

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10129

研究課題名(和文) 立体間葉系幹細胞集塊と軟骨誘導を利用した他家移植歯周組織再生療法開発

研究課題名(英文) Development of periodontal tissue regenerative allograft cell therapy by using clumps of MSCs and chondrogenic induction

研究代表者

加治屋 幹人 (Kajiya, Mikihiro)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：00633041

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)：研究代表者は、これまでに立体間葉系幹細胞集塊C-MSCsを樹立していた。本研究では、C-MSCsに軟骨誘導を施すことで肥大軟骨様組織を作製し、その移植による骨再生効果を検証した。その結果、生体の発生・修復時に生じる軟骨内骨化の様式を経て、骨再生を促進することを見出した。一方、IFN γ 処理によって免疫制御酵素IDOの発現を高めたヒトC-MSCsを、ラット骨欠損部に異種移植したところ、移植拒絶を抑制しながら骨再生効果を発揮することも見出した。さらに、この性質は凍結保存後も維持された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C-MSCsは人工材料を用いることなく欠損部に移植可能で、組織再生効果を発揮できる。その社会実装のためには、その安全性・有効性を高める必要がある。本研究成果によって、低栄養状態に強く、軟骨内骨化を発揮できるC-MSCsが樹立できたことはより信頼度の高い骨再生医療となりえる。さらに、移植拒絶を逃れるほど免疫制御能を高めたC-MSCsを凍結保存出来ることは、ドナー細胞から作製したC-MSCsを備蓄し、患者必要時に速やかかつ確実に提供可能な他家骨組織再生療法の実現に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we have developed three-dimensional (3D) clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs), which consisted of cells and self-produced ECM, that can be grafted into bone lesion areas without an artificial scaffold. In this present study, we have generated C-MSCs by using a chondro-inductive medium (CIM-C-MSCs), of which transplantation can induce successful bone regeneration via endochondral ossification. On the other hand, we have also revealed that C-MSCs treated with IFN γ (C-MSCs-g) increased immunomodulatory enzyme IDO expression. Xenotransplantation of human C-MSCs-g into rat calvarial defect model attenuated host immune rejection and facilitated bone regeneration. More importantly, this property was retained even after its cryopreservation.

研究分野：再生療法

キーワード：間葉系幹細胞集塊 C-MSCs 軟骨誘導 軟骨内骨化 免疫原性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、細菌感染と宿主の免疫応答の結果生じる炎症性組織破壊疾患である。特に、侵襲性歯周炎や重度歯周炎といった広範囲に及ぶ歯槽骨吸収を示す状態では、残存組織中の細胞機能の制御のみでは組織再生は達成しがたい。そこで、生体外から骨形成能を有した間葉系幹細胞(MSCs)を供給する細胞治療法の開発が進められている。

この細胞治療法の利点の一つが、移植前に、MSCsを組織再生に適した分化段階の細胞に誘導しておくことが可能な点である。この移植前の細胞機能制御を適切に行うことで、効果的な歯周組織再生が達成出来ると考えられている。

また、患者自身からMSCsを分離・増殖し、移植する行程は培養期間・コストの増大につながるという問題がある。そこで、事前にドナーから分離・備蓄されたMSCsを用いる同種他家移植療法の樹立が望まれる。そのためには、患者の移植拒絶を生じない、免疫原性の低い状態で細胞移植をする必要がある。

一方、これまでに研究代表者は、MSCsと細胞自身が産生するECMを利用して間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex (C-MSCs)を樹立していた。C-MSCsは、直径1mmほどの立体的細胞集塊であり、人工足場材料を用いずに欠損部に移植され、組織再生を達成する。さらに、移植前の培養条件によってその細胞性質を制御可能という特徴がある。

ここで重要なことに、軟骨組織は細胞の自己・非自己の認識に用いられるMHC分子の発現レベルが低く、軟骨内骨化によって骨形成を行うことが知られている。したがって、C-MSCsに軟骨誘導を施すことで、免疫原性が低く移植拒絶を開始、効果的な骨再生を促進する軟骨様組織が得られると着想した。

2. 研究の目的

上述した背景に基づき、C-MSCsに軟骨誘導を施すことによって、骨再生効果が高く、免疫原性の低い状態に制御し、効果的かつ移植拒絶の生じない安全な骨再生他家細胞治療法のための基盤技術を確立することを目的とした。

また、軟骨誘導によって得られた細胞構造体の移植が移植拒絶を逃れられないケースに対応するために、MSCsの免疫制御能を高めるとされているIFN γ 刺激と、凍結保存法を併用したC-MSCsを作成し、必要時に速やかな供給が可能な他家移植骨再生細胞治療法の開発も同時に進めることとした。

3. 研究の方法

実験1

LONZA社から購入したヒト骨髄由来MSCsを48穴プレートに播種し、異種動物蛋白不含・血清不含(Xeno-free/Serum-Free(XF))増殖培地(XF-GM)で培養した。ECMタンパクが十分に産生された時点で、マイクロピペットチップを用いて鈍的に剥離し、細胞シートを得た。この細胞シートを低接着培養皿に移し、XF軟骨誘導培地(XF-CIM)で浮遊培養を行い、細胞集塊を得た(XF-CIM-C-MSCs)。比較対象として、XF-GMで浮遊培養を行うことで作製する細胞集塊XF-GM-C-MSCsも用意した。作製過程における経時的な軟骨細胞マーカーmRNA発現をqPCRで定量し、軟骨基質産生程度についてHE染色・Safranin-O染色による組織学的観察を行った。また、浮遊培養5日、10日、15日後に得られたXF-CIM-C-MSCsおよびXF-GM-C-MSCsを免疫不全SCIDマウスの頭蓋冠欠損モデルに移植し、骨再生効果をマイクロCTおよび組織学的観察で評価した。さらに野生型BALBcマウスにも同様の移植実験を行った。

実験2

LONZA社から購入したヒト骨髄由来MSCsを48穴プレートに播種し、DMEM+10%FBS+50 μ g/mlアスコルビン酸からなる増殖培地で培養した。実験1と同様の手法で細胞シートを作成し、この血清含有増殖培地で3日間培養した。さらに、50ng/mlのIFN γ を加え24時間処理し、C-MSCs- γ を得た。IFN γ 無刺激のC-MSCsとC-MSCs- γ を凍結保存培地に浸漬し、液体窒素中で48時間凍結保存を行った。その後、解凍し、増殖培地で1時間回復培養を行ったものをCryo-C-MSCsおよびCryo-C-MSCs- γ とした。得られた各種細胞集塊についてHE染色およびTUNEL染色によって組織学的観察を行った。また、野生型F344ラット頭蓋冠欠損モデルに移植し、移植拒絶の有無と骨再生効果を検証した。

4. 研究成果

結果 1

線維性の基質を中心とした XF-C-MSCs は、浮遊培養 5 日、10 日、15 日と経時的にその大きさが収縮した。さらに Safranin-O に染色される軟骨基質は観察されなかった。一方、XF-CIM-C-MSCs はその大きさを維持し、培養 10 日以降には、Safranin-O に濃染する軟骨基質と、その内部に取り込まれる軟骨細胞様細胞が観察された(図 1)。また、XF-CIM-C-MSCs はその培養過程において、軟骨細胞マーカー遺伝子群の経時的な上昇が確認された。

この得られたヒト XF-C-MSCs 及びヒト XF-CIM-CMSCs を SCID マウス頭蓋冠欠損モデルに移植したところ、培養 10 日後および 15 日後の XF-CIM-CMSCs 移植が骨再生を誘導した(図 2)。またその移植早期を観察したところ、軟骨基質が吸収し、骨基質に置き換わる像が認められ、軟骨内骨化を示唆していた。

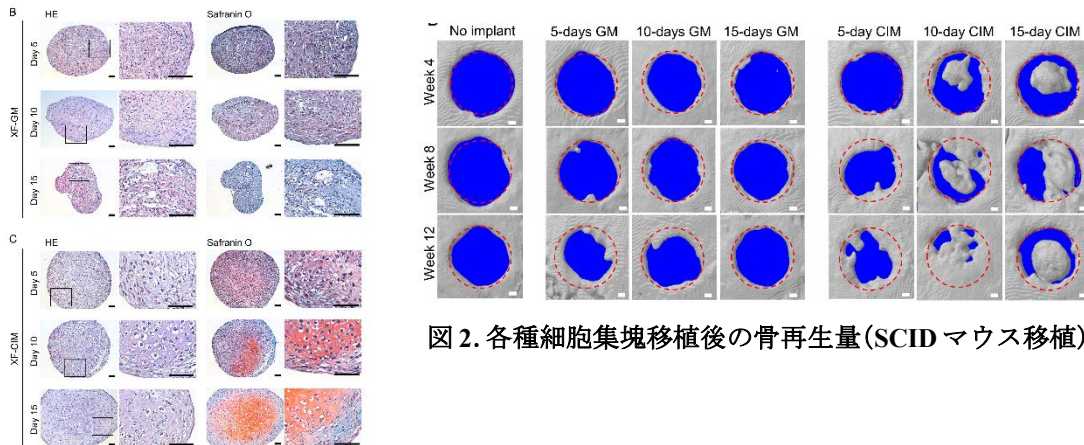


図 2. 各種細胞集塊移植後の骨再生量(SCID マウス移植)

図 1. 各種細胞集塊の組織像

以上のことから、XF-CIM-C-MSCs は軟骨内骨化の様式を経て骨再生を達成する可能性が示唆された。しかし、これら XF-CIM-C-MSCs を通常の野生型マウスに移植したところ、骨再生を達成するケースと、骨再生が得られないケースがみられ、その結果にはばらつきがあった。これは、宿主の異種移植拒絶を完全に回避できなかったためと考えられた。

結果 2

通常培地で作製した C-MSCs、IFN γ 処理を受けた C-MSCs γ 、それらを凍結保存した Cryo-C-MSCs および Cryo-C-MSCs γ は、全て球形の立体構造を維持しており、TUNEL 染色に染まる死細胞数に有意な差は認めなかった。これらを通常の免疫を有する野生型 F344 ラット頭蓋冠欠損に移植したところ、移植 8 週後には、C-MSCs γ 移植群と Cryo-C-MSCs γ 移植群において、明らかな骨再生が観察された(図 3)。さらに、移植 2 週目のサンプルについて組織学的観察を行ったところ、C-MSCs および Cryo-C-MSCs においてラット CD3 陽性 T 細胞の浸潤が多数認められた。しかし、骨再生効果を発揮した C-MSCs γ 移植群と Cryo-C-MSCs γ 移植群では、そのラット T 細胞の浸潤が明らかに減少していた(図 4)。以上のことから、Cryo-C-MSCs γ は移植拒絶を逃れ、患者必要時に速やかな供給が可能な細胞製剤として利用できる可能性が示唆された。

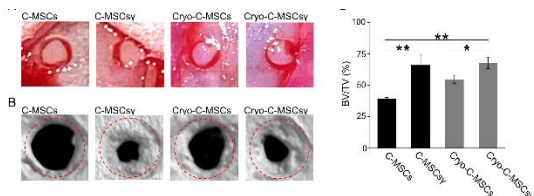


図 3. ヒト細胞集塊異種移植効果

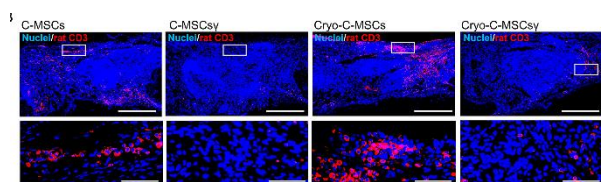


図 4. ヒト細胞集塊異種移植における T 細胞浸潤

以上の結果 1,2 の成果として、本研究では、XF 条件で骨再生効果を発揮するヒト軟骨組織様細胞集塊の作製に成功した。これは低栄養に強く、大規模欠損に対して有効な再生療法となりえる。さらに、IFN γ 前処理と凍結保存を併用した Cryo-C-MSCs γ は、他家細胞から事前に作製・備蓄し、患者必要時に速やかに提供可能な骨再生細胞製剤として応用できる可能性が示唆された。

結果 1 は、Horikoshi et al., 2021, Biomedicines として、結果 2 は、Ogawa et al., 2022, Regen Ther として論文発表を行った

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Komatsu Nao, Kajiya Mikihiro, Morimoto Shin, Motoike Souta, Yoshii Hiroki, Iwata Tomoyuki, Ouhara Kazuhisa, Matsuda Shinji, Mizuno Noriyoshi, Kurihara Hidemi	4. 巻 530
2. 論文標題 Cox2-mediated PGE2 production via p38/JNK-c-fos signaling inhibits cell apoptosis in 3D floating culture clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 448 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.100	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 Kajiya Mikihiro, Kurihara Hidemi	4. 巻 22
2. 論文標題 Molecular Mechanisms of Periodontal Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 930 ~ 930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22020930	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 Motoike Souta, Kajiya Mikihiro, Komatsu Nao, Horikoshi Susumu, Ogawa Tomoya, Sone Hisakatsu, Matsuda Shinji, Ouhara Kazuhisa, Iwata Tomoyuki, Mizuno Noriyoshi, Fujita Tsuyoshi, Ikeya Makoto, Kurihara Hidemi	4. 巻 20
2. 論文標題 Clumps of Mesenchymal Stem Cell/Extracellular Matrix Complexes Generated with Xeno-Free Conditions Facilitate Bone Regeneration via Direct and Indirect Osteogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3970 ~ 3970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20163970	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 Ogawa Tomoya, Kajiya Mikihiro, Horikoshi Susumu, Yoshii Hiroki, Yoshino Mai, Motoike Souta, Morimoto Shin, Sone Hisakatsu, Iwata Tomoyuki, Ouhara Kazuhisa, Matsuda Shinji, Mizuno Noriyoshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Xenotransplantation of cryopreserved human clumps of mesenchymal stem cells/extracellular matrix complexes pretreated with IFN- induces rat calvarial bone regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 117 ~ 125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.04.003	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 -

〔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
---------	---------