

令和 3 年 6 月 30 日現在

機関番号：84416

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16640

研究課題名(和文) 多能性幹細胞由来の細胞・マトリックス集合体による椎間板繊維輪再生

研究課題名(英文) In vivo annular repair using pluripotent stem cell-derived tissue-engineered construct

研究代表者

森口 悠 (Yu, Moriguchi)

独立行政法人国立病院機構(大阪南医療センター臨床研究部)・その他部局等・医師

研究者番号：00627797

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)：万能細胞として知られる胚性幹細胞(embryonic stem cells: ESCs)をもとに、段階的分化誘導により間葉系幹細胞まで誘導した後に、組織再生工学の技術を用いて細胞・マトリックス集合体(embryonic stem cell-derived tissue engineered construct: ES-TEC)を作成し、条件の最適化によって、この人工組織が高い軟骨分化能を有することを確認した。さらにげっ歯類尾椎モデルで線維輪損傷部に移植すると修復組織を生成し、髄核の脱出や軟骨終板の変性を予防し、椎間板高や可動域など椎間板の機能が維持されることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代人の8割が経験する腰痛および下肢痛の背景となる椎間板変性に対する修復・再生の試みは広くなされてきたがそのほとんどが髄核組織を対象としており、椎間板全体の変性カスケードの上流にある線維輪損傷・変性をターゲットにしたトランスレーショナルリサーチは乏しい。線維輪の生物学的修復として胚性幹細胞を段階的分化誘導と組織工学技術を用いた独自の手法は既存研究に類を見ず先進的と言える。安定した細胞供給のもと再現性が高く均一な品質の人工組織を作成可能であり、損傷部への移植により線維輪が修復され、さらに椎間板変性の予防が可能であり、腰痛や脊椎変性疾患への治療へと展開するため本研究成果の社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Novel artificial tissues named ES-TECs were successfully derived from embryonic stem cells using stepwise differentiation method and tissue engineering technique. In vivo rat experiments demonstrated that ES-TECs significantly facilitate annular repair, prevent further nucleus pulposus herniation as well as disc degeneration, and maintain disc functionality such as disc height and range of motion. In vitro chondrogenic differentiation capacity of ES-TECs corroborated its in vivo performance and suggested the potential of pluripotent stem cell-based annular repair and disc regeneration.

研究分野：再生医療

キーワード：椎間板再生 脊椎外科 軟骨再生 椎間板変性 組織工学 腰痛

1. 研究開始当初の背景

腰痛は現代人の生涯罹患率が8割を超え、脊椎疾患の病態の中心となる椎間板は加齢とともに変性し、初期段階ではその外壁をなす線維輪が破綻し内部にある髄核の変性や脊柱管内への脱出(椎間板ヘルニア)を引き起こす。この椎間板変性初期における重要イベントである椎間板の外壁破綻はさらなる変性を椎間板全体に加速的に引き起こし慢性腰痛の原因となることが知られているが、ヘルニアの標準術式である髄核摘出術に至るケースであっても本態である線維輪欠損に対しては有効な治療がなされない。これら問題が生じる中心的事実としては、椎間板は繊維輪、髄核ともに軟骨組織であり、他の運動器軟骨同様に自己修復能が極めて低い組織であり、変性や損傷で生じた繊維輪の欠損は自然治癒しない。また現在に至るまでこれを効果的に閉鎖・修復する方法は確立していない。機械的あるいは生物学的アプローチとして研究された事例を見ても、繊維輪縫合や繊維輪形成を用いた物理的閉鎖は線維輪自体の修復力を向上せず、臨床研究で長期成績を改善しないことが明らかになっていった。生物学的修復をしては組織再生工学を用いた生物学的インプラント、ハイドロゲル、小腸粘膜を用いて線維輪欠損を閉鎖・修復する手術の試みがなされてきたが、生体外実験レベルの探索であり生体を用いた実験にまで至っていなかった。

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、段階的分化誘導で胚性幹細胞(embryonic stem cells: ESCs)より導かれた間葉系幹細胞(embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells: ES-MSCs)およびこれら細胞から作成された細胞・マトリックス集合体(embryonic stem cell-derived tissue engineered construct: ES-TEC)による線維輪の修復効果と幹細胞移植による全身への影響を検証することである。とりわけ以下の点を順に明らかにする。目的1) ES-TECの軟骨分化能、ES-MSCsおよびES-TEC移植によるin vivo線維輪修復能と椎間板変性の予防効果、目的2) 幹細胞移植の全身への影響・安全性、目的3) 修復椎間板の機能性を検証する。

3. 研究の方法

段階的分化誘導により胚性幹細胞から導かれた間葉系幹細胞(ES-MSCs)および組織再生工学技術によりこれら細胞から作成された細胞・マトリックス集合体(ES-TEC)を作成し、種々の分化条件でES-MSCsおよびES-TECに軟骨分化誘導をかけてRealtime PCR、グリコサミノグリカン(GAG)定量、免疫染色でin vitro性能を検証する。動物移植データの解析からは、移植した人工組織の生物学的安定性を評価し、げっ歯類尾椎椎間板モデル(マウスおよびラット)を用いて、ES-MSCsおよびES-TEC移植実験を施行し、多能性幹細胞のin vivoにおける線維輪修復作用と髄核変性予防効果を組織学的・機能的に評価する。さらに幹細胞投与の全身的影響として主要臓器に代謝変化を質量分析で検証する。

4. 研究成果

先行研究と同様にウサギ ESCs より段階的誘導でMSCsまで分化させ、高密度平面培養により細胞シートを作成してから底面にせん断力を作用して三次元組織化させた(ES-TECの作成、図1)。このES-TEC作成時にbFGFの添加有無で2群に分けてその後の軟骨分化誘導でのGAG生成能を比較した結果、bFGF添加群ES-TECで極めて高いin vitro軟骨分化能を示した(図2)。

定量的評価として軟骨分化誘導後のES-TECではグリコサミノグリカン含有量は従来の体性間葉系幹細胞(滑膜由来MSCs)と比較して優位に高い値を示した。Realtime PCRではtype2 Collagenとaggrecanの発現がMSCsに比較して極めて高い値を示し、さらには関節軟骨細胞と同等のレベルの発現であることが明らかになった。これらデータよりbFGF添加下で作成されたES-TECは極めて高いin vitro軟骨分化能を示すことが明らかになり、以降の動物実験ではこの作成条件を採用することとした。

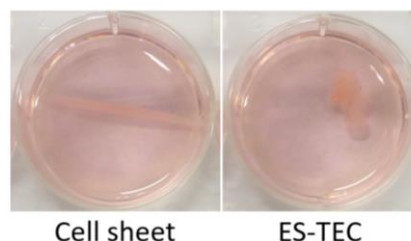


図1: 細胞シートからES-TEC

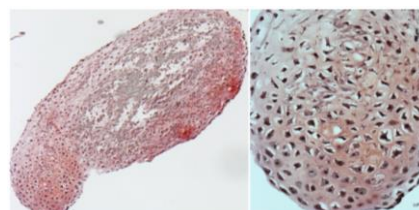


図2: ES-TEC (Safranin-O)

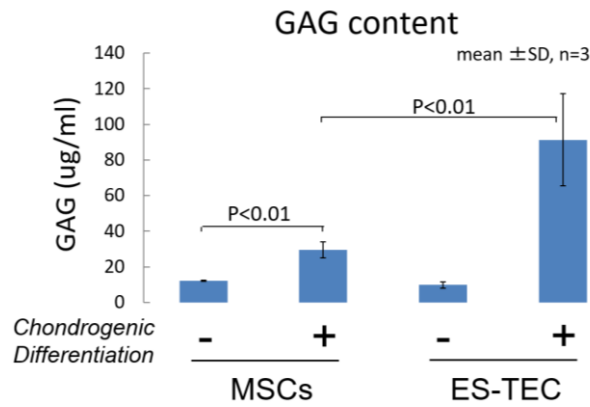


図3：グリコサミノグリカン含有量

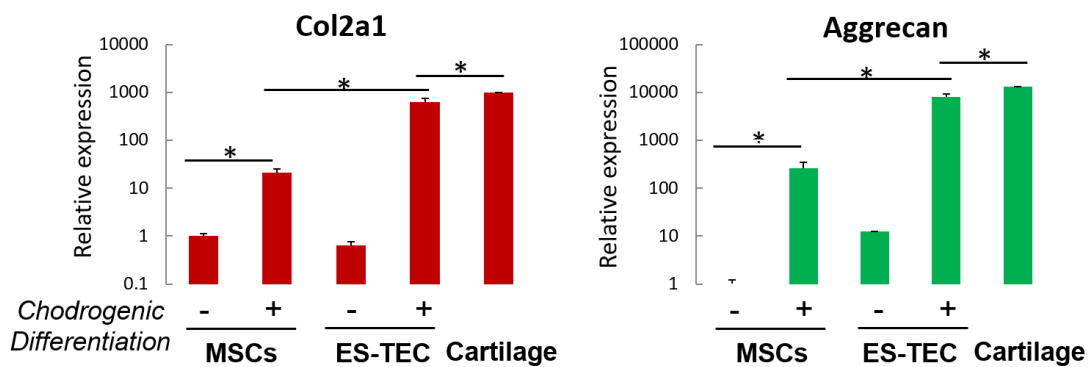


図4：Type2 Collagen および Aggrecan の Realtime PCR

ラット尾椎椎間板穿刺モデルとして露出した椎間板(図5左)を18G針で穿刺して線維輪損傷を作成し髄核脱出を誘導した(図5右)。細胞移植実験としてES-TECで線維輪損傷部を被覆した。無治療群では持続的な髄核脱出が確認され、4-12週で髄核が消失し椎間板の変性がさらに進み軟骨終板が破綻した。一方ES-TECで治療された椎間板ではこれら変性カスケードの進行や有意に抑制され、さらに線維輪損傷部に線維軟骨様修復組織が確認された(図6)。さらに椎間板の機能性評価として μ CTやXray検査ではES-TEC治療群で椎間板高が可動域に有意に維持されていた(図7)。質量分析イメージングではMSCs投与により肝臓でタウロコール酸の蓄積、肺でサーファクタント関連分子の発現変化が確認された。

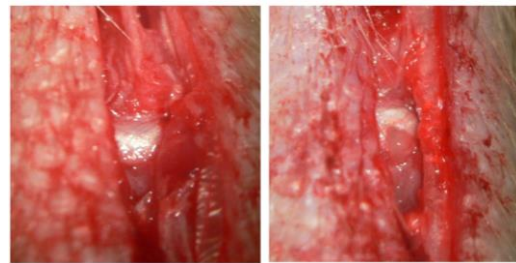


図5：ラット尾椎線維輪穿刺モデル

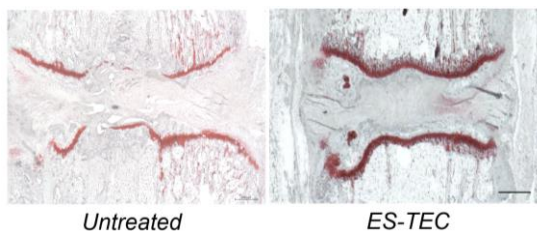


図6：ES-TECによる変性予防効果

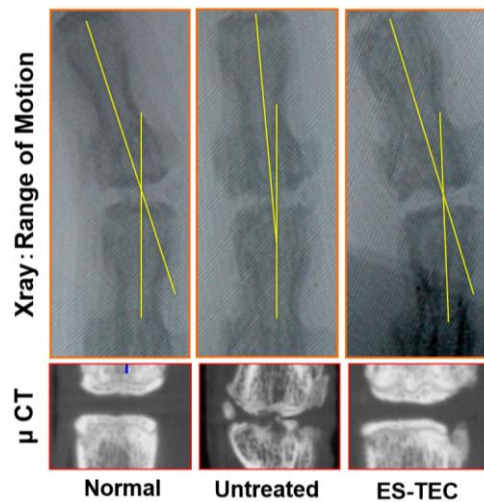


図7：椎間板高と可動域の維持

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------