

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07870

研究課題名(和文) 糖尿病患者の骨粗鬆症に対する間葉系幹細胞治療とサイトアフェレーシス併用療法の開発

研究課題名(英文) Study of combination of mesenchymal stem cell therapy and cyto-apheresis for osteoporosis in patients with diabetes

研究代表者

永石 歓和 (Nagaishi, Kanna)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30544118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)は、骨芽細胞の活性化と破骨細胞の制御の両方の作用を有し、骨形成と骨吸収の両面から骨粗鬆症の予防や改善に重要であるが、糖尿病においてはMSCの機能異常が見られる。本研究では、異常化したMSCを賦活化する方法として臍帯由来抽出物と3次元培養の併用が有用であることを明らかにした。賦活化したMSCは骨形成関連因子や血管新生因子の発現が促進され、糖尿病モデル動物において骨皮質の菲薄化や構造異常を改善する傾向を示した。糖尿病における骨密度低下や骨質劣化の制御には、骨形成能に関わるMSCの賦活化による機能改善が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者では高頻度に骨粗鬆症を合併し、骨密度の低下と骨質の劣化により骨折のリスクが高い。間葉系幹細胞は、その機能的特徴に起因して骨形成と骨吸収の両面の機序から骨粗鬆症の進行抑制および改善を期待できる新たな治療選択肢となりうる。一方で糖尿病では、高血糖に起因してMSCをはじめ骨髄幹細胞が異常化し、骨粗鬆症のほか様々な臓器合併症を引き起こす。本研究において、糖尿病患者の異常化した骨髄由来MSCを賦活化し機能改善する方法が解明できたことは意義が大きい。MSCによる細胞治療が骨粗鬆症における新たな治療選択肢となれば、骨折のリスク低下および寝たきり介護等の医療負担の軽減にも寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) have dual roles in activating osteoblasts and regulating the activation of osteoclasts, making them crucial in both bone formation and bone resorption for the prevention and improvement of osteoporosis. However, in diabetes, MSC dysfunction is observed. This study revealed that the combined use of umbilical cord-derived extract and three-dimensional cultivation is useful in activating abnormal MSCs. The activated MSCs showed enhanced expression of bone formation-related factors and angiogenic factors, and tended to improve cortical thinning and structural abnormalities in the diabetes model in rats. These findings suggest that activating the function of MSCs, which is involved in bone formation ability, is important in regulating the decrease in bone density and deterioration of bone quality in diabetes.

研究分野：再生医療

キーワード：骨粗鬆症 糖尿病 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、骨形成と骨吸収の均衡が破綻し、骨密度の減少と骨の構造が劣化する代謝性骨疾患である。加齢や閉経、生活習慣病、慢性腎臓病、薬剤等に起因し、患者数は国内で約 1300 万人と増加の一途を辿る。大腿骨頸部骨折や椎体骨折は、歩行困難や胸腹腔内容積の縮小から消化器・心肺機能を低下させ、死亡率を増加させる。糖尿病患者における骨折リスクは、健康人に比較して 1 型糖尿病で 7 倍、2 型糖尿病で 1.7 倍高い。糖尿病では、骨芽細胞の分化能が低下するほか、骨の微細構造を支持するコラーゲン架橋に AGEs が蓄積し骨質が劣化することから、骨密度が高くて骨折しやすい。従って、骨折予防を目的とした骨粗鬆症対策は急務である。

一方で、糖尿病では高血糖や終末糖化産物(AGEs)、酸化ストレス等により骨髄幹細胞が異常化する。その結果、組織障害性の骨髄由来細胞が肝臓や腎臓に集積し、M1/M2 マクロファージの不均衡化や炎症シグナルの活性化を惹起し、臓器障害を誘発する (Sci Rep, 2016)。従って、糖尿病に合併する骨粗鬆症と臓器合併症には骨髄細胞における共通の原因の存在が考えられるが、未だ解明されていない。

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells, 以下 MSC)は、骨芽細胞や軟骨細胞の供給源として骨形成に大きな役割を有するほか、産生・分泌する生理活性物質により破骨細胞活性も制御することが知られる。この点に着目した代表者の研究で、閉経後骨粗鬆症モデル動物に正常動物の骨髄由来 MSC を投与する細胞治療を行うと、骨粗鬆症が改善することを報告した(Sci Rep, 2018)。しかし、著明な骨量低下を伴う糖尿病モデルにおいては、同様の MSC の単回投与による治療介入では骨粗鬆症の改善につながる知見は得られなかった。

そこで本研究では、糖尿病において著しい骨粗鬆症を誘発する要因として、糖代謝異常の環境下において MSC の骨芽細胞活性化能と破骨細胞制御能の低下が相補的に作用して骨量の低下や骨質の劣化を引き起こすこと、また骨髄ニッチを形成する骨髄 MSC の異常化により、これにより分化や増殖が支持されるはずの骨髄由来細胞が過剰に破骨細胞の増殖や活性化を誘導すること、と仮説し、これらを効果的に制御する方法を明らかにすることとした。

2. 研究の目的

糖尿病に合併する骨粗鬆症において、(1) 高血糖に伴い異常化した骨髄 MSC の賦活法の解明、および(2) 骨髄ニッチ機能の改善を目的とした賦活化 MSC の効率的な生体投与法の確立を行い、その薬効薬理作用を明らかにする。さらに、(3) 骨粗鬆症の増悪に寄与する骨髄由来細胞の末梢血からの除去療法(サイトアフェレーシス)の効果を検討し、MSC による細胞治療との併用効果について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病モデル由来骨髄細胞の賦活法の検討

ストレプトゾトシン(STZ)の投与により誘導した 1 型糖尿病モデル動物の骨髄 MSC(以下 STZ-MSC)を単離培養し、代表者が独自に開発したヒト臍帯由来抽出物による賦活剤(Walton's jelly 抽出物、以下 WJ)の添加、およびポリエステル素材の細胞培養用担体(BioNOC II™ Cell Culture Microcarriers、以下 BC、図 1)を用いた 3 次元培養により STZ-MSC を賦活化した。MSC における骨形成・骨吸収関連の機能的変化を解析することで、異常化した MSC に対する細胞賦活化効果を解析した。

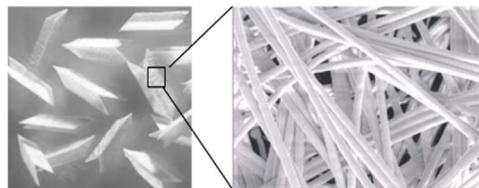


図1 ポリエステル製3D培養担体

(2) 賦活化 MSC の骨髄内移植治療法の確立と薬効薬理作用の解析

MSC による骨髄ニッチ機能の効率的な改善方法として、経静脈的アプローチと比較するために骨髄内への直接的な細胞投与方法(骨髄内移植療法)を検討した。MSC をモデル動物の脛骨近位部に骨髄内移植し、移植された標識 MSC の体内局在・生着・分化を解析した。さらに賦活化した MSC を糖尿病モデル動物に投与し、その薬効薬理作用を解析した。

(3) サイトアフェレーシス療法の効果と有効性機序の解析

糖尿病モデル動物における組織障害性の骨髄由来細胞を末梢血から除去する目的で、血球除去療法(サイトアフェレーシス療法)の確立を試みた。体外循環における抗凝固処置を最適化し、血球除去用カラムとしては酢酸セルロース製ビーズ、およびポリエステル製不織布の 3 次元媒体について検討した。走査電子顕微鏡観察による捕捉される細胞の同定や形態観察、および各種の細胞機能関連因子の発現変化を解析した。

4. 研究成果

研究の主な成果

(1) STZ ラット由来骨髄細胞の賦活化効果

STZ ラットの骨髄から単離培養した MSC(STZ-MSC)は、コントロールラットの骨髄 MSC に比較

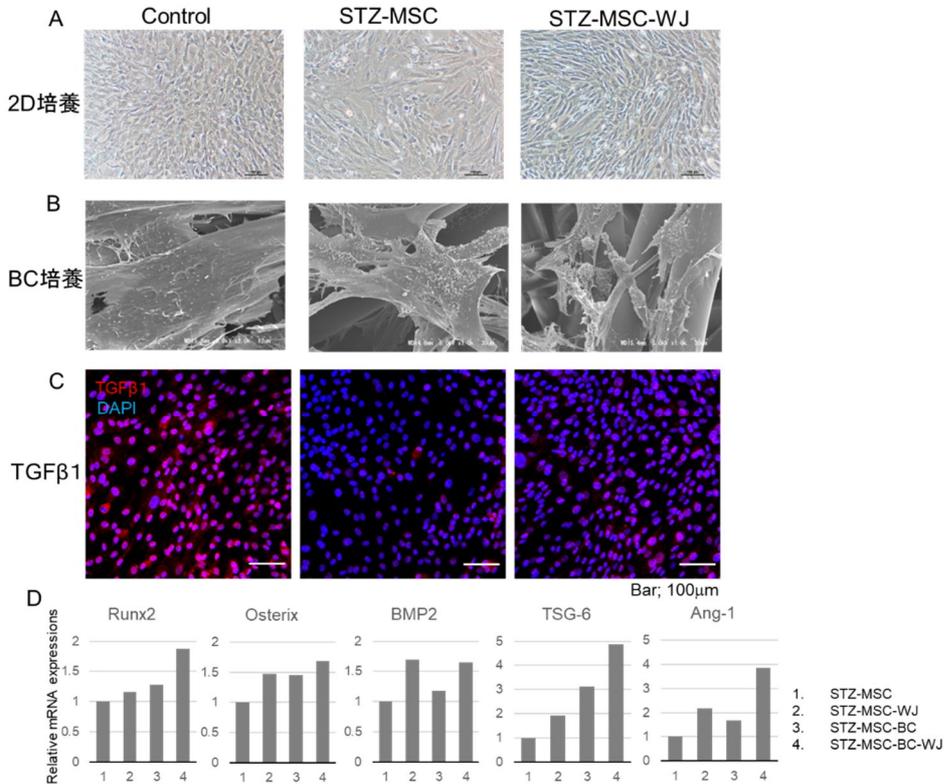


図2 STZ-MSCのWJ, BCによる賦活化効果

して増殖能が低下しており、細胞質のアクチン構造の増加と胞体の拡大・平坦化が著しく、遊走能の低下がみられた。一方、WJを添加して賦活化したSTZ-MSC(STZ-MSC-WJ)では、細胞が細く紡錘形の形態を示し、細胞同士の配向性が高まり、細胞の厚みが増加する所が見られた。これらは、細胞の遊走能やタンパク合成能の向上を示唆した。一方、BCを用いて3次的に培養したMSCは、ポリエチレンの線維間に架橋するように空間的に配置し、細胞間に伸びた多数の突起による細胞間接触が観察された。さらにWJを添加すると細胞が紡錘形の厚みのある形態に変化し、細胞表面の絨毛様構造物や微細な小孔も増加し、細胞による生理活性物質の合成分泌や細胞外小胞の分泌能の促進が示唆された(図1A,B)。

また、STZ-MSCではControl-MSCに比較してTGF-1の発現が低下していた。TGF-1は破骨細胞の成熟抑制および骨芽細胞の活性化作用を有する。WJによる賦活化によりTGF-1の発現が回復したことから、WJによる賦活化はSTZ-MSCの骨形成能の促進に寄与すると考えられた。さらに、BCおよびWJの併用によるMSCの賦活化では、骨形成に関わるRunx2, Osterix, BMP2の発現が増加し、破骨細胞制御に関わるTSG6や骨再生に寄与する血管新生因子Ang-1の発現も上昇したことから、MSCの骨代謝機能の改善を促進すると考えられた(図1C,D)。

(2) STZラットの骨粗鬆症に対するMSCの骨髄内移植治療法の確立と薬効薬理作用

STZラットでは、高血糖を誘導後経時的に骨粗鬆症の病態が進行した。脛骨近位端のマイクロ

CT像および骨の微細構造解析から、STZ投与後6週において有意に皮質骨の菲薄化や海綿骨の減少、骨微細構造の破壊がみられ、12週においてさらに進行した(図3A,B,C)。

代表者の先行研究において、MSCを経静脈的に全身投与した場合に骨組織へのMSCの分布・局在頻度が低かったことから、直接的にMSCを病変部へ投与する骨髄内移植治療法を試みた。30Gの極細穿刺針を用いてMSCをラットの脛骨近位側に投与したところ、細胞は滞りなく骨髄内に注入されたが、組織学的解析において穿刺部の挫滅の影響が大きく、介入法として推奨されなかった。

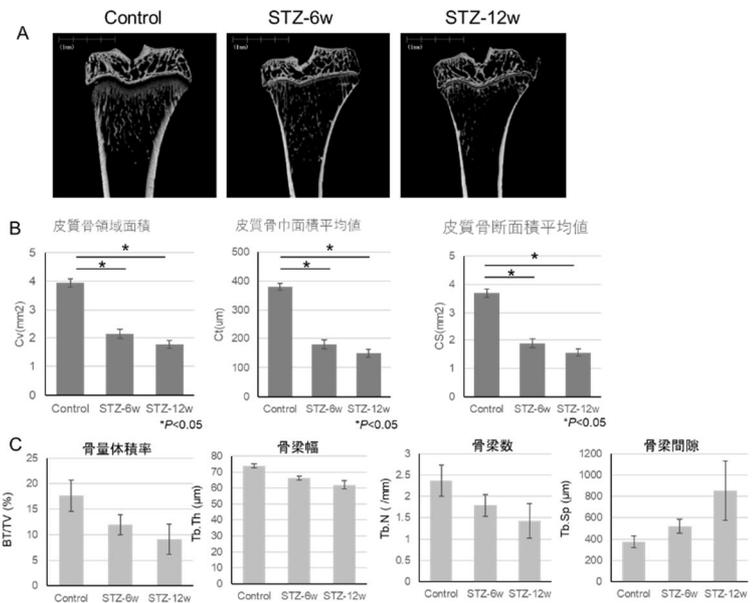


図3 STZ ratの経時的な骨量・骨構造の変化

そこで、侵襲の少ない全身投与を反復することで、賦活化した MSC の薬理効果を解析とした。MSC は、正常ラットの骨髄由来の Control-MSC、STZ ラット由来の骨髄由来の STZ-MSC、STZ-MSC を WJ で賦活化した STZ-MSC-WJ を用いて各々 STZ rat に介入することで、投与後 8 週目における骨量や骨構造の変化を解析した。投与スケジュールを図 4A に示す。

結果、皮質骨に対しては STZ-MSC-WJ の投与により骨の微細構造の破壊が抑制される傾向が見られた。Control-MSC の投与群ではむしろ骨皮質の構造破壊と菲薄化が未治療群よりも進行した。また、海綿骨に対しては Control-MSC、STZ-MSC、賦活化 STZ-MSC のいずれにおいても骨微細構造の改善が得られなかった (図 4B)。これらの結果から、MSC の複数回投与による免疫反応の惹起も一因と推察された。

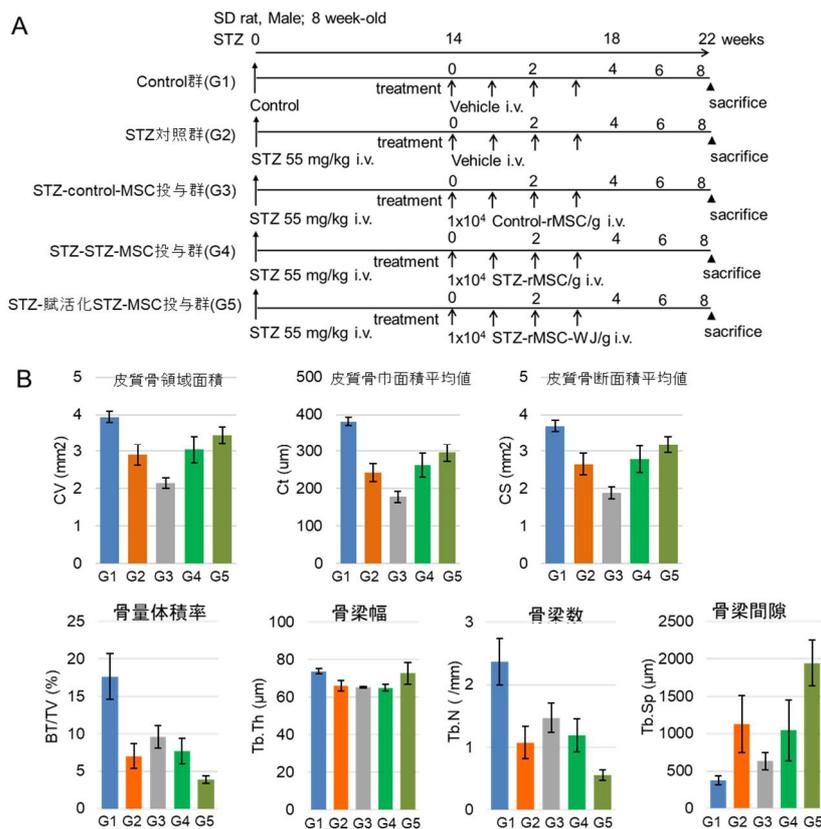


図4 STZラットの骨粗鬆症に対する各種MSCの治療効果

(3) サイトアフェレーシス療法の効果

糖尿病モデル動物における組織障害性の骨髄由来細胞を末梢血から除去する目的で、血球除去療法 (サイトアフェレーシス療法) の確立を試みた。血球除去に用いるカラムとしては、ヒトの炎症性腸疾患および乾癬の治療において効果が実証されている酢酸セルロース製ビーズ、および予備実験において血球の付着を確認したポリエステル媒体を用いて実施した。体外循環の経路と独自に作成し使用したミニカラムを図 5A に示す。

STZ ラットでは、体外循環の系は確立されたものの、骨密度、骨微細構造の増悪抑制あるいは改善に対するサイトアフェレーシスの効果は明らかではなかった。さらに、肝臓、腎臓等の臓器障害を合併する型糖尿病モデル動物 OLETF ラットについても、アフェレーシス療法の効果を検討した。走査電子顕微鏡観察により、いずれのカラムにおいても白血球、血小板が捕捉される像が観察されたが、その頻度は想定よりも低かった。血液生化学所見においても、アフェレーシスの実施前後で血球数に明らかな変動は見ら

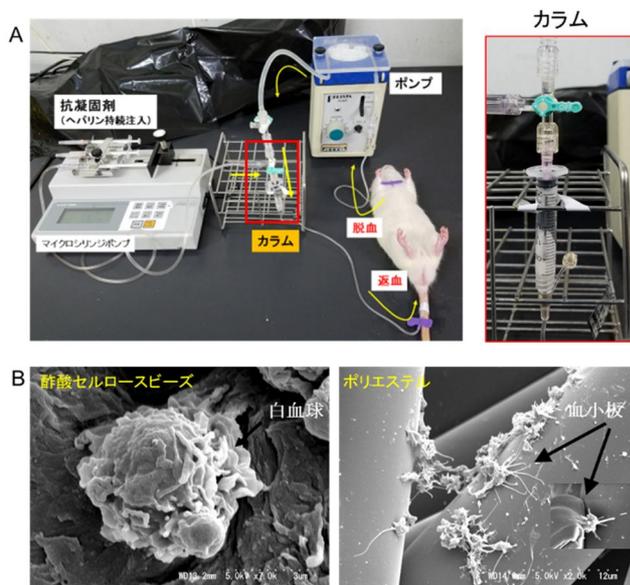


図5 STZ ratに対するサイトアフェレーシス

れず、アフエレーシスの実施時間の延長および複数回の介入によっても明らかな効果が得られなかった。これらの結果から、糖尿病における骨代謝異常や末梢臓器障害においては、末梢血を循環する組織障害惹起性の骨髄由来細胞の数自体は少なく、個々の細胞が産生するサイトカインやケモカイン、生理活性物質の多彩性や濃度が病態に影響することが推察された。

まとめと展望

糖尿病患者では高頻度に骨粗鬆症を合併し、骨密度の低下に加えて骨質の劣化により骨折のリスクが高い。間葉系幹細胞は、骨芽細胞の活性化と破骨細胞の活性化制御の両方の作用を有し、骨形成と骨吸収の両面の機序から骨粗鬆症の進行抑制および改善を期待できる新たな治療選択肢となりうる。本研究において、糖尿病患者の異常化した骨髄由来 MSC を賦活化し機能改善する方法が解明できたことは意義が大きい。今後、MSC の骨組織への親和性を高める細胞修飾法や投与方法の解明、サイトアフエレーシスに替わる併用療法の最適化により、MSC の細胞機能に立脚した細胞治療の有効性が実証できるものと考えられる。

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 永石 歓和、齋藤 憲、射場 浩介	4. 巻 4
2. 論文標題 閉経後骨粗鬆症に対する間葉系幹細胞治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 509-513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 永石 歓和、齋藤 憲、射場 浩介	4. 巻 10
2. 論文標題 賦活化した間葉系幹細胞による閉経後骨粗鬆症の細胞治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 別冊BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 144-148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 齋藤 憲、永石 歓和、射場 浩介	4. 巻 35
2. 論文標題 骨粗鬆症に対する間葉系幹細胞治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 655-659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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
研究 分 担 者	射場 浩介 (Kosuke Iba) (60363686)	札幌医科大学・医学部・特任教授 (20101)	

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