

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22675

研究課題名(和文)機能拡張型血小板を用いた骨癒合技術の開発

研究課題名(英文)Development of bone adhesive treatment with functionally modified platelets

研究代表者

江藤 浩之(Eto, Koji)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50286986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：多血小板血漿(Platelet Rich Plasma: PRP)の投与に伴う骨癒合の促進効果は明らかであるが、実臨床における自己血由来PRPの安定調達は困難であり、治療効果の個人差も大きい。本研究は、すでに大量生産法および安全性の確立されたiPS細胞由来人工巨核球および血小板が複数の骨癒合因子を含有し、ラット腰椎人工骨移植モデルにおいて骨癒合促進効果を示すことを明らかにした。さらに皮膚を含む組織修復に関する複数の成長因子を人為的に発現する人工巨核球を介した機能拡張型血小板の作出にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎固定術は、難治性複雑骨折や腰椎変性疾患に対して行われ、早期のADL(日常生活動作)回復に寄与するための迅速な骨癒合の実現が必須である。iPS細胞由来血小板製剤の大量製造技術を応用し、均一性の担保された大量生産可能な血小板製剤の骨癒合への応用が確認されたことから、高齢者や外傷患者などのPRPの安定調達が困難な症例に有効と期待できる。さらに遺伝子改変した巨核球細胞株をいわば生産工場、人工血小板をキャリアとして生理活性物質を患部に輸送するための新たなドラッグデリバリーシステムが確立できた。

研究成果の概要(英文)：Platelet Rich Plasma (PRP) administration treatment is known to accelerate repairment of bone fracture by bone adhesion machinery. However, stable supply of autologous PRP, along with the diversity of individual PRP quality, never allow the given action in real clinical setting. Our research program confirmed that iPSC-derived megakaryocytes and platelets, whereby we already established mass production methods and stability, contain several growth factors for bone adhesion, resulting in significantly improved bone adhesion in a rat lumbar bone graft model, compared to that by PRP. Moreover, we transduced lentiviral vectors harboring multiple growth factors for tissue repair by iPSC-derived megakaryocytes, which also successfully produced functionally modified platelets.

研究分野：再生医学

キーワード：人工血小板 iPS細胞 骨癒合

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎固定術は、難治性複雑骨折や腰椎変性疾患に対して行われ、早期の ADL (日常生活動作) 回復に寄与するための迅速な骨癒合の実現が必須である。骨癒合達成には多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma: PRP) が効果的であるものの、高齢者、外傷患者から自己血由来 PRP を安定調達する難しさ、ロット間の成分不均一性の 2 つが解決できないために一定以上の普遍的な効果検証結果が得られていない。研究グループが確立した iPS 細胞由来血小板製剤の大量製造技術を応用し、均一性の担保された大量生産可能な血小板製剤の骨癒合への応用を提案した。本研究提案ではその効果の検証を進めた。

2. 研究の目的

iPS 細胞由来巨核球/血小板 (iPSCs derived megakaryocytes /platelets: iPS-MK/Plts) のラット腰椎人工骨移植モデルにおける骨癒合効果の検証、iPS-MK/Plts による間葉系幹細胞 (MSC) から骨細胞への分化促進効果の検証、さらに強力な治療効果を目指した成長因子の強制発現による機能拡張型血小板の開発、の 3 課題である。

3. 研究の方法

(1) iPS-MK/Plts が含有する成長因子の検証

既報の通り、ヒト iPS 細胞由来不死化巨核球株 (imMKCL) をドキシサイクリン不含培地で培養すると c-MYC, BMI1, BCL-XL 遺伝子がサイレンシングされ、乱流刺激に伴う 6 日間振とう培養後に血小板生成を確認した。濃縮工程を経て iPS-MK/Plts を回収した。フローサイトメトリー (FACSCantoII, Becton Dickinson & Co.) で CD41 および CD42b 陽性の血小板と成熟巨核球を確認した。本グループの既報で示したヒト末梢血由来 PRP のフリーズドライ化の骨癒合効果をもとに、本研究でも iPS-MK/Plts を凍結乾燥機 (FDU-1200, EYELA) で粉末化して FD-iPS-MK/Plts とした。これを蒸留水で再溶解し、組織修復に關与する各サイトカイン (TGF- β , PDGF-BB, EGF, VEGFA, FGF2) の濃度を ELISA (Quantikine[®], R&D Systems) で測定し、他の研究において測定済みであるヒト末梢血由来 PRP のサイトカイン濃度との比較検証を実施した。

(2) ラット腰椎人工骨移植モデルにおける iPS-MK/Plts の効果

Sprague-Dawley ラット (8 週齢, メス) を使用し、iPS-MK/Plts の骨形成促進効果を検証した。メドトミジン塩酸塩、ミダゾラム、酒石酸ブトルファンールの腹腔内投与による全身麻酔下に、背部正中皮膚および左背側筋膜を切開して腰椎 L4-L6 の左横突起を露出、0.5mL の人工骨 (Refit[®], Hoya) を充填した。FD-iPS-MK/Plts を蒸留水で溶解し、人工骨に含浸させたものを iPS 群、人工骨のみを対照群とした (各群 n=6)。その後、筋膜および皮膚を縫合し閉創した。術後 8 日目に安楽死処置を行い、腰椎を周囲筋膜も含めて摘出しホルマリン固定した。

画像解析により効果の定量的評価を行った。第 4-6 腰椎の上位終板から下位終板までを、CT (LCT-200, Aloka) を用いて 1 腰椎あたり 150 枚の断層撮影結果に対し、解析ソフトによって骨体積の算出を行った。各画像で左右の棘突起基部と横突起基部腹側を結ぶ直線を描き、その左右外側にある骨部分の面積をそれぞれ測定した。各スライスにおける当該面積の積算を骨体積とし、iPS 群と対照群を比較した。解析後、各検体に脱灰およびパラフィン包埋を行い、2 μ m 厚に加工した切片にヘマトキシリン・エオジン染色を行い観察した。

(3) iPS-MK/Plts が in Vitro で MSC の分化に与える効果

間葉系細胞 骨芽細胞 骨細胞の各分化過程に与える iPS-MK/Plts の効果を検証するため、まずは分化の評価系の最適化を実施した。購入したヒト MSC (Lonza) に分化促進キット (StemPro[™] Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco) を用いて骨芽細胞への分化を誘導し、14, 21 日目に ALP 染色および Alizarin Red 染色陽性による確認を実施した。同細胞から mRNA を回収し、RT-qPCR で分化マーカーである Runx2, Osterix, ALP, Col1a, Osteocalcin 遺伝子の発現を定量評価できる系を確立した。以上を用いて iPS 血小板製剤の MSC 分化促進効果を詳細に解析していく。

(4) VEGF 強制発現巨核球細胞株の作製

骨形成促進効果をより強化した機能拡張型血小板の開発を目指し、サイトカインの発現遺伝子を既存の imMKCL 巨核球細胞株に導入した。VEGF 強制発現レンチウイルスベクター pLV[Exp]-EGFP-UBC>hVEGFA の構築およびウイルスパッケージングは Vector Builder (ベクター ID: VB191128-2763jtx) を用いた。imMKCL にウイルスを感染させ 7 日後にセルソーター (FACS Aria III Cell Sorter, Becton Dickinson & Co.) を用いて EGFP 陽性の感染集団を分離取得した。VEGF 強制発現株から mRNA を回収し RT-qPCR により VEGF 遺伝子の発現を導入前の imMKCL と比較した。また (1) と同様に血小板への分化刺激を行い、得られた iPS-MK/Plts の VEGF 濃度を ELISA で測定した。

4. 研究成果

(1) 回収した iPS-MK/Plts において CD41+CD42b+ の分画が確認された (図 1)。これは imMKCL の分化および血小板産生を示しており、過去の研究結果の再現性を確認できた。ELISA の結果、FD-iPS-MK/Plts 溶解液中に含まれる TGF- β および PDGF-BB の濃度はヒト末梢血 PRP と同程度であった。VEGFA はヒト末梢血 PRP より有意に少なく、また FGF2 は PRP からは検出されなかったが FD-iPS-MK/Plts に多く含有されていた (図 2)。

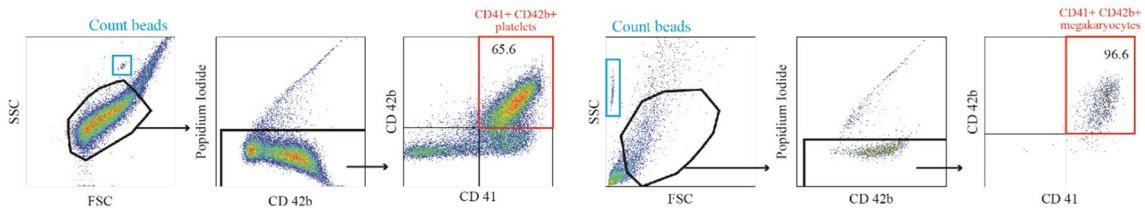


図 1: imMKCL 分化誘導後のフローサイトメトリー

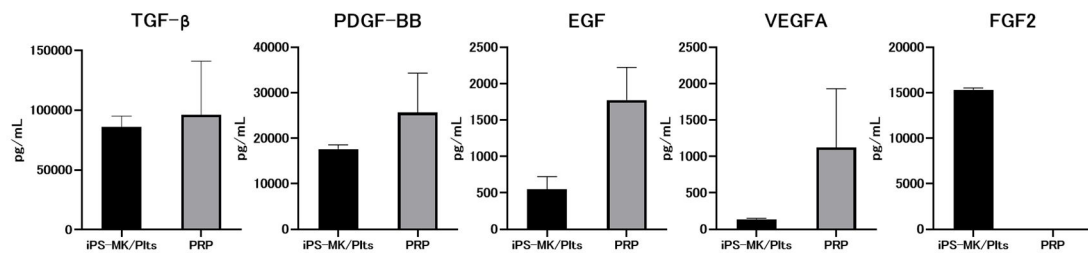


図 2: FD-iPS-MK/Plts 溶解液とヒト末梢血由来 PRP のサイトカイン濃度

(2) CT 画像上、iPS 群では左横突起に連続する骨新生を認めた。解析の結果、左側 (人口骨充填側) の骨体積が右側の iPS-MK/Plts 投与群より有意に上昇していた。また左側と右側 (非充填側) の比率を算出し比較したところ、iPS 群がコントロール群に比べ高値であった。組織学的には、コントロール群では人工骨周囲にわずかな骨化を認めるのみであったが、iPS 群では正常な骨組織で椎骨がリモデリングされていた。以上の結果から、iPS-MK/Plts の骨形成促進効果が示唆された (図 3)。

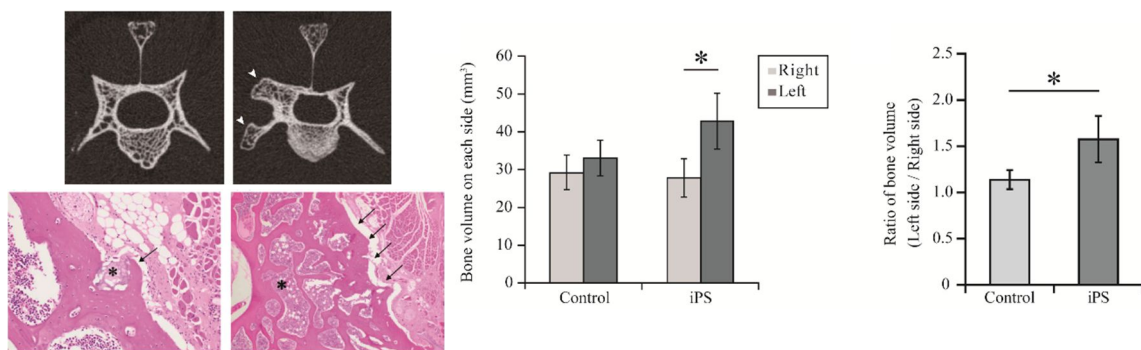


図 3 コントロール群 (左) と iPS 群 (右) の CT 画像、組織像および定量的評価

(4) RT-qPCR の結果、VEGF 強制発現株は導入前の imMKCL と比較し VEGF 遺伝子の発現が約 14 倍に上昇していた。また分化誘導後の ELISA により、強制発現株由来の iPS-MK/Plts が多量の VEGF を含んでいることが確認された (図 4)。今後は組織修復に関与する種々の遺伝子を強制発現あるいはノックダウンすることにより、より骨再生能の高い機能拡張型血小板の作製が可能となる基盤を確立してゆく。

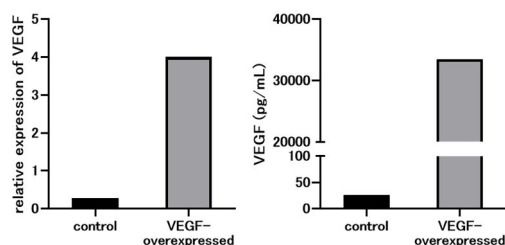


図 4 RT-qPCR (左) および ELISA (右) の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2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 Suzuki D, Flahou C, Yoshikawa N, Stirblyte I, Hayashi Y, Sawaguchi A, Akasaka M, Nakamura S, Higashi N, Xu H, Matsumoto T, Fujio K, Manz MG, Hotta A, Takizawa H, Eto K, Sugimoto N.	4. 巻 14
2. 論文標題 iPSC-Derived Platelets Depleted of HLA Class I Are Inert to Anti-HLA Class I and Natural Killer Cell Immunity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports.	6. 最初と最後の頁 49-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.11.011	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 Kasirer-Friede A, Tjahjono W, Eto K, Shattil SJ.	4. 巻 116
2. 論文標題 SHARPIN at the nexus of integrin, immune, and inflammatory signaling in human platelets.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 4983-4988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1819156116.	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 Nakamura Sou, Sugimoto Naoshi, Eto Koji	4. 巻 63
2. 論文標題 Development of platelet replacement therapy using human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 178 ~ 186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12711	査読の有無 無
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 Sugimoto Naoshi, Eto Koji	4. 巻 78
2. 論文標題 Generation and manipulation of human iPSC-derived platelets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 3385 ~ 3401
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-020-03749-8	査読の有無 無
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 Sato Masashi, Shiga Yasuhiro, Takayama Naoya, Sone Masamitsu, Kosaka Kentaro, Motegi Itsuro, Mizuki Norichika, Inage Kazuhide, Eguchi Yawara, Narita Miyako, Orita Sumihisa, Eto Koji, Ohtori Seiji	4. 巻 5
2. 論文標題 The Effect of Megakaryocytes and Platelets Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells on Bone Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Spine Surgery and Related Research	6. 最初と最後の頁 196 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22603/ssrr.2020-0226	査読の有無 無
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1件

1. 著者名 河本 宏、辻 真博	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 243
3. 書名 新規の創薬モダリティ 細胞医薬	

〔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	大鳥 精司 (Ohtori Seiji) (40361430)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	折田 純久 (Orita Sumihisa) (60638310)	千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授 (12501)	
研究分担者	志賀 康浩 (Shiga Yasuhiro) (90568669)	千葉大学・大学院医学研究院・特任助教 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	曾根 正光 (Sone Masamitsu) (90599771)	千葉大学・大学院医学研究院・特任助教 (12501)	

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