

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19168

研究課題名(和文) 羊膜由来間葉系幹細胞における細胞接着メカニズムに基づいた骨芽細胞分化誘導法の開発

研究課題名(英文) Induction culture of osteoblast differentiation for amniotic membrane derived mesenchymal stem cells focusing on cell adhesion mechanisms

研究代表者

江頭 寿洋 (Egashira, Kazuhiro)

長崎大学・病院(歯学系)・助教

研究者番号：50638096

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)：本研究の目的は、羊膜由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を誘導・促進する条件を解明し、その効率が高い技術を開発することにある。本研究期間では、アクチン重合分子の阻害に機能する海洋産物由来の阻害剤を応用することで、生体内での骨形成能を備える骨芽細胞の誘導に有利な条件を見いだすことができた。しかしながら、同じ周産期産物である臍帯由来間葉系幹細胞と比較して、骨誘導に有利と言えるレベルには到達できておらず、現在さらなる条件を探索しているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎骨腫瘍や口蓋裂顎裂などによる顎骨・歯槽骨欠損を対象とした骨再生治療に応用する同種骨芽細胞製品の開発研究については、組織採取の侵襲がなく、安定供給と大量生産が可能である周産期産物由来MSCによる細胞製品が開発できれば、即納性と有効性が確保された治療を提供できるようになる。その結果、適切な咀嚼機能の回復がより簡便になされるようになれば、健康寿命の延伸にも大きく貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Human umbilical cord (UC)-MSCs and AM-MSCs have a higher proliferative potential, however osteoblast differentiation ability is quite limited when compared to bone marrow-MSCs (BM-MSCs). Therefore, these MSCs usually require the long-term culture for differentiation but even differentiated cells cannot show sufficient in vivo osteo-inducibility. In this study, when examined various 2D and 3D matrix cultures on AM-MSCs, we found a culture with some inhibitors of actin-polymerization, which were derived from marine products, promotes the osteoblast differentiation and in vivo osteo-inducibility. However, different feature was recognized on osteoblastic differentiation among UC- and AM-MSCs, and the osteoblast differentiation ability of AM-MSCs was still limited compared to that of UC-MSCs. We are currently investigating the optimal 3D culture condition of osteoblast differentiation for AM-MSCs focusing on dynamics of actin cytoskeleton.

研究分野：再生医療

キーワード：骨再生 間葉系幹細胞 周産期産物 同種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の骨再生では自家骨移植を併用した侵襲性の大きい手術が必要であり、患者への負担が大きい。そこで、低侵襲かつ有効性の高い新規骨再生法の開発が望まれている。間葉系幹細胞 (MSC) は間葉系組織から抽出可能な、自己増殖能および多分化能を特徴とする細胞集団である。MSC は由来する組織によって異なった分化能や増殖能特性を有しており、最も一般的な供給源である骨髄由来間葉系幹細胞 (骨髄 MSC) は骨分化誘導可能で採取の方法が容易である。しかし、骨髄採取は侵襲が伴うことや移植の際に必要な細胞数の確保のために培養が必要な上、培養細胞の増殖・分化能に個体差があり、患者ごとの細胞培養に労力や時間、経費が必要であるといった問題がある。

これを解決すべく、侵襲性がなく、倫理的問題の少ない周産期産物 (臍帯、羊膜、絨毛膜など) 由来の MSC に着目している。周産期産物由来 MSC は HLAII の発現がなく、同種異系で移植可能である。また、周産期産物由来 MSC は骨髄 MSC よりも含有幹細胞数が多い、増殖能も高い、採取の際に侵襲がないといった利点があり、出産後不要となる組織を利用することから倫理的にも問題となりにくいといったメリットがある。

長崎大学において 2017 年にカテゴリ-I 羊膜バンクが設立され、既に稼働している。これまで臍帯 MSC における研究開発は、東京大学医科学研究所の臍帯バンクを利用してきたが、今回われわれは、同一施設内の羊膜バンクを起点として、羊膜 MSC による骨再生医療用治療製品の開発を試みることにした。羊膜は臍帯と比べて、MSC の単離が容易かつ採取される細胞数が多く、羊膜由来 MSC (羊膜 MSC) は臍帯由来 MSC (臍帯 MSC) よりも細胞増殖能に優れているため、より安定した開発環境を構築できる。しかしながら、羊膜や臍帯など周産期産物由来 MSC は、他の組織から単離された MSC よりも骨芽細胞への分化誘導に時間を要し、分化しても Alkaline Phosphatase (ALP) 活性が低く、その分化機構について不明な点が多い。そこで、われわれは骨分化能を亢進できる培養環境を構築することで、高い骨分化能をもつ羊膜 MSC が得られるようになれば、羊膜 MSC の特長を活かしたまま骨再生に応用できると考えた。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、臍帯 MSC を用いた移植用骨芽細胞製剤の新規培養技術を開発し、実用化に向けた取り組みを行ってきた。本研究の目的は、生体内で高い骨誘導能を発揮し得る羊膜 MSC の骨芽細胞分化を誘導促進する条件を解明し、分化誘導効率が高い羊膜 MSC を作製することである。羊膜 MSC を用いた骨再生についていくつかの試みがなされているものの克服すべき課題が多く、生体内で実際に高い骨誘導能を発揮する羊膜由来の骨芽細胞製品の実用化に至っていない。本研究では、羊膜 MSC の骨芽細胞分化誘導効率を飛躍的に向上させる手法を見出し、新しい骨再生法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 羊膜 MSC 特性解析 (*in vitro*):

骨芽細胞への分化誘導は、標準培地に骨形成タンパク質 (BMP2) の添加により行い、標準培地のみで培養したものをコントロールとする。細胞表面マーカーの発現については、フローサイ

トメトリを用いて間葉系幹細胞マーカーである CD44、CD45、CD90、CD29、CD73、CD105 について確認した。骨芽細胞分化能については、ALP 活性および遺伝子発現 (qPCR) にて解析を行なった。

(2) 阻害剤処理による骨芽細胞分化誘導能の解析:

細胞骨格や、細胞運動、細胞形態を制御する Rho-ROCK シグナルを中心とした伝達経路や、羊膜 MSC の骨芽細胞分化への関与が報告されている Phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/AKT シグナリング経路など、影響すると考えられるシグナル経路を探索した。

(3) マイクロアレイ解析および遺伝子ノックダウン実験:

阻害剤添加により羊膜 MSC が骨芽細胞へ分化する過程で発現変動する遺伝子群について解析を行なった。また Rho/ROCK シグナル解析で同定した細胞骨格調節因子上流・下流遺伝子の発現変動についても確認した。そして、その結果から骨芽細胞分化誘導に強く関与することが予想される遺伝子群を抽出し、臍帯 MSC に siRNA ノックダウンまたは過剰発現させて骨芽細胞分化誘導効率を飛躍的に向上させる羊膜 MSC の作製を試みた。

(4) 細胞移植および新生骨形成能解析: 高効率な骨芽細胞分化能が認められた羊膜 MSC を人工骨材料に組み合わせ、骨増生や骨欠損モデルマウスやラットに移植し、新生骨形成能を観察した。解析方法としては HE 染色や免疫染色、 μ CT 解析を使用して行った。

4. 研究成果

初年度は、長崎大学の羊膜バンクにて得られた試料から羊膜 MSC を単離・培養し、その特性解析 (*in vitro*) から実験を開始した。そして、骨芽細胞への分化誘導を行い、その誘導性について確認を行った。特性解析については、細胞表面マーカーの発現についてフローサイトメーターを用いて CD44、CD45、CD90、CD29、CD73 と CD105 について確認し、骨髄 MSC や臍帯 MSC と比較した。骨芽細胞への分化誘導は、標準培地に骨形成タンパク質 (BMP2) の添加により行うことで、ALP 活性の計測や幹細胞因子、骨形成性遺伝子などの遺伝子発現の解析を骨髄 MSC や臍帯 MSC と比較した。その結果、これまでに骨髄由来 MSC や臍帯由来 MSC と異なる未分化性に関する特性が明らかになり、さらに骨芽細胞への誘導については、臍帯 MSC に近い特性が明らかになった。次年度では、前年度に引き続き、羊膜 MSC の骨芽細胞分化の誘導条件について検討を行った。臍帯 MSC で確立した細胞接着メカニズムによる分化促進条件 (ゲルによる 3 次元培養) を羊膜に応用したところ、近似した条件が得られた。さらに、そのメカニズムを明らかにするため、遺伝子解析を行なったところ、変動の大きい Rho の標的となるアクチン重合分子に着目した。そして、その阻害を併用した分化誘導を試みた。その結果、分化誘導効率は明らかに上昇したため、誘導した骨芽細胞の生体内での骨形成能を評価した。ラット頭蓋骨欠損に細胞を人工骨基質と共に移植し、骨形成の評価を行ったが、骨誘導能も明らかに上昇していた。しかしながら、臍帯 MSC と比較して、その誘導能は十分と言えなかった。そのため、最終年度では、アクチン重合分子の阻害を併用した分化誘導条件について、詳細な条件検討を実施し、骨芽細胞への有効な誘導条件の確立を試みた。その結果、海洋産物由来の阻害剤を応用することで、生体内での骨形成能を備える骨芽細胞の誘導条件を見いだすことができた。しかしながら、やはり臍帯 MSC と比較して骨誘導に有利と言えるレベルにまでは到達できなかった。そのため、人工骨

基質材料上での 3 次元培養をそのまま移植に応用することで、生体内で骨誘導能を十分に発揮できる羊膜 MSC 由来の骨芽細胞による骨再生技術の開発に取り組んでいるところである。

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