、積層細胞では単層培養細胞に比べ有意に BMP2, TGFB, VEGF の発現が高かった (図 1)。特に BMP2 の発現は単層細胞に比べ 60 倍高かった。このことから、間葉系幹細胞積層コラーゲンシートの移植により移植部位局所での骨形成、血管新生を促進できる可能性が示唆された。

(2) bFGF 結合間葉系幹細胞積層コラーゲンシートの作製

積層細胞シート単体および bFGF 吸着積層細胞シートをマウス PLF モデルに移植した結果、積層細胞シート単体および bFGF 吸着積層細胞シートはいずれもコントロール群に比して有意に骨形成を促進した。しかし bFGF 結合積層細胞シートは細胞積層シート単体比して高い骨形成促進作用を有していた。しかし、骨癒合に有意な差は認められなかった。

(3) BMP-2 吸着間葉系幹細胞積層コラーゲンシートの作製

10 μ g BMP-2 をコラーゲンシートに吸着後移植した群、細胞シートおよび 10 μ g BMP-2 含有人工コラーゲンゲルを投与した群では椎体間の骨癒合が認められたが、細胞シートおよび 10 μ g BMP-2 含有コラーゲンゲルを投与した群で最も高い新生骨量、骨塩量が認められた。BMP-2 吸着間葉

系幹細胞積層コラーゲンシートは椎体間骨癒合に有用であることが示唆された。

(4) コラーゲン結合型 BMP-2 様ペプチドの作製と併用効果の検討

knuckle-CBD による椎体間の骨癒合は認められなかった。In vitro において BMP2 刺激群では ALP, Dlx5 の発現が上昇したが、knuckle-CBD 刺激群では上昇が認められなかった (図 2)。このことから knuckle-CBD は十分な BMP2 活性を有していないことが明らかになった。精製法を含め、更なる検討が必要であると考えられた。

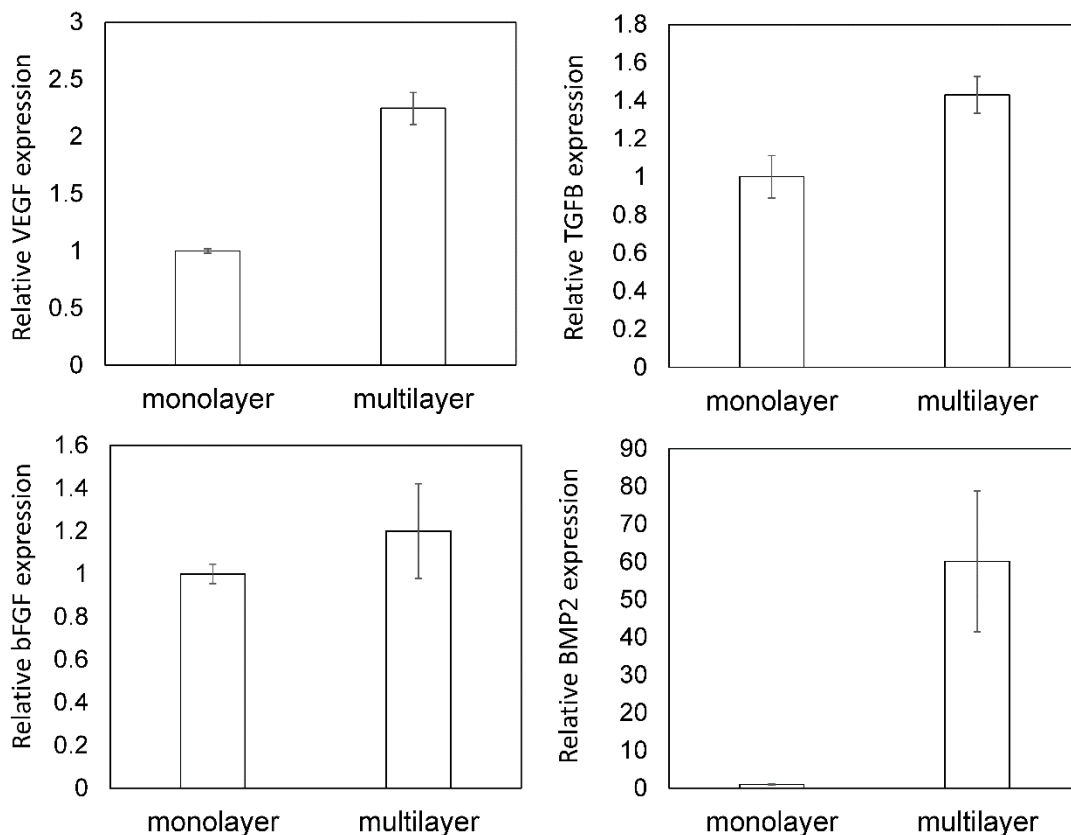


図 1. 単層 (monolayer) および積層 (multilayer) 間葉系幹細胞における栄養因子の発現

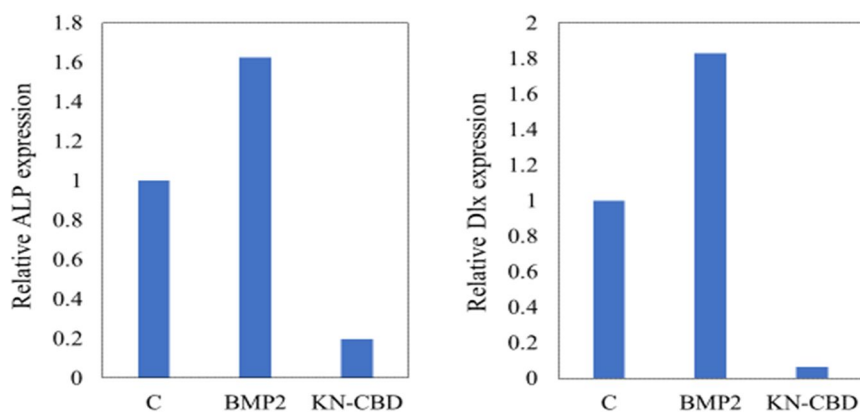


図 2. knuckle-CBD (KN-CBD) の BMP-2 活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyagi M, Fujimaki H, Naruse K, Suto K, Inoue G, Nakazawa T, Imura T, Saito W, Uchida K, Shirasawa E, Takahira N, Takaso M	4. 巻 24
2. 論文標題 The impact of switching once-weekly teriparatide to denosumab in osteoporosis patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Sci	6. 最初と最後の頁 153-158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jos.2018.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagura N, Kenmoku T, Uchida K, Nakawaki M, Inoue G, Takaso M	4. 巻 28
2. 論文標題 Nerve growth factor continuously elevates in a rat rotator cuff tear model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Shoulder Elbow Surg	6. 最初と最後の頁 143-148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jse.2018.06.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inoue G, Imura T, Miyagi M, Saito W, Tazawa R, Nakazawa T, Takaso M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Total en bloc spondylectomy of the eleventh thoracic vertebra following denosumab therapy for the treatment of a giant cell tumor.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 4005-4010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2017.6655	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 Uchida K, Inoue G, Matsushita O, Horikawa K, Sekiguchi H, Saito W, Takano S, Fujimaki H, Miyagi M, Takaso M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Basic Fibroblast Growth Factor-Anchored Multilayered Mesenchymal Cell Sheets Accelerate Periosteal Bone Formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomed Res Int	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2017/4371460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inoue G, Uchida K, Matsushita O, Fujimaki H, Saito W, Miyagi M, Sekiguchi H, Nishi N, Ohtori S, Yogoro M, Takaso M.	4. 巻 42
2. 論文標題 Effect of Freeze-Dried Allograft Bone With Human Basic Fibroblast Growth Factor Containing a Collagen-Binding Domain From Clostridium histolyticum Collagenase on Bone Formation After Lumbar Posterolateral Fusion Surgery in Rats.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Spine (Phila Pa 1976)	6. 最初と最後の頁 995-1001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000002074	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 庄司真太郎、内田健太郎、関口裕之、井上 玄、齋藤 亘、宮城正行、村田幸佑、川久保 歩、高相昌士
2. 発表標題 塩基性線維芽細胞増殖因子と局所硬化デキストランゲルを用いた新規骨形成促進法の有用性
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関口裕之、内田健太郎、井上玄、宮城正行、相川淳、高野昇太郎、名倉直重、中脇充章、庄司真太郎、大貫裕子、高相昌士
2. 発表標題 難治性骨折に対する新規コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子/人工コラーゲン複合体の有用性の検討
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤巻寿子、井上玄、内田健太郎、根本典子、宮城正行、大鳥精司、高相昌士
2. 発表標題 コラーゲン結合型塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた末梢神経再生の試み
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017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	内田 健太郎 (UCHIDA KENTARO) (50547578)	北里大学・医学部・講師 (32607)	
研究分担者	馬淵 洋 (MABUCHI YO) (50424172)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	
研究分担者	宮城 正行 (MIYAGI MASAYUKI) (90627556)	北里大学・医学部・講師 (32607)	
研究分担者	松下 治 (MATSUSHITA OSAMU) (00209537)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	