

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390429

研究課題名（和文）間葉系幹細胞への高効率量子ドット導入法と間葉系細胞・組織の分化過程に関する研究

研究課題名（英文） Effective internalization of quantum-dots to mesenchymal stem cells and study of differentiation process of mesenchymal cells and tissues

研究代表者

植村 壽公（UEMURA TOSHIMASA）

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノシステム研究部門・主任研究員

研究者番号：60176641

研究成果の概要（和文）：

モーターリン抗体を用いて、間葉系幹細胞に量子ドットを効率よく細胞内に導入する技術を確立した。量子ドットを導入した間葉系幹細胞に、骨分化、脂肪分化、軟骨分化誘導培地を用い分化誘導をかけ、インビトロ、インビボにおける影響を評価した。その結果、インビトロにおいて間葉系幹細胞の分化に与える影響は無視できる程度に小さく、インビボでは、骨再生で8週間、軟骨再生で24週間以上の追跡が可能であることが示され、その有用性が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We succeeded in developing techniques for effective internalization of quantum-dots (Q-dots) to mesenchymal stem cells (MSCs). We examined in vitro and in vivo effects of the internalization of Q-dots to MSCs, with using osteogenic, adipogenic, chondrogenic induction. In vitro results suggested negligible effect on each differentiation by the internalization, in vivo results indicated a long term tracking observation for over 8 weeks for bone regeneration model and over 24 weeks for cartilage regeneration model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学,量子ドット,間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

骨髄に多く含まれる間葉系幹細胞は現在の医療現場で使用可能な細胞ソースとしてもっとも期待される幹細胞であり、骨、脂肪、軟骨などに分化する（図1）。それ以外に心筋などにも分化することが知られ、近未来の再生医療の細胞

ソースであるが、その臨床応用において常に問われるのが、生体外環境で培養した間葉系幹細胞由来細胞が生体内でどのような挙動をするのか。たとえば、骨欠損部位において、移植細胞が骨を形成するのか、移植細胞からのシグナルにより移植部位周囲の細胞が骨を形成するの

か？骨—軟骨のような複合組織ではどうなのか、安全性は担保されているのか。などの移植細胞のダイナミックスである。

そのために、種々、細胞の染色法が試みられているが、染色剤や蛍光標識を用いる方法は時間とともに急激に減衰するので長期評価に適さない。雄細胞を雌に移植しY染色体のISHを行う手法（Kojima, Uemura, J. Biol. Chem. 280, 2944 (2005)）は有効ではあるが、他家細胞移植であり特殊な実験系にしか用いることができない。それゆえ、汎用性があり、長期安定な染色技術、そのモニタリング技術が切望されている。

研究分担者のワダワは、HSP70 ファミリータンパク質の一種であるモータリンの抗体が細胞表面上のモータリンに結合すると、細胞内に取り込まれる（internalize）ことを見出し、蛍光強度が減衰することのないQ-dot(図2)と conjugate することにより、癌細胞などへのQ-dot 導入法を発明した。植村はその技術を間葉系幹細胞に導入することを検討し、数種の間葉系幹細胞でQ-dot が導入されることを検証した（植村寿公、ワダワレヌー他「モータリン結合物質を用いた未分化細胞標識方法」産業技術総合研究所、特願 2008-269114）。本研究では、以上のプレリミナリーな実験結果を基礎に、再生医療の前臨床試験レベル(図3)で使用可能な未分化間葉系幹細胞のQ-dot 標識方法を確立することを目的とした一連の実験的研究を行う。

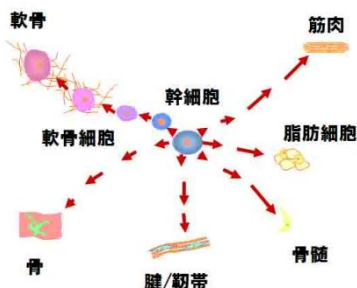


図1 間葉系幹細胞の各細胞への分化スキーム

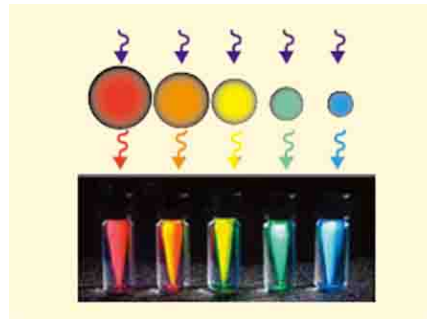
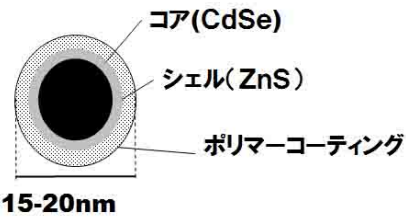


図2 Q-dot の構造と蛍光特性のバリエーション

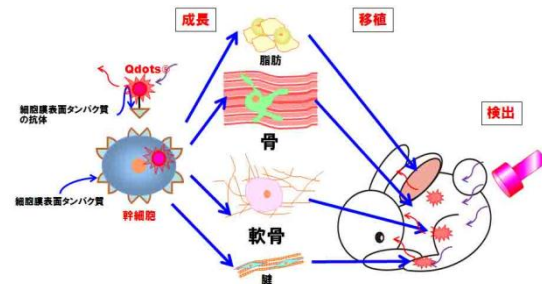


図3 モータリン抗体を用いた再生医療前臨床試験の概念

2. 研究の目的

前章で述べた研究開始当初の背景プレリミナリーな実験結果を基礎に、再生医療の前臨床試験レベルで使用可能な未分化間葉系幹細胞のQ-dot 標識方法を確立することを目的とする。

そのために、以下の研究項目について実験的研究を行う。

- (1) モータリン抗体を用いた各種間葉系幹細胞へのQ-dot 導入評価

まず、各種間葉系幹細胞へのQ-dot 導入方法の最適化を行う。

- (2) Q-dot 導入間葉系幹細胞の、骨、脂肪、軟骨への分化過程の評価

本手法の信頼性を担保するためには、

Q-dot 導入により、間葉系幹細胞の分化、増殖能に変化がないことを示す必要がある。間葉系幹細胞の主な用途である、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化過程を Q-dot 導入、非導入細胞の比較から検証する。

(3) 培養骨移植モデル、培養軟骨移植モデルにおける移植細胞の挙動に関する研究

骨髄由来間葉系幹細胞の典型的な応用例である培養骨移植系モデルにおいて、Q-dot 導入細胞の移植後、生体内での骨形成過程を評価し、骨形成のメカニズム解明と同時に、Q-dot 導入間葉系幹細胞を用いた方法論を確立する。

以上、一連の研究を遂行することによって、モータリン抗体を用いた間葉系幹細胞への Q-dot 導入方法が確立し、各種移植モデルへの適用法が明確にする。

本研究により、間葉系幹細胞への効率的な Q-dot 導入方法が提供される。これまでに間葉系幹細胞をめぐる様々な生理現象の研究がなされてきたが、間葉系幹細胞のマーキング手法が十分でないために、クリアな結論を得ることが難しかった例は多いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) モータリン抗体を用いた各種間葉系幹細胞への Q-dot 導入評価

ヒト間葉系幹細胞、ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞、ラット骨髄由来間葉系幹細胞、サル骨髄由来間葉系幹細胞に関して、モータリン抗体を用いた Q-dot 導入条件を探る。

FACS を用いて導入効率を評価する。

(2) Q-dot 導入間葉系幹細胞の、骨、脂肪、軟骨への分化過程の評価および安全性評価

①ラット骨髄細胞を用いた骨・脂肪分化の評価 (インビトロ)

ラット間葉系幹細胞に本手法を用いて、Q-dot を導入後、骨芽細胞分化誘導培地、脂

肪細胞分化誘導培地を用いて、骨芽細胞、脂肪細胞に分化誘導後の蛍光観察、および、骨芽細胞、脂肪細胞を特徴づける染色法により確認した。骨芽細胞、脂肪細胞に分化した後の蛍光強度特性を調べた。

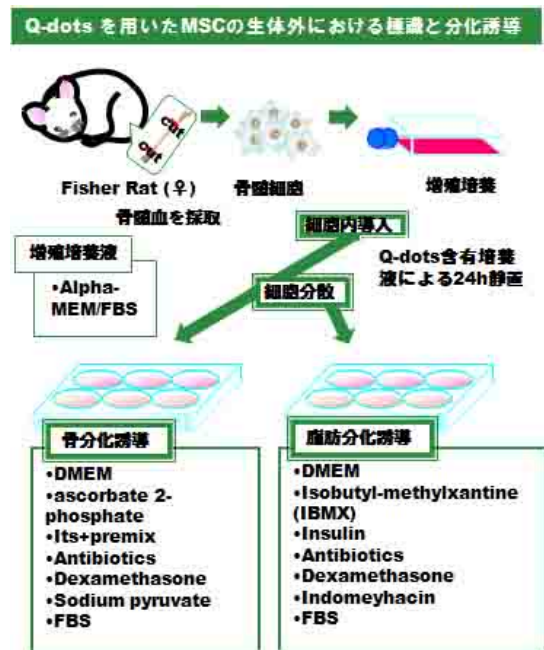


図4 Q-dot ラベルしたラット骨髄細胞から骨、脂肪分化過程の評価

②ラビット骨髄細胞を用いた軟骨分化の評価 (インビトロ)

日本白色家兎の骨髄細胞を採取後、増殖培養し、量子ドットをモータリン抗体を用いて導入、RWV 回転培養法により3次元培養し、3次元軟骨を構築したのち、組織化学的評価を行った。

(3) 培養骨移植モデル、培養軟骨移植モデルにおける移植細胞の挙動に関する研究

①培養骨移植モデルを用いた評価

骨の再生医療の基礎となる骨髄由来間葉系幹細胞を用いた培養骨移植法の移植細胞に Q-dot を導入し、移植後の細胞の挙動と骨形成を観察し、培養骨移植法における骨再生のメカニズムを探った。(用いたモデル (Kojima, Uemura, J.Biol. Chem. 280(4), 2944, 2005 参照))

下図に示すように、Fisher rat 長骨より骨髄間葉系細胞を採取し、Maniatopoulos の方法に従い 10%FBS 含有 α MEM 培地で選択培養し、モーターン抗体を用いた Q-dot 導入を行う。7 日程度の増殖培養後、トリプシン処理で細胞を剥がし、多孔性セラミックス材料 (β -TCP) に播種し、Dexamethasone, ascorbic acid, b-glycerophosphate を supplement として加えた骨芽細胞分化誘導培地で 2 週間培養し、Fischer rat 背部皮下、大腿骨に孔をあけた骨疾患モデルに移植した。移植 4 週間後に、移植片を採取し、組織化学的観察を行った。

また、Q-dot 導入による安全性評価を目的として、上記同様の手法により Q-dot ラベル間葉系幹細胞を移植 3 か月後に、肺、腎臓、肝臓、精巣を採取し、量子ドットの主成分である Cd の含有量を原子吸光分析により評価を行った。

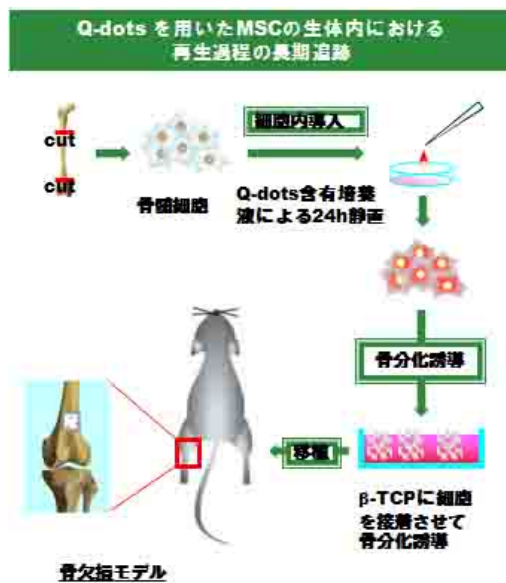


図 5 Q-dot ラベルしたラット骨髄細胞の移植モデル

②培養軟骨移植モデルを用いた評価

RWV バイオリアクターを用いた 3 次元培養ののちに、日本白色家兎の膝全層欠損モデルに移植し、組織化学的評価を行った。

4. 研究成果

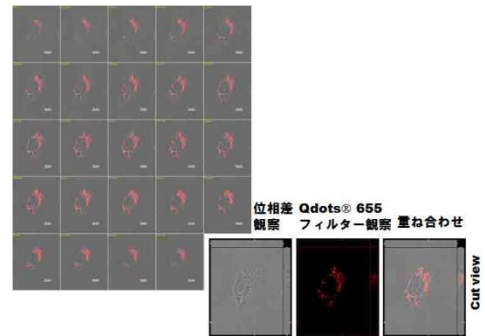


図 6 Q-dot 導入 MSCs の共焦点顕微鏡画像

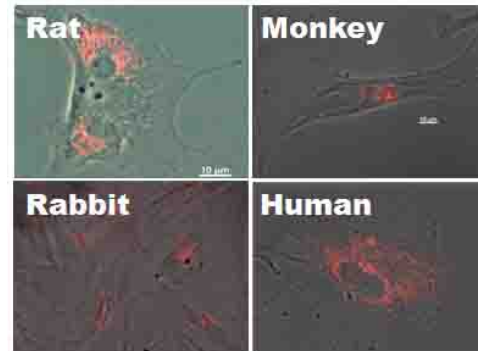


図 7 ラット、兎、サル、ヒト骨髄間葉系幹細胞への Q-dot 導入効果

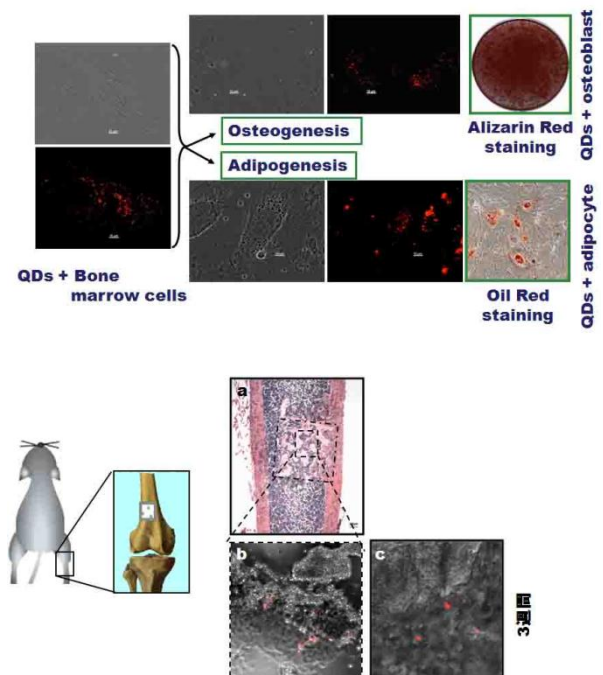


図 8(上) 量子ドット導入 MSC の骨、脂肪分化

図 9 (下) 量子ドット導入 MSC s の骨欠損モデルへの移植 (移植 3 週間後の切片像)

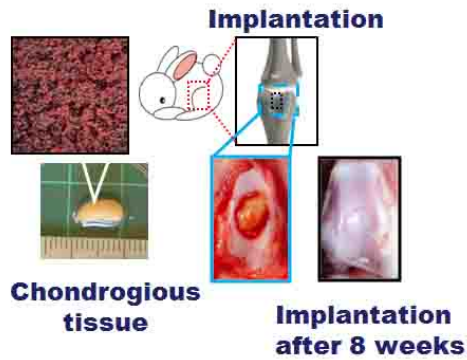


図10 ラビット膝全層欠損モデルへの移植

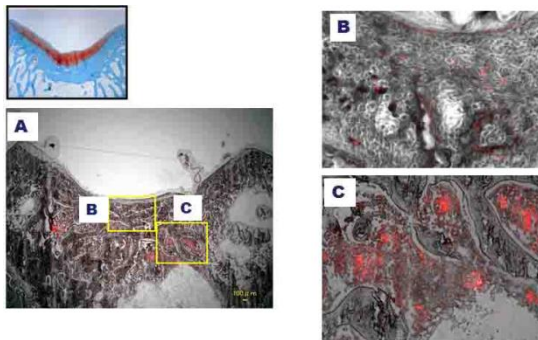


図11 移植8週後の移植部位の切片像

(1) モータリン抗体を用いた各種間葉系幹細胞への Q-dot 導入評価

図6, 7に示すように、モータリンを用いた量子ドット導入は、細胞質内に均等に導入されており、ラット、ウサギ、サル、ヒトの骨髄由来間葉系幹細胞に対し、高効率で量子ドットが導入されていることが分かった、FACSを用いて、約96%の導入効率があることが分かった。

(2) Q-dot 導入間葉系幹細胞の、骨、脂肪、軟骨への分化過程の評価および安全性評価

①ラット骨髄細胞を用いた骨・脂肪分化の評価 (インビトロ)

図8に結果を示す。ラット骨髄に量子ドット導入し、骨分化誘導、脂肪分化誘導をかけ、前者はアリザリンレッド、後者はオイルレッド染色により、分化能を非導入群と比べたところ、有意差はなく、量子ドット導入効果は分化に対して無視できる程度であることが分かった、

②培養軟骨移植モデルを用いた評価

図10に示すごとく、ラビット骨髄由来間葉系細胞に量子ドット導入後、RWV バイオリアクターによる3次元培養により、均質な軟骨組織が構築できた。量子ドットの分布も組

織内で均質であった。

(3) 培養骨移植モデル、培養軟骨移植モデルにおける移植細胞の挙動に関する研究

①培養骨移植モデルを用いた評価

図9に示すように、ラット大腿骨に移植した、多孔性セラミックスと量子ドット導入間葉系幹細胞のコンポジット移植後、3週後にセラミックスの孔中に骨組織が形成されていること、また、その再生骨には量子ドットからの蛍光が観察され、骨再生に移植した間葉系幹細胞が関与していることが分かった。骨再生では8週間の長期にわたり量子ドットの観察が可能であった。

また、本実験モデルと同様の実験を行った後3か月後、ラットの肺、肝臓、腎臓、精巣を採取し、Cd 元素分析をおこなったところ、測定限界以下、ほとんど検出されなかった。これらの臓器は異物を蓄積しやすい臓器であるため、結果は少なくとも骨への移植においては、臓器への蓄積による毒性は無視できる手法であると言える。

②培養軟骨移植モデルを用いた評価

図11は移植8週後の移植部位の切片像(赤は量子ドットからの蛍光)である。Bは移植部位の中で軟骨再生部位、Cは骨再生部位である。軟骨細胞は一般に少ないので、蛍光の量に差があるのは当然であるが、組織像から、量子ドット標識間葉系幹細胞は、全層欠損モデルへの移植、再生過程で、軟骨再生、骨再生(軟骨および軟骨下骨)の両方の再生に大きく寄与していることが明らかになった。軟骨再生では24週間、量子ドットの観察が可能であった。

その他の試験

脂肪由来間葉系幹細胞もラット脂肪組織を用いて行い、量子ドット導入、分化への影響も骨髄由来と同様であることが分かった。

まとめ

以上の結果から、モータリン抗体を用いて、間葉系幹細胞に量子ドットを効率よく細胞内に導入する技術を確立した。量子ドットを導入した間葉系幹細胞に、骨分化、脂肪分化、軟骨分化誘導培地を用い分化誘導をかけ、インビトロ、インビボにおける影響を評価した。その結果、インビトロにおいて間葉系幹細胞の分化に与える影響は無視できる程度に小さく、インビボでは、骨再生で8週間、軟骨再生で24週間以上の追跡が可能であることが示され、その有用性が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

① T.Uemura, T. Yoshioka, M. Nishi, S. Kaul, R. Wadhwa, H. Mishima, Cartilage Regeneration from Mesenchymal Stem Cells by RWV Bioreactor and Tracking of Quantum-Dot Labeled Cell Aggregates Transplanted into Osteochondral Defects of Rabbits. Nano Biomedicine, 査読あり, 3, 2011, 175

(DOIなし)

② Tomokazu Yoshioka, Hajime Mishima, Kaul Zeenia, Yoshimi Ohyabu, Shinsuke Sakai, Naoyuki Ochiai, Sunil Kaul, Renu Wadhwa, Toshimasa Uemura, Donor cell fate with mortaline antibody conjugated internalizing quantum dots (QDs) labeled, cartilaginous aggregates formed from bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) following allogeneic transplantation into osteochondral defects of rabbits. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 査読あり, 5(6), 2011, 437-443

(DOIなし)

③ Toshimasa Uemura, Masanori Nishi, Tomokazu Yoshioka, Hajime Mishima, Sunil Kaul, Renu Wadhwa, Long Term in vitro/in vivo Labeling of Mesenchymal Stem cells by Internalizing Quantum Dots Using Mortalin Antibody- Its Application to Cartilage Regeneration and Risk Assessment Proceedings of ICBS2011(International Conference of Biomaterials Science 2011), 査読あり, 2011 418 (DOIなし)

④ 吉岡友和、三島初、落合直之、大藪淑美、ワダワレヌー、植村寿公、量子ドットによる新しい細胞標識法整形災害外科, 査読あり, 2010 53(8) 961-964 (DOIなし)

⑤ Ohyabu Y, Kaul Z, Yoshioka T, Inoue K, Sakai S, Mishima H, Uemura T, Kaul SC, Wadhwa R. Stable and nondisruptive in vitro/in vivo labeling of mesenchymal stem cells by internalizing quantum dots. Human Gene Therapy, 査読あり, 20(3), 2009 217-224 (DOIなし)

〔学会発表〕(計7件)

① T.Uemura T. Yoshioka, M. Nishi, S. Kaul, R. Wadhwa, H. Mishima Cartilage Regeneration from Mesenchymal Stem Cells by RWV Bioreactor and Tracking of Quantum-Dot Labeled Cell Aggregates Transplanted into Osteochondral Defects of Rabbits. SIB2011 Satellite Symposium in Kyoto, The Symposium on Micro/Nano Aspects of Biomaterials 平成23年7月19日、京都テルサ(京都府)

② Toshimasa Uemura, Masanori Nishi, Tomokazu Yoshikoka, Hajime Mishima, Kaul Sunil, Renu Wadhwa, Long Term in vitro/in vivo Labeling of Mesenchymal Stem Cells by Internalizing Quantum Dots Using Mortalin Antibody -Its Application to Cartilage Regeneration and Risk Assessment I C B S (International Conference on Biomaterials Science 2011) 平成23年3月14日、つくば

③ 西正統, 吉岡友和, Renu Wadhwa 植村寿公、量子ドットの間葉系幹細胞への高効率導入法と再生医療への応用 -第二稿 軟骨再生とリスク評価- ナノバイオメディカル学会第3回大会、平成22年9月17日鶴見大学

〔図書〕(計1件)

① Toshimasa Uemura, Masanori Nishi, Kaul Sunil, Renu Wadhwa, Cell internalizing anti-mortalin antibody for bio-imaging - in Mortalin Biology- Stress, Life and Death, Springer, pp295-306,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植村 寿公 (UEMURA TOSHIMASA)
独立行政法人産業技術総合研究所
ナノシステム研究部門・主任研究員
研究者番号：60176641

(2) 研究分担者

Wadhwa Renu (WADHWA RENU)
独立行政法人産業技術総合研究所
バイオメディカル研究部門・研究グループ長
研究者番号：30371090