

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16163

研究課題名(和文)ゼラチンハイドロゲルスポンジを用いた骨細胞誘導法の確立と関節リウマチ治療への応用

研究課題名(英文)The novel method of osteocyte differentiation from human mesenchymal stem cells using gelatin sponge and its application to the treatment of rheumatoid

研究代表者

宮川 一平 (Miyagawa, Ippei)

産業医科大学・大学病院・助教

研究者番号：10525463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroにおいてゼラチンハイドロゲルスポンジを足場とした三次元環境下でヒト間葉系幹細胞を28日間培養したところ、走査電子顕微鏡による形態学的な評価において、骨細胞に特徴的な突起の伸長を伴う細胞が分化誘導され、透過電子顕微鏡・質量分析において、リン酸カルシウムの沈着が確認された。さらにIL-1 刺激およびPPAR アンタゴニストの添加により骨細胞マーカーであるBSP、MEPE、SOST、PHEXの発現が亢進した。in vitroにおけるヒト間葉系幹細胞の三次元培養によりヒト骨細胞が分化誘導され、さらにIL-1 刺激とPPAR 阻害により効率化される可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近日、骨代謝における骨細胞の役割が注目されている。しかし、ヒト骨細胞は、生体内から単離することは困難で、さらに効率的な培養法が確立されていないため、骨細胞に関する研究はマウスを中心とした研究に留まり、ヒト骨細胞の役割に関して十分に検討されていない。本研究では、3次元環境下でヒト間葉系幹細胞を培養することでヒト骨細胞へ分化誘導されることを明らかにするとともにIL-1 刺激およびPPAR 阻害により効率化されることを明らかにした。本研究で確立された培養法を利用することで、骨粗鬆症や関節リウマチなど骨細胞が重要な役割を果たす多くの疾患の病態解明と新規治療法への展開を可能とする点で意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human mesenchymal stem cells were cultured for 28 days in vitro in a three-dimensional environment using a gelatin hydrogel sponge as a scaffold. Based on the morphological evaluation by scanning electron microscope, we found that the cells accompanied by elongation of protrusions characteristic of osteocytes were induced. Furthermore, calcium phosphate deposition was confirmed by transmission electron microscopy and mass spectrometry. In addition, IL-1 stimulation and addition of PPAR antagonists enhanced the expression of osteocyte markers, BSP, MEPE, SOST, and PHEX. Three-dimensional culture of human mesenchymal stem cells in vitro induces differentiation of human osteocyte, and it was effectively enhanced by the addition of IL-1 stimulation and inhibition of PPAR .

研究分野：リウマチ学

キーワード：ヒト骨細胞 ヒト間葉系幹細胞 関節リウマチ バイオマテリアル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は原因不明の炎症性疾患である。主たる病態は、リンパ球の自己応答性の獲得に引き続く関節滑膜の慢性炎症であり、最終的に関節破壊が引き起こされる。RA 破壊関節に骨芽細胞は存在しないが、炎症性サイトカイン(TNF, IL-6, IL-17 等)が、破骨細胞の成熟のみならず滑膜細胞や T 細胞上の RANKL 発現を誘導することで、骨芽細胞非存在下でも破骨細胞の成熟を促すことが可能となる。つまり、RA における関節破壊は、正常骨代謝回転から逸脱し、骨芽細胞非依存性に破骨細胞成熟が亢進した状態と考えられている。

近年、力学的負荷を担う細胞としての骨細胞(osteocyte)が、豊富な RANKL、OPG 産生を介して破骨細胞分化・活性化を制御することやスクレロスチン産生を介して骨芽細胞を負に制御し骨形成を抑制すること、抗スクレロスチン抗体が骨形成を促進させ骨密度を増加させることが報告され、骨代謝における“骨細胞”の役割に注目が集まっている。このような背景から、RA 関節における骨代謝異常は、炎症環境にさらされた異常な“骨細胞”を起点とし生じ新たな治療標的となる可能性を考えた。しかし、ヒト骨細胞(osteocyte)は、生体内から単離することは困難で、さらに効率的な培養法が確立されていないことから、骨細胞に関する研究はマウスを中心とした研究に留まり、ヒト骨細胞の役割に関して十分に検討されていない。間葉系幹細胞(MSC)は、自己複製能を有し、かつ、骨芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞に分化可能な組織恒常性維持を担う細胞集団である。我々の施設では、これまで MSC を用いた骨・軟骨組織の修復・再生医療・抗炎症作用の研究を行い、RA 破壊関節に対する関節修復ツールとしての可能性を報告してきた。一方、幹細胞分化への細胞外マトリックスの及ぼす影響に着目すると、幹細胞の運命は、張力・圧力・浸透圧などに大きく影響されることが報告されており、適した培養環境を設計することで幹細胞の運命を操作しうる可能性が示されている。このような背景から、ヒト骨細胞誘導のための新規培養基材としてのゼラチンハイドロゲルスポンジ(βTCP 含有)の利用を発想するに至った。このゼラチンハイドロゲルスポンジは、工学的・化学的に構造(サイズ・孔径・消失時間・硬度等)を容易に変化させることができ、ゼラチンを原料とするため培養に適した形状に形成することができる。そこで本研究では、このゼラチンハイドロゲルスポンジを用いた 3D 培養系においてより効率的なヒト骨細胞(osteocyte)分化誘導法を構築し、詳細なヒト骨細胞機能解析と RA 新規治療法開拓を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、ゼラチンハイドロゲルスポンジを用いた 3D 培養系においてヒト骨細胞の効率的な誘導法を確立し、ヒト骨細胞の詳細な機能解析を行うことで、RA 病態におけるその役割を明らかにし、新規治療ターゲットとしての可能性を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

LONZA 社から購入したヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSCs)(2.5×10^5 cells/mm)を $5 \times 5 \times 5$ mm の TCP 含有ゼラチンハイドロゲルスポンジに播種し 3D 環境下で OIM を用い 28 日間培養した。軟骨細胞および脂肪細胞分化、骨細胞(osteocyte)への分化を RT-PCR 法を用いマーカー遺伝子(軟骨細胞:SOX9, 脂肪細胞:PPAR, 骨芽細胞・骨細胞:ALPL, IBSP, BGLAP, MEPE, PHEX, SOST)の発現を評価することで判定した。またプレートを用いた 2D 培養時と比較した。さらに hMSCs の骨芽細胞分化を促進するための IL-1 添加条件下および hMSCs の脂肪細胞分化を抑制するための PPAR-antagonist 添加条件下においても同様に評価した。さらに走査電子顕微

鏡を用いヒト骨細胞に特徴的な突起の伸長の有無を評価し、透過電子顕微鏡および質量分析を用いヒト骨細胞様細胞周囲のリン酸カルシウム沈着の有無を評価した。

4. 研究成果

(1) 3D 環境下における骨細胞マーカー遺伝子の発現

表 1 に Human MSCs を 3D ないしは 2D 環境下での OIM を用いた 28 日間培養時の分化マーカー発現の変化を示す。脂肪細胞 (adipocyte) 分化マーカーである PPAR γ は恒常的に発現した。同様に軟骨細胞 (chondrocyte) 分化マーカーである SOX9 の発現は、2D 培養と 3D 培養間で差は認めなかった。その上で骨細胞分化マーカーの発現に関して評価したところ、3D 環境下における培養で骨芽細胞分化マーカーである ALPL、IBSP の発現が亢進することが示された。

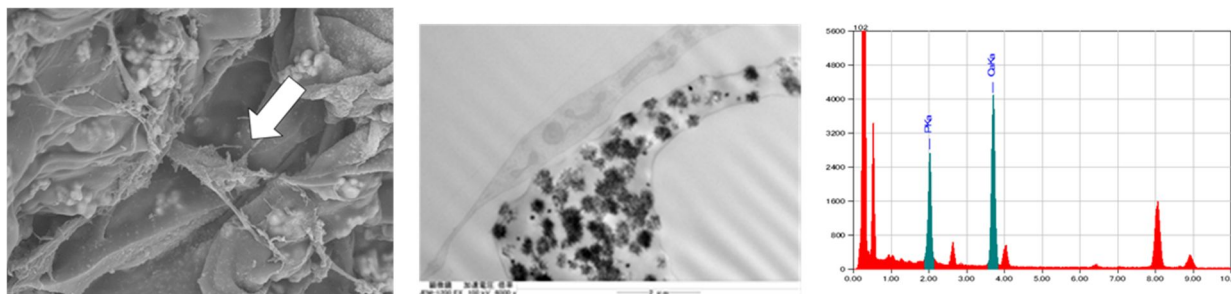
Gene	No stimulation		OIM+IL-1 β	OIM+PPAR γ antagonist
	2D	3D	3D	3D OIM
adipocyte	PPAR γ	Cont.	↑	↑
chondrocyte	SOX9	Cont.	→	↓
Markers of osteoblast	RUNX2	Cont.	↓	↓
	ALPL	Cont.	↑	↑
	IBSP	N.D.	↑	↑
	BGLAP	N.D.	N.D.	↑
Markers of osteocyte	MEPE	N.D.	N.D.	→
	PHEX	N.D.	N.D.	↑
	SOST	N.D.	N.D.	↑

表1 Cont: control, N.D.: not detectable

さらに IL-1 ないしは PPAR antagonist を添加したところ PPAR の発現に変化はなかったが、軟骨細胞分化マーカーである SOX9 の発現が抑制されることが示された。さらに骨芽細胞マーカーの発現は抑制され、より分化段階の進んだ骨細胞のマーカーである MEPE、PHEX、SOST の発現が亢進した。3D 培養環境下で hMSCs を培養することでヒト骨細胞分化が亢進し、IL-1 β ないしは PPAR antagonist を添加することで効率化される可能性が示された。

(2) 走査電子顕微鏡および透過電子顕微鏡・質量分析を用いた形態学的評価

(1)に示すように 3D 培養環境下で hMSCs を培養することでヒト骨細胞分化が亢進し、IL-1 β ないしは PPAR antagonist を添加することで効率化される可能性が示されたため、次に走査電子顕微鏡および透過電子顕微鏡・質量分析を用いた形態学的評価を行った。結果、左下図に示すように特徴的な突起の伸長を伴う骨細胞が観察され、透過電子顕微鏡(中下図)および質量分析(右下図)において骨細胞周囲のリン酸カルシウムの沈着が確認された。



左: 走査電子顕微鏡, 中: 透過電子顕微鏡 (黒色: リン酸カルシウム沈着), 右: 質量分析

以上、本研究の結果から、in vitro におけるヒト間葉系幹細胞の三次元培養によりヒト骨細胞が分化誘導され、さらに IL-1 β 刺激と PPAR γ 阻害により効率化されることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----