

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293413

研究課題名(和文)成熟脂肪細胞のDirect Reprogrammingによる骨再生システムの開発

研究課題名(英文)Bone engineering with gene activated-matrix and non-cultured adipose cells

研究代表者

朝比奈 泉 (ASAHINA, Izumi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：30221039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、生体内でダイレクトリプログラミングや骨芽細胞分化に有効な遺伝子を搭載した遺伝子活性化基質(GAM)によって、非培養脂肪細胞を生体内で骨芽細胞へ直接分化転換させる新規骨再生法を開発することにある。実験は、まず非培養脂肪細胞の骨再生に対する有効性評価と、局所で骨再生を誘導するGAM開発の二つを検討した。その結果、非培養脂肪細胞は、骨芽細胞分化刺激因子の存在下で骨再生の有用なツールになり得ること、そして、骨芽細胞分化に関わるRunx2や機能性miRNAによるGAMの骨再生に対する有効性が示唆された。現在、非培養脂肪細胞-GAM複合体による骨再生の有効性を評価しているところである。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic method for in vivo stem cell or gene delivery has not been established on bone engineering though its potential usefulness has been suggested. As experiments, firstly, direct implantation of freshly isolated adipose cells (ADC) with low-dose rhBMP2 to the mouse cranium were performed to assess the potential usefulness of non-cultured (NC) ADC for bone engineering. Then, we have made a try at developing an atelocollagen-based GAM containing naked-plasmid (p) DNAs encoding Runx2 or miR20a. As results, when NC-ADCs were transplanted to mice, remarkable augmented bone-area were observed at 2 weeks of transplantation. Then, when GAMs were manufactured by mixing pDNAs with atelocollagen and -TCP granules, the newly formed bones surrounded by Osteocalcin-stained area were clearly observed in GAMs containing pRunx2 or pmiR20a on the mouse cranium. We are currently carrying out the additional experiments for clarifying the usefulness of GAM combined with NC-ADCs.

研究分野：口腔外科学・再生医学

キーワード：骨再生 分化転換 脂肪細胞

## 1. 研究開始当初の背景

顎骨欠損の再生は重要な課題であるが、現在のところ外科的侵襲を要し、採取量に限界がある新鮮自家骨移植に代わる確実で有効な方法は無い。われわれは、従来から人工代用骨に骨誘導能を付与するため、BMP を応用した Tissue Engineering による骨再生を試みてきた。その結果、老齢な高等動物の大きな骨欠損を確実に再生するには、成長因子 (BMP) 単独の移植のみでなく、それに応答する細胞の添加が有効であることを明らかにした。その後、我々は自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞を用いた歯槽骨再生の第 Ⅲ 相臨床研究を行ない、一定の成果を得ることができた。しかしながら、その一方で培養細胞の増殖・分化能に個体差が大きく、培養操作には多大な労力と経費を要するという問題が明らかになった。さらに、我々は初代培養 MSC が高い可塑性を有するものの、移植に必要な細胞数を確保するために培養を続けると、急速に可塑性を失うことも見出した。そのため、我々は、骨再生に必要な十分量の細胞を組織から採取し、培養操作を加えることなく移植することで、容易で確実に骨組織を誘導する方法を検討する必要があるとの結論に至った。

現在、再生医学分野で大きな期待が寄せられている人工多能性幹細胞 (iPSC) は、初期化に関わる分子メカニズムが完全には理解されておらず、初期化とその後の分化誘導への行程の複雑さと、未分化性による腫瘍化の危険性により、現段階ではそれを生体内で制御することは困難である。しかしながら、iPSC の創出は、既に終末分化状態にある成体細胞も必要な環境を整えば、高い可塑性を持つ細胞への初期化が可能であることを示している。一方で、近年細胞の周辺環境や遺伝子発現に人為的な操作を加えることで、分化状態を強制的に変換して全く別の性質を持った細胞を生み出せることが明らかになった。この現象は Direct Reprogramming と呼ばれ、主に線維芽細胞にターゲットとする細胞の運命決定因子と言える転写因子群を組み込むことで、心筋細胞や肝細胞、さらには神経系や血液系の細胞などに直接分化転換させることが可能になっている。未分化状態への初期化を経ず、目的の細胞を直接作製する Direct Reprogramming の手法は、iPSC の抱える問題を解消できる。そこで、我々はこの手法によって分化した成体細胞を直接生体内で骨芽細胞へ転換させることで、非培養細胞を用いた骨組織の再生が実現すると考えた。

上記の結論と仮説から、移植に必要な十分な組織細胞を確保し、その細胞から *in vivo* Direct Reprogramming もしくは直接骨芽細胞分化を誘導する生体基質を開発することの 2

点を目的に、本研究を行うこととした。

### (1) 非培養細胞 :

我々は、これまで骨髄をはじめ様々な組織由来の MSC を用いて、顎骨欠損に対する骨組織の再生に取り組んできた。脂肪組織由来 MSC についても、BMP2 存在下での培養により、効果的に異所性骨組織を誘導することを見出している。そこで、我々は酵素処理後の遠心操作において、大量に得られる非培養脂肪細胞に着目した。つまり、Direct Reprogramming や骨芽細胞への分化誘導因子の導入を応用することで、非培養脂肪細胞を骨芽細胞へ直接分化転換できれば、培養を要せずに移植に用いる十分な細胞を得ることができる。

### (2) 骨芽細胞への分化転換誘導基質 :

近年 *micro(mi)*RNA を用いた多能性細胞の作製に関する報告が相次いでいる。例えば、ヒト脂肪組織由来の MSC から iPSC を誘導するのに、従来の初期化因子 (*oct4*, *sox2*, *c-myc*, *klf4*) と比較して、*oct4* や *sox2* をターゲットとする *miRNA302s* や *200c*, *369s* を使用すると、短期間に 100 倍以上の効率で初期化を達成できることが知られている。又、上記の初期化因子と軟骨形成の転写因子 *sox9* を導入することで、線維芽細胞が軟骨様の細胞へ分化転換されることも示されている。一方で、研究協力者である東京医科歯科大学の春日井昇平教授らは、*bmp2* 遺伝子を組み込んだプラスミドベクターとリン酸カルシウムをコーゲン溶液に溶解し、凍結乾燥して作製した遺伝子活性化基質を骨欠損部へ移植することで、効率は十分ではないものの、骨再生が可能であることを示している。これらの事実から、初期化や骨芽細胞分化に関わる転写因子や *miRNA* 群を GAM に組み込むことで、遺伝子導入効率に優れ、成熟脂肪細胞から骨芽細胞へ分化転換を誘導する基質が作製できると考えられる。*miRNA* の生体への応用については、近年、それを生体内にデリバリーする遺伝子・核酸医薬による治療法の開発が癌研究の分野などで進展している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、生体内で Direct Reprogramming や骨芽細胞分化に有効な遺伝子群を搭載した遺伝子活性化基質 (gene-activated matrix; GAM) によって、移植した非培養脂肪細胞を生体内で骨芽細胞へ直接分化転換させることで、容易で確実な骨組織再生法を開発することにある。即ち、採取した脂肪組織から *on site* で単離した細胞を、培養を介さず、その初期化や骨芽細胞分化を誘導する遺伝子群を組み込んだ基質と一体化して骨欠損部へ移植することで、顎骨の再生

を図る。豊富な間葉系幹細胞 (MSC) 源として知られる脂肪組織だが、組織中に多量に存在し、余剰とされる細胞群をも骨再生へ参加させることで、非培養細胞を使用する効果的な骨組織の再生の方法を検討することとした。

### 3. 研究の方法

研究は、最初に 非培養脂肪細胞による骨再生、および 移植局所で骨再生を誘導し得る有効な遺伝子搭載基質 (GAM) の開発の二つについて検討を行い、その上で 非培養脂肪細胞と GAM を組み合わせた移植体による骨再生の有効性を評価することとした。実験内容の詳細は下記の通りである。

#### (1) 非培養脂肪細胞の分離：

脂肪由来 MSC の分離と同様に、Hedrick らの方法を基本として、ヒト類脂肪体より脂肪体を無菌的に採取し、細切した脂肪組織をコラゲナーゼで酵素処理することで細胞を単離する。次いで 100 $\mu$  メッシュフィルターを用いて余分な組織を除去した後、遠心操作によって細胞の分離を行なう。遠心操作後の沈殿細胞塊は、血球や血管内皮などを含む heterogeneous な SVF であり、骨髄と比較して豊富に MSC が存在する。

SVF 細胞群； SVF に関しては、細胞を洗浄後、溶血試薬に浮遊させることで、赤血球を除去し、再度洗浄したものを実験に使用する。この分画には MSC を含む間質系細胞が多く存在する。

細胞の特性解析：上記条件下で採取した SVF 細胞群の特性を、表面抗原の発現について従来の報告と比較して評価する。さらに、細胞群の MSC の含有率について評価する。これらの細胞表面抗原を、Flow cytometry を用いて詳細に解析を行なう。

#### (2) マウス頭蓋骨増生モデルへの移植：

実験は、まず非培養脂肪細胞のデリバリー効果を評価するのに用いる動物モデルの作出から開始した。即ち、ADC と rhBMP2 のヌードマウス (8 週齢) 頭蓋骨上 (骨膜下) への移植において、骨形成を誘導できる BMP2 の臨界濃度の検討を行った。実験は、移植後 2,4 週で骨形成を十分に認める通常濃度の 1/10 量の BMP2 から検討を行った。

低濃度 BMP2 と ADC による移植試料を移植することで実際に骨形成が促進されるかを検討した。移植試料は、低濃度 BMP2 を吸着させた  $\beta$ TCP 顆粒と ADC を播種して作製し、マウス頭蓋骨上に移植を行った。移植した試料は、移植後 2, 4 週で採取し、組織学的に

観察を行った。

移植群； 非培養脂肪細胞のみ、培養脂肪 MSC のみ、低濃度 BMP2 のみ、非培養脂肪細胞 + 低濃度 BMP2、培養脂肪 MSC + 低濃度 BMP2、 $\beta$ TCP 顆粒のみの 6 群に分けて移植を実施する。

#### (3) GAM 導入遺伝子の選定：

候補となる遺伝子は、骨芽細胞分化と初期化に関わる下記の転写因子群や *miRNA* 群とし、これらが奏功しない場合は適宜有用と考えられる因子を追加する。

骨芽細胞分化に関わる転写因子； MSC は、*Runx2* と *Osterix* という 2 つの転写因子によって骨芽細胞へと分化し、同時に脂肪細胞や軟骨細胞系列への分化能は失われる。*Osterix* は *Runx2* の下流にあり、*Runx2* によって誘導された前骨芽細胞を未熟な骨芽細胞へ分化促進すると考えられているので、これら 2 因子を中心に選定する。

脂肪細胞の骨芽細胞分化に関わる *miRNA*； *miR20a* は、*PPAR $\gamma$*  や *Bambi*、*Crim1* などの脂肪分化に関わる因子の発現を抑制し、*Runx2* や *Osterix* など骨芽細胞分化に関わる因子の発現を刺激することが報告されている。さらに、*miR196a* が、*Smad1* のリプレッサーである *HOXC8* をターゲットとすることで、脂肪由来 MSC の骨芽細胞分化を促進することが報告されている。

初期化に関わる *miRNA*； iPSC を誘導する従来の初期化因子である *Oct4* や *Sox2* をターゲットとする *miR302s* や *miR200c*、*miR369* も候補とする。これらを使用すると、ヒトやマウスの脂肪由来 MSC から従来の初期化因子と比較して、短期で高率に iPSC を誘導出来ることが知られている。

#### (4) GAM 作製とラット頭蓋骨欠損モデルへの移植：

プラスミドベクターとリン酸カルシウムをコラーゲン溶液に混和し、凍結乾燥することを基質作製の基本とする。コラーゲンについては、*miRNA* を組み込むために、アテロコラーゲンを用いる。*miRNA* は、*in vitro* においては非常に高い活性が得られるが、*in vivo* では、生体内での安定性が低く、十分な活性を得ることが難しい。アテロコラーゲンは、低抗原性と高い生体親和性を持ち、アンチセンス DNA や *siRNA* の全身投与による薬効増強のキャリアーとなることが示されており、*miRNA* の効果を増強するデリバリー技術に寄与する。また、リン酸カルシウムは DNA 吸着と細胞貪食による遺伝子の効率的な取

り込みを目的に添加する

Bioassay ; 選定遺伝子群を組み込んだ GAM に、臍帯 MSCs や皮膚線維芽細胞を組み込み、野生型マウスの皮下に移植を行なう。2週間前後で移植試料を摘出し、共焦点レーザー顕微鏡を使用して、移植標本全層にわたり GFP の蛍光発色を観察する。又、標本から塩酸グアニジンを用いて GFP を含む蛋白質を抽出し、蛍光分光光度計により遺伝子導入効率を定量的に評価する。この実験により、GAM 作製の最適化を図る。頭蓋骨欠損モデルへの移植 ; 野生型ラット(6-7週齢)の頭蓋に作製した defect (径 9mm) に対して移植を行ない、骨組織形成能を評価する。試料を 4, 8 週にて回収し、組織学・免疫組織学的に骨形成を評価する。移植細胞の生体内での骨芽細胞への分化転換は、GFP の抗体染色により観察できる。

(5) 非培養脂肪細胞を播種した GAM の作製 :

最終的に、上記の実験により最適化された条件で作製された GAM に、非培養脂肪細胞を播種した試料の骨再生に対する有効性を *in vivo* にて評価する。移植は、細胞を播種した GAM をマウス頭蓋骨増生モデルにて移植し、*in vivo* Direct Reprogramming もしくは骨芽細胞への直接分化誘導の有効性を評価する。

#### 4. 研究成果

(1) 非培養脂肪細胞の骨再生に対する有効性の評価 :

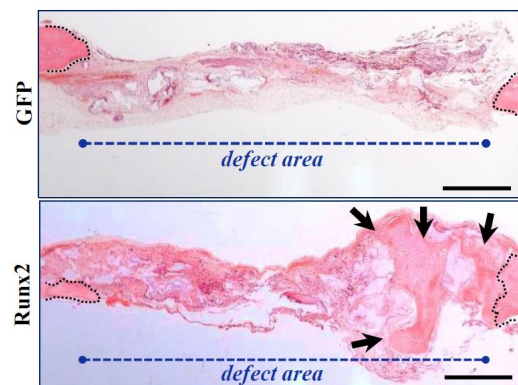
低用量 (通常用量のほぼ半量) rhBMP2 (BMP2) を  $\beta$ -TCP 顆粒に吸着させた試料をヌードマウス頭蓋骨上に移植した時に、移植後 2 週の段階で組織学的に骨形成の促進を認めた。さらに、移植後 4 週までに十分な骨形成が観察された。それ以下の用量の BMP2 を吸着させた場合、移植後 2 週では骨形成が認められず、それ以上では移植後 2 週で骨形成を十分に認めるようになった。そのため、通常用量の半量程度を臨界濃度と考え、以降の評価に応用することとした。

次に、ヒト類脂肪体から単離した非培養脂肪細胞 ( $3 \times 10^6$  個) を、低用量の BMP2 を予め吸着させた  $\beta$ -TCP 顆粒 (20mg) に播種し、ヌードマウス頭蓋骨上に移植を行なった。低用量 BMP2 を吸着させた TCP 顆粒に非培養脂肪細胞を播種した試料では、対照群の試料と比較して移植 2, 4 週後で新生骨量の増加を認めた。また新生骨形成部位に移植細胞が散在しているのが観察された。この結果により、非培養脂肪細胞は、有用な骨芽細胞分化刺激

因子が存在すれば、骨再生の有用なツールになり得ることが示唆された。

(2) 骨再生に有効な GAM の開発 :

GAM に搭載する plasmid DNA として、Runx2 を選定した。ベクターには plasmid IRES-AcGFP を用い、これを対照 (pGFP) として使用すると共に、それぞれの DNA を組み込み発現ベクターとした (pRunx2)。作製したベクターは細胞内活性を確認するため、*in vitro* で  $5 \times 10^5$  個の MC3T3 に 0.02mg のベクターを導入し骨分化マーカーである ALP の活性測定を行った。GAM は 0.02, 0.1, 1mg の plasmid DNA と 100 $\mu$ l の 2% bovine-atelocollagen 及び 20mg の  $\beta$ -TCP 顆粒を混和後、凍結乾燥して作製した。この GAM を 6-7 週齢の F344 ラットの 9mm の頭蓋骨骨欠損部に移植した。移植した試料は、術後 2 週で遺伝子導入を確認するため GFP 発現を観察し、術後 4, 8 週で新生骨形成の状態を組織学的・免疫組織学的に評価した。その結果、*in vitro* では導入後 1 日で GFP 発現を確認し、導入後 4, 7 日で Runx2 群が GFP 群と比較して有意に高い ALP 活性を示した。移植後 2 週で共焦点顕微鏡にて 1mg の plasmid DNA を含んだ GAM でのみ GFP の発現が確認され、少量の群では確認できなかった。移植後 4 週で GFP 群と比較して 1mg の plasmid DNA を含んだ Runx2 群では 3 倍の新生骨が認められた。移植後 8 週で新生骨量は GFP 群では変化がないものの、実験群では増加し、GFP 群と比較して 4-5 倍であった。抗オステオカルシン免疫染色では実験群の新生骨周囲に明らかな発現を認めた。



移植後 8 週における骨欠損部での GAM による新生骨形成

次に、MSC の脂肪分化抑制や骨形成性遺伝子発現制御の機能が示唆される miR20a に着目し、骨髄 MSC への導入による骨芽細胞分化の影響を明らかにすると共に、miR20a 搭載 GAM による骨再生の有効性を検討した。ラット脂肪 MSC の培養中に miR20a を過剰発現させ、骨芽細胞分化に関する特性変化を解析した。次に、2% atelocollagen と  $\beta$ -TCP 顆粒に miR20a-EGFP pDNA (pmiR20a) を搭載した

GAMについて、ラット頭蓋骨移植後の新生骨形成能の評価を行なった。コントロールに *pEGFP* 及び *pBMP4* 搭載 GAM を用い、移植試料について組織学・免疫組織学的に解析を行なった。その結果、*miR20a* を導入した培養脂肪 MSC の骨芽細胞分化は亢進し、*pmiR20a* 搭載 GAM による移植でも移植後8週までに有意な骨形成を認めた。

以上の結果から、MSC の骨芽細胞分化に関わる転写因子 *Runx2*、および機能性 *miRNA* による骨誘導型 GAM の骨再生に対する有効性が示唆された。

現在、MSC の初期化に関わる *miR302s* や *miR200c*、*miR369* などを候補として、これらを *Runx2* や *miR20a* などと共に脂肪細胞に導入することで骨芽細胞分化への分化転換の効率化が図れるか検討を行っているところである。さらに、*pRunx2* や *pmiR20a* 搭載 GAM に非培養脂肪細胞を組み合わせて作製した移植体に関して、骨再生の促進効果を評価しているところで、一部有効性について知見を得ている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Umebayashi M, Sumita Y<sup>\*</sup>, Kawai Y, Watanabe S, Asahina I, Gene activated-matrix with atelocollagen/tricalcium-phosphate and plasmid DNA encoding BMP4 or Runx2 promotes rat calvarial bone augmentation. *Biores Open Access*. 査読有 1;4(1), 2015, 164-174

[学会発表](計3件)

Umebayashi M, Sumita Y, Asahina I, Successful bone augmentation by the graft of plasmid DNA, BMP4 or RUNX2, embedded in atelocollagen. ICOMS, 2015年10月28日, メルボルン(オーストラリア)

Umebayashi, Y Sumita, I Asahina I, Bone augmentation by gene activated matrix composed of plasmid DNA, BMP4 or Runx2 embedded in atelocollagen, 2016年5月20日, 10th World Biomatelial Congress, モントリオール(カナダ)

Egashira K, Sumita Y, I T, Shiraishi T, Asahina I, Non-cultured adipose-derived cells promote the bone augmentation induced by low-dose BMP-2:10th World Biomatelial Congress, 2016年5月20日, 10th World Biomatelial Congress, モントリオール(カナダ)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝比奈 泉 (ASAHINA, Izumi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授  
研究者番号: 30221039

(2) 研究分担者

住田 吉慶 (SUMITA, Yoshinori)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授  
研究者番号: 50456654

小守 壽文 (KOMORI, Toshihisa)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授  
研究者番号: 00252677

西村 正宏 (NISHIMURA, Masahiro)  
鹿児島大学・歯学部・教授  
研究者番号: 00294570