

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10010

研究課題名（和文）アクチン動態に基づく臍帯由来間葉系幹細胞における骨芽細胞分化誘導法

研究課題名（英文）Actin Dynamics-associated Induction of Osteoblast Differentiation in Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells

研究代表者

岩竹 真弓（Iwatake, Mayumi）

名古屋大学・未来社会創造機構・特任准教授

研究者番号：40624614

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）：近年、低侵襲かつ有効性の高い新規骨再生法としてとして間葉系幹細胞(MSC)の応用が提案されているが克服すべき課題が多い。非侵襲的な採取を可能とする臍帯由来MSCは高い増殖活性と骨組織への分化能を有することが報告されているものの、分化誘導に時間を要し、分化能も他の組織由来MSCよりも低い。そこで、分化促進を誘導する臍帯MSCの新規培養法を構築し、最適化を検討したところ、アクチンの動態変化への介入によって骨分化を促進できることが分かった。本分化誘導法によりアクチン重合調節因子を応用した新規培養技術により移植用骨芽細胞製剤の創出の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では将来の標準治療となり得る方法の開発を目指しており、従来多く用いられている骨髄由来MSCによる骨再生法に比べて、侵襲が少なく、治療期間の短縮や、感染などのリスクも減らすことができる場所がある。また自家細胞製剤は完全オーダーメイド製品であるため高コストになりがちであるが、臍帯MSCは現在、バンクへのストックが進められているため、製造段階のスケールを大きくすることで製造コストを抑えられると予想される。よって将来的には安価で効果の高い安全な骨再生医療が実現すると考えている。

研究成果の概要（英文）：Recently, mesenchymal stem cells (MSCs) have been proposed as a new bone regeneration method that is minimally invasive and highly effective, but there are many challenges to overcome. MSCs derived from umbilical cord, which can be harvested noninvasively, have been reported to have high proliferative activity and the ability to differentiate into bone tissue, but it takes time to induce differentiation and their differentiation potential is lower than that of MSCs derived from other tissues. Therefore, we developed a novel culture method for umbilical cord MSCs that induces accelerated differentiation and examined its optimization, and found that bone differentiation can be promoted by intervening in the dynamic changes of actin. This differentiation induction method suggested the possibility of creating osteoblast preparations for transplantation by a novel culture technique applying actin polymerization regulating factors.

研究分野：骨再生

キーワード：臍帯由来間葉系幹細胞 骨再生 骨芽細胞分化誘導

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨形成不全症や歯周病などの疾患に対する骨再生治療は現在確立しておらず、骨欠損治療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。

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幹細胞(骨髄MSC)は骨分化誘導可能で免疫抑制作用も有する。しかし、骨髄採取は侵襲性が大きい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に、培養細胞の増殖・分化能に個体差が大きく培養操作が困難であるといった問題がある。

2. 研究の目的

他家移植の細胞源として臍帯MSCはHLA-II発現がなく免疫寛容能が高いため、同種異系で移植可能なため有利である。臍帯組織は非侵襲的に採取でき、臍帯MSCは増殖活性も高く、分担研究者の東京大学医科学研究所長村准教授によるバンキングも確立されており、細胞の安定供給もできる。しかしながら、他の組織に由来する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)活性も低く、その分化機構について不明な点も多い。よって、我々は最適な培養環境を構築し、高い骨芽細胞分化能をもつ臍帯MSCが得られれば、臍帯MSCの特長を活かしたまま骨再生に応用できると考えた。

本研究では、細胞外基質タンパク質への臍帯MSCの接着とその骨芽細胞分化への影響に注目し、制御機構を解明することにより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ことを目的とした。

3. 研究の方法

① コラーゲン基質培養

コラーゲンは、細胞の接着に關与する細胞接着分子であるインテグリンと結合し、細胞内シグナルを活性化する。臍帯MSCのコラーゲン基質培養について予備実験を実施したところ、未分化/骨芽細胞ともにALPのmRNA発現上昇が見られ、特に骨芽細胞においてはコラーゲンゲル上培養で顕著な発現上昇が観察された。そこで今後の研究では、2次元および3次元コラーゲンゲル培養(図1)を用いて、骨芽細胞への分化誘導効率を促進する最適な培養条件を検討する。

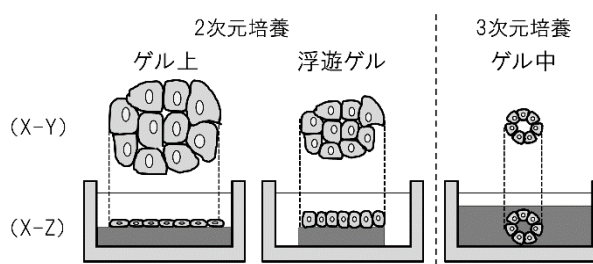


図1 コラーゲン・ゲル培養法

② コラーゲンゲルナル解析

骨分化の過程では細胞の形態を変化させることが必要であるが、それにはアクチン細胞骨格を制御するRho/ROCKシグナル(図2)が重要となる。コラーゲン基質培養で骨芽細胞誘導に影響を与える標的タンパク質やシグナル伝達経路を同定し、骨芽細胞誘導亢進に關わる細胞骨格調節因子を見出す。

③ マイクロアレイ解析

臍帯および骨髄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マイクロアレイを用いて解析する。臍帯MSCで発現が低く骨髄MSCで上昇している遺伝子群の中から、②Rho/ROCKシグナル解析で同定した細胞骨格調節因子の上流・下流遺伝子の発現変動を確認する。その結果から骨芽細胞分化誘導に強く關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臍帯MSCを作製する。その細胞を骨欠損モデルマウスに移植し、臍帯MSCによる骨再生能を評価する。

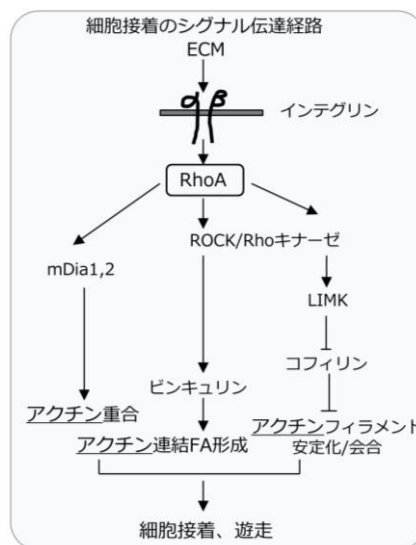


図2 Rho-ROCK シグナル経路

4. 研究成果

臍帯 MSC は HLA II 発現がなく同種異系(アロ)で移植可能であり、バンキングが進められているため細胞の安定供給が可能であり、高い有用性がある。さらに臍帯 MSC は採取が非侵襲的に可能で、高い増殖活性と骨組織への分化能を有することが報告されている。しかしながら、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) 活性も低く(図 3)その分化機構について不明な点が多く残されている。

そこで我々は高い骨分化能をもった臍帯 MSC を得られるような培養プロセスを開発する取り組みを進めてきた。これまでの細胞外環境設計による幹細胞の操作技術は、BMP-2 などの液性因子添加による外因性シグナル誘発による分化誘導調節が主体であった。しかしながら、歯肉肥大などの副作用や必要な部位への局所投与が必要であるなどの面から臨床応用への問題点や課題があった。そこで本開発では新規な分化制御手法として細胞挙動を介した内因性シグナリング誘発に基づく培養手法を提案した。

臍帯 MSC は、他の細胞種と同様、細胞周囲を細胞外マトリックス (ECM; extracellular matrix) に囲まれている。ECM は、単に細胞接着のための足場を提供するだけでなく、細胞膜表面に存在する受容体を介し、細胞の増殖、分化、遊走など多くの生理活性に寄与することが報告されている。コラーゲンは細胞の接着に関与する細胞接着分子と結合し、細胞内シグナルを活性化することが可能であり、細胞外マトリックスを構成する代表的な分子である。このコラーゲン基質を用いて臍帯 MSC を培養すると未分化/骨芽細胞ともに ALP 活性および上昇が見られ、特にコラーゲンゲル上培養では顕著な ALP 遺伝子発現上昇が観察され、骨髄 MSC と同レベルまで上昇した。

我々はコラーゲン比較実験においてコラーゲンゲル上培養が有効であるという知見を得た。

これらの制御機構について「BMP-2 - BMP receptor II (BMPRII) - cofilin (図 4)」伝達経路を解析したところ、BMPRII と cofilin とともに mRNA 発現上昇が見られた。cofilin はアクチンフィラメント (F-actin) の脱重合・切断因子であるため、cofilin が活性化すると F-actin は G-actin へ移行することが知られている。

細胞製品を製造・供給するシステムを実現するためには可及的に特別な処理をすることなく移植細胞を用意でき、細胞の取扱も容易でなければならない。ゲル上培養では細胞採取のためコラゲナーゼ処理を要するなど手間がかかり、実用化には適していない。そのため、通常の培養で細胞数を確保しつつ、分化促進を誘導する臍帯 MSC の設計と最適化が重要となる。

そこで、我々は2種類のアクチン重合阻害剤を用いて骨分化促進の検討を行った。アクチン阻害剤の Latrunculin A、Swinholide A のどちらの添加群においても ALP mRNA の発現上昇が見られた。アクチンの動態変化については、阻害剤で処理した細胞は F-actin が崩壊するが、その後培養を重ねると F-actin は再構成し、G-actin の発現も多く見られ、ゲル上培養での形態と同様の細胞内局在変化を示した。

また幹細胞から多様な細胞が分化誘導される過程では均質な分化細胞群を安定して得ることが難しいことも課題としてある。その主な原因は細胞不均質性や多方向かつ段階的に進行する分化誘導過程において細胞間コミュニケーションや誘導などの細胞挙動を伴っているからと考えられる。臍帯 MSC は分化誘導後も Oct4、Nanog などの未分化マーカーの高発現が維持されるが、コラーゲンゲル培養では長期間の培養後、未分化マーカーは発現減少する。

臍帯 MSC は無侵襲で採取でき、通常は医療廃棄物として取り扱われるためバンキングしやすく安定供給が可能であり、成体組織由来 MSC を用いた骨再生よりも利点が多い。本開発はヒト臍帯 MSC をアクチン重合阻害剤によって培養条件を最適化することにより、遺伝子操作なしにヒト臍帯 MSC からの骨芽細胞への分化を誘導する方法となる。

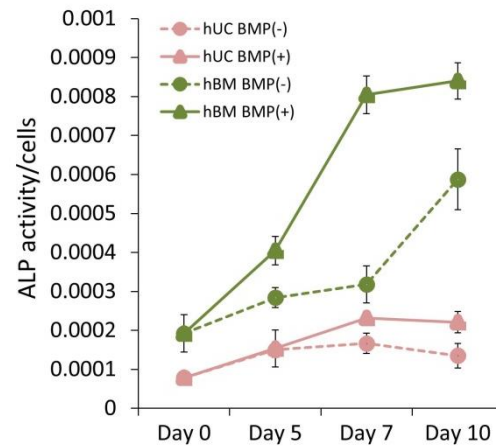


図 3 BMP-2 細胞内シグナル伝達経路

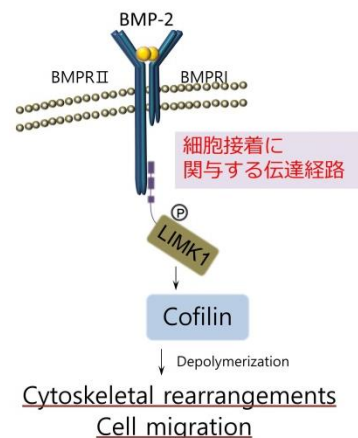


図 4 臍帯および骨髄 MSC の BMP-2 分化誘導による ALP activity

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Hara Masahito, Sumita Yoshinori, Kodama Yukinobu, Iwatake Mayumi, Yamamoto Hideyuki, Shido Rena, Narahara Shun, Ogaeri Takunori, Sasaki Hitoshi, Asahina Izumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Gene-Activated Matrix with Self-Assembly Anionic Nano-Device Containing Plasmid DNAs for Rat Cranial Bone Augmentation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 7097 ~ 7097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14227097	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 Shido Rena, Sumita Yoshinori, Hara Masahito, Iwatake Mayumi, Narahara Shun, Umebayashi Mayumi, Miura Kei-ichiro, Kodama Yukinobu, Asahina Izumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Gene-activated matrix harboring a miR20a-expressing plasmid promotes rat cranial bone augmentation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Biomaterials	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rb/rbaa060	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩竹真弓、土谷智史、長村登紀子、松本桂太郎、土肥良一郎、宮崎拓郎、朝重耕一、永安武
2. 発表標題 臍帯由来間葉系幹細胞を応用した新規COPD治療細胞の創製
3. 学会等名 第48回日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩竹真弓
2. 発表標題 分野横断研究に基づく移植用治療細胞開発の基盤技術の創出
3. 学会等名 若手新分野創成研究ユニット・フロンティア 医工若手研究者交流会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 ヒト臍帯由来間葉系幹細胞から骨芽細胞の製造を目的としたアクチン重合阻害剤による分化誘導技術	発明者 住田吉慶, 岩竹真弓, 朝比奈 泉, 小守壽文	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、第6785516号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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	住田 吉慶 (Sumita Yoshinori) (50456654)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授 (17301)	
研究 分担者	長村 登紀子 (Nagamura Tokiko) (70240736)	東京大学・医科学研究所・准教授 (12601)	

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