

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462272

研究課題名(和文)ダイレクト・リプログラミング法で作成した骨芽細胞移植による骨癒合促進方法の開発

研究課題名(英文)Development of bone healing by direct converted osteoblast like cells

研究代表者

谷口 大吾 (Taniguchi, Daigo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：00642092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨折整復術や骨移植術後の早期骨癒合は廃用を最小限にするために重要である。ダイレクトリプログラミング法は幹細胞を介さずに、低コストで、さらに自家組織から短期間に多くの目的細胞作製が可能であり、我々はこの手法をもちいた線維芽細胞からの骨芽細胞様細胞作成方法と、その投与方法についての研究を行った。

作製した骨芽細胞様細胞は遺伝子・蛋白レベルで発現を認め、骨基質を産生した。また生着率の改善のためケモカイン受容体遺伝子を導入しても、誘導効率の有意な低下はなかった。

研究成果の概要(英文)：Early bone fusion after fracture reduction and bone graft surgery is important to minimize disuse syndrome. Direct reprogramming is capable of producing many target cells in a short period of time from autogenous tissue at low cost without going through stem cells. And we have developed osteoblast like cells from fibroblasts using this technique and their administration methods were studied.

The osteoblast-like cells were expressed at the gene and protein level, and bone matrix was produced. Also, even if chemokine receptor gene was introduced to improve the survival rate, there was no significant decrease in induction efficiency.

研究分野：整形外科・再生医療

キーワード：再生医療 骨芽細胞 ダイレクト・リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会にあたり健康寿命は重要であり、健康であるためには運動器の機能が良好である必要がある。運動器疾患の中でも高齢者に好発する骨粗鬆症をベースとした脊椎の圧迫骨折（最近 10 年間の椎体骨折の累積発生率は 60 歳代男性 5.1%，女性 14% / 70 歳代男性 10.8%，女性 22.2%；2015 年骨粗鬆症ガイドライン）や大腿骨近位部骨折（2007 年において計 148100 人（男性 31300 人 / 女性 116800 人）；2015 年骨粗鬆症ガイドライン）などは長期の臥床のため運動器の機能を引き起こし、ADL および QOL を低下させるため、重要な課題である。

高齢者では骨吸収が亢進しており、骨折予防の骨粗鬆症治療薬として骨吸収阻害薬が最も使用されているが、骨質の変化に伴う非定型骨折、顎骨壊死など解決すべき問題を有する。また、高齢者では骨形成も低下しているため、骨形成を促進する PTH 製剤も骨粗鬆症の治療に使用されているが、発癌性の問題もあり投与期間が限定されている。

一方、骨折治療では骨癒合まで骨折部の安静が必要であり、その間の筋力などの運動機能低下や、偽関節の問題があるため、より早期に強力に骨癒合を得られる治療を開発することは健康寿命に寄与すると考える。このため、強力な骨癒合促進効果のある治療方法の開発が必要である。

近年、iPS 細胞を用いた再生医療が盛んに研究されている。しかし、一度細胞を初期化するため時間がかかり、癌化のリスクが問題である。

そこで我々はダイレクト・リプログラミング法を用いた骨再生医療のデータ蓄積を行うこととした。この方法は低コスト・短時間で多量の細胞作成が可能であり、また採取が容易な皮膚などの自家組織の細胞を使用するため安全な方法であると考えている。

2. 研究の目的

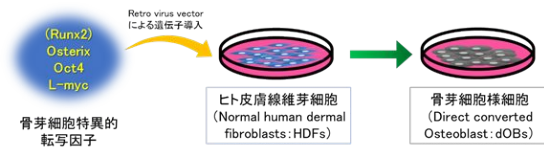
本研究の目的は、ヒトの皮膚線維芽細胞から骨基質産生可能な細胞の作製方法について検討をすること、骨芽細胞様細胞の骨基質産生能を *in vitro* および *in vivo* で検討することである。

3. 研究の方法

細胞はヒト皮膚線維芽細胞を用いて平板培養を行った。

目的細胞への誘導には、レトロウイルス・ベクターを使用して遺伝子導入を行った。まず、pMX puro ベクターに、Osterix, Oct-4、L-myc といった骨芽細胞誘導遺伝子を組み込み、Plat GP パッケージ細胞に導入した。この細胞にレトロウイルスを導入し、産生されたレトロウイルス・ベクターをヒト皮膚線維芽細胞にトランスフェクションさせた。

その後、培地を β -Glycerophosphate、アスコルビン酸等を含む骨誘導培地に交換し培養した。



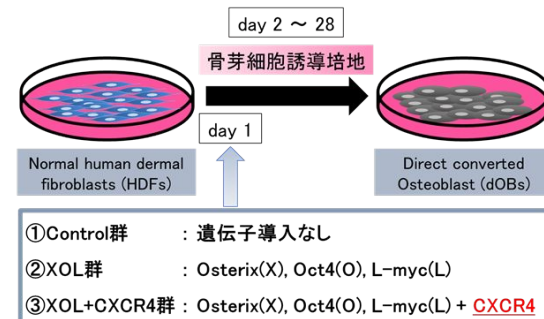
骨芽細胞誘導培地に交換した後、培養した細胞を以下のように評価した。

骨形成能の評価は、光学顕微鏡を用いて細胞の形態を評価した。

組織評価は、Alizarin Red 染色・von Kossa 染色で骨基質の産生を評価した。

骨芽細胞の性質の評価は、RT-PCR 法により骨芽細胞に特異的な遺伝子の発現を比較検討した。

さらに、本研究では低侵襲的に骨芽細胞様細胞を用いた骨の治療を行う方法として、ケモカイン受容体遺伝子を追加で導入した。作製した細胞の骨基質産生能に加え遊走能を *in vitro assay* で評価した。



(ケモカイン受容体発現および遊走能の評価)

- CXCR4 の遺伝子発現
Real time RT-PCR (4 weeks)
- CXCR4 のタンパク発現
Flow cytometry, Immunostaining (day3)
- CXCR4 発現細胞の遊走能
Cell migration assay (day5)

(骨芽細胞としての性質評価)

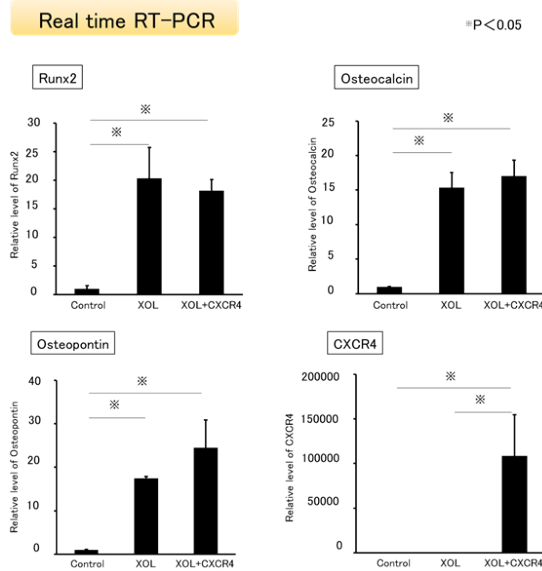
- Runx2, Osteocalcin, Osteopontin の遺伝子発現
Real time RT-PCR (4 weeks)
- 骨基質形成
Alizarin Red S 染色 (4 weeks)

4. 研究成果

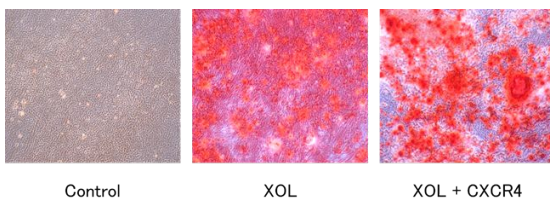
ダイレクト・リプログラミング法で骨芽細胞様細胞を作成することに成功した。また、作製した細胞にケモカイン受容体遺伝子を追加で導入しても骨基質産生能に有意差はなく、*in vitro* assayにて遊走能を有することを確認した。

Real time RT-PCR では、Control 群と比較して XOL 群および XOL+CXCR4 群では Runx2、Osteocalcin、Osteopontin の遺伝子発現は有意に上昇した。

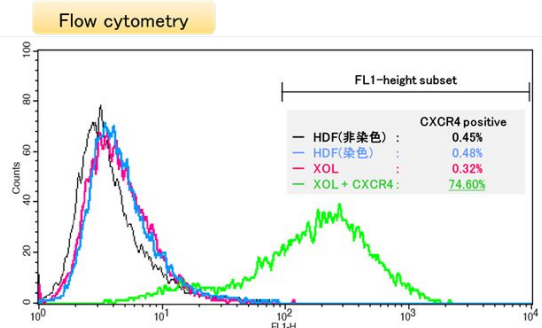
また、他の 2 群と比較して、XOL+CXCR4 群で CXCR4 の遺伝子発現は有意に上昇していた。



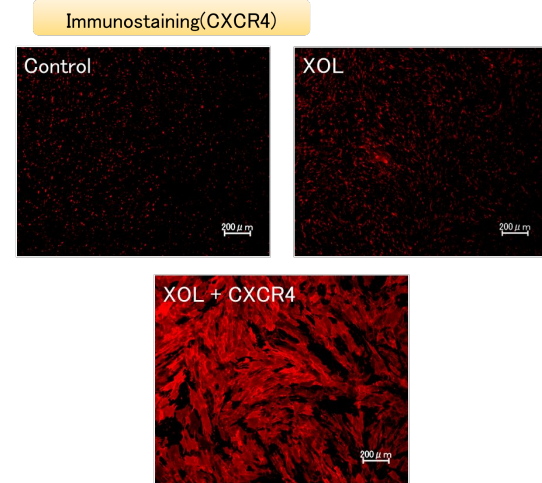
アリザリンレッド染色においては、XOL 群と XOL+CXCR4 群で骨基質産生を認めた。



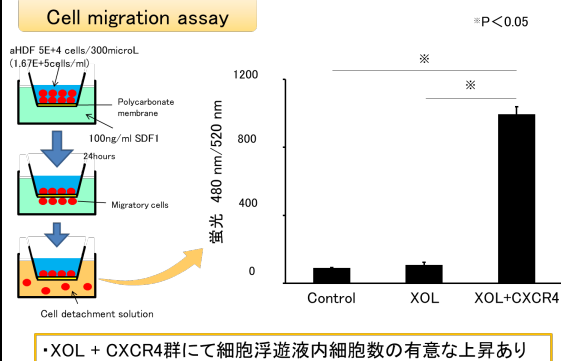
フローサイトメトリーでは XOL + CXCR4 群で CXCR4 陽性細胞は増加していた。



免疫染色においても、XOL + CXCR4 群で CXCR4 蛋白が染色された。



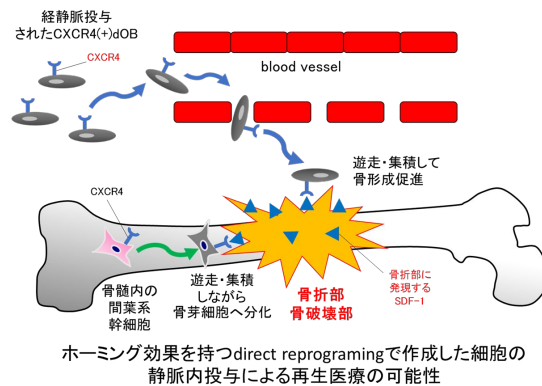
Transwell assay では他の 2 群と比較して、XOL + CXCR4 群で細胞浮遊液内に移行した細胞数は有意に上昇していた。



・XOL + CXCR4群にて細胞浮遊液内細胞数の有意な上昇あり

以上より、ホーミング効果を持つ direct reprogramming で作成した細胞においても、静脈内投与による再生医療に利用できる可能性があると考えられる。

今後は *in vivo* 実験で局所へのホーミング効果・骨形成能を評価し、さらに間葉系幹細胞の骨形成能との比較を行うことを検討している。



ホーミング効果を持つdirect reprogrammingで作成した細胞の静脈内投与による再生医療の可能性

・*in vivo*でのホーミング効果・骨形成能の評価
・間葉系幹細胞の骨形成能との比較

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

○小原 将人, 谷口 大吾, 藤原 浩芳, 小田 良, 岸田 綱郎, 松田 修, 久保 俊一
・ダイレクト・リプログラミング法を用いた遊走能を有する骨芽細胞様細胞の開発
・第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2017年)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷口 大吾 (Daigo Taniguchi)
(京都府立医科大学大学院・運動器機能再生外科学・客員講師)
研究者番号: 00642092

(2)研究分担者

白井 寿治 (Toshiharu Shirai)
(京都府立医科大学大学院・運動器機能再生外科学・准教授)
研究者番号: 20397186

小田 良 (Ryo Oda)
(京都府立医科大学大学院・運動器機能再生外科学・講師)
研究者番号: 80516469

藤原 浩芳 (Hiroyoshi Fujiwara)
(京都府立医科大学大学院・運動器機能再生外科学・准教授)
研究者番号: 90381962

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし