

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 18 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850213

研究課題名(和文)ウマを用いた直接転換法による迅速な骨の再生医療の新規基盤技術の確立

研究課題名(英文)Pilot research of rapid bone regeneration by direct reprogramming in horses.

## 研究代表者

石原 章和 (Ishihara, Akikazu)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：80707224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、馬の真皮組織から抽出した皮膚線維芽細胞群より、分化能の高い前駆細胞をフローサイトメトリーおよび三種類の抗体を用いて選別することに成功した。これらの細胞を、骨分化用培地およびBMPの蛋白を添加した培地を用いて培養したところ、無選別の細胞と比較して、骨形成に関わる遺伝子が有意に活性化しており、またVon Kossa染色で視認されたミネラル小瘤の数も有意に多かった。これらの結果から、分化能の高い皮膚細胞を選別して、BMP蛋白と一緒に局所投与することで、迅速な骨の再生医療が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, dermal fibroblasts with greater differentiation capacities were successfully isolated by flowcytometry technique and three antibodies. When these selected cells were cultured with osteogenic medium and BMP-containing medium, significantly higher expression of osteogenic genes and greater numbers of mineralized nodules by Von-Kossa staining were demonstrated compared to the unselected cells. These results indicate that rapid bone regeneration can be achieved by selecting skin cells with high differentiation capacities and locally administering these cells with BMP proteins.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 骨治癒 皮膚線維芽細胞 ウマ

### 1. 研究開始当初の背景

近年、iPS細胞による再生医療の応用が研究されているが、iPS細胞の作製には長期間を要し、腫瘍形成の危険を伴うという障壁がある。しかし、骨組織の再生においては、骨芽細胞と線維芽細胞が生物学的に類似していることから、BMP (Bone morphogenetic protein) の遺伝子の単独導入によって、皮膚の線維芽細胞を骨形成細胞へと直接的に誘導させることができる。このような、直接転換法 (ダイレクト・リプログラミング) は、iPS細胞を介さず臓器再生を行う次世代の再生医療技術であり、近い将来の臨床応用において、最も広く普及するとされている指針である。

現在でも、骨折した競走馬の多くは予後不良から安楽死となっており、抜本的な骨再生の技術の開発が急務である。また、高齢化社会が進むヒトにおいても、老人の骨折は難治性で癒合不全になりやすく、今後は、迅速かつ低コストで安全性の高い先端医療の臨床応用への期待は大きい。そして、骨腫瘍の切除や、重篤な外傷によって、断脚を要するほどの骨の欠損が生じた場合には、自己の皮膚細胞を使って迅速に骨再生できる利点は計り知れない。さらに、骨形成不全症などの先天性骨疾患に対しても、直接転換した自己の皮膚細胞の病原遺伝子を除去して、患者の骨内に戻す治療法が可能であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、ウマの皮膚から直接転換した骨形成細胞による、迅速な骨の再生医療の基盤技術確立することを目的とした。まず、ウマの皮膚組織から線維芽細胞を分離して、フローサイトメトリー法によって分化能を持つ細胞を選別する手法を確定する。次に、選別した皮膚線維芽細胞に対して、即時的にBMP2遺伝子を導入する条件を確定する。そして、治療箇所の組織から、投与した皮膚線維芽細胞を回収して、その性状変化および機能を、骨性遺伝子の解析、石灰化能測定、電子顕微鏡、生存能解析などで評価する。更に、二種類の骨折モデルを用いて、遺伝子導入された皮膚線維芽細胞を局所投与した後、X線検査、CTスキャン、物理的強度検査、組織学的検査、骨化速度の解析などを介して、骨再生を定量的に評価する。当初は、BMPの遺伝子を導入させた細胞の局所注射を予定していたが、組み換え遺伝子実験を馬という大動物を使って行うことが研究施設内において難しいことから、遺伝子導入を介さない手法を検討するため、BMPの蛋白を添加して培養した細胞における骨分化能を評価することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、麻布大学で飼養されている健全な8頭の馬 (サラブレッドまたはKWPN種、年齢: 3-19歳、体重: 420-530kg) を用

いて、パンチ生検によって皮膚全層の組織を採取した後、表皮組織を切除して、残った真皮組織をコラゲナーゼ分解して、皮膚線維芽細胞群を抽出した。

次に、抽出した細胞群を、特定表面抗原を標的とした蛍光標識抗体で処理して、これらの抗体に陽性の細胞をフローサイトメトリー法で選別した細胞集団を作成した。細胞の選別には、Aria-III FACS装置を用いた。これらの皮膚細胞の性状を相対的に評価するため、比較対象として骨髄由来の間葉系幹細胞、および、末梢血の単核球を用いた解析も実施した。

分化能の高い皮膚線維芽細胞を選別的に分離するため、まず馬の細胞の表面抗原に反応する抗体を検討した。陽性選別のための標的抗原は、CD34、CD45、CD73、CD90、CD105、CD130を候補して、陰性選別のための表面抗原はMHC-IおよびMHC-IIを候補とした。全ての抗体は、認識可能な三種類の蛍光標識 (FITC、APC、PE) のいずれかを有するものとし、二次抗体は使用しなかった。これらの抗体の反応性の評価としては、抗体処理していない細胞の蛍光陽性率 (細胞群全体における1e2基準蛍光レベル以上の細胞の割合) が1%以下となるバックグラウンド検出限界条件において、抗体処理した細胞の蛍光陽性率が5%を超えるものを、馬の細胞に有意に反応する抗体と見なした。また、十分な抗体の反応時間を確立するため、抗体処理時間は、30分間、60分間、120分間、480分間の条件で陽性率を比較した。馬の細胞に反応することが確認された抗体のうち、蛍光陽性率の最も高く、かつ、蛍光標識が重複しない三種類を、フローサイトメトリー法による細胞選別に用いる抗体として選択した。そして、抽出した細胞群をこれらの抗体で処理した後、まず、最も蛍光陽性率の高い抗体のみに陽性の細胞を必要細胞数だけソーティングしたものをシングル・セル・ソーティング群 (Single cell sorting: SCS群) とした。次に、最も蛍光陽性率の高い抗体、および、二番目に高い抗体の両方に陽性の細胞を必要細胞数だけソーティングしたものをダブル・セル・ソーティング群 (Double cell sorting: DCS群) とした。そして、三つの抗体の全てに陽性の細胞を必要細胞数だけソーティングしたものをトリプル・セル・ソーティング群 (Triple cell sorting: TCS群) とした。三種類の試験群 (SCS、DCS、TCS) との比較をおこなう対照群は、選別を行っていないノン・セル・ソーティング群 (None cell sorting: NCS群) とした。

上述のように、フローサイトメトリー法によって選別した試験群 (SCS、DCS、TCS) および対照群 (NCS) の細胞集団を、セル・ソーティングを実施した直後に、再度、フローサイトメトリー法で解析することで、抗体陽性細胞の含有率を評価した。評価項目は、三つの抗体における単独での陽性細胞の含有

率のほか、二つの抗体の両方に陽性の細胞の含有率および三つの抗体全てに陽性の細胞の含有率を算出した。

上述のように、フローサイトメトリー法によって選別した試験群 (SCS、DCS、TCS) および対照群 (NCS) の細胞集団における骨多分化能を評価するため、市販の骨分化用培地にて培養を行った。24-well プレートで培養後、PCR 解析によって Osteocalcin の遺伝子活性を算出し、対照は GAPDH、および骨分化能培地での培養前の細胞とした。また、Von-Kossa 染色後、各ウェル内の石灰化小瘤の数をカウントした。さらに、フローサイトメトリー法によって選別した試験群 (SCS、DCS、TCS) および対照群 (NCS) の細胞集団を、BMP2 蛋白を含んだ培地を用いて培養し、同様に PCR 解析と Von-Kossa 染色を実施した。

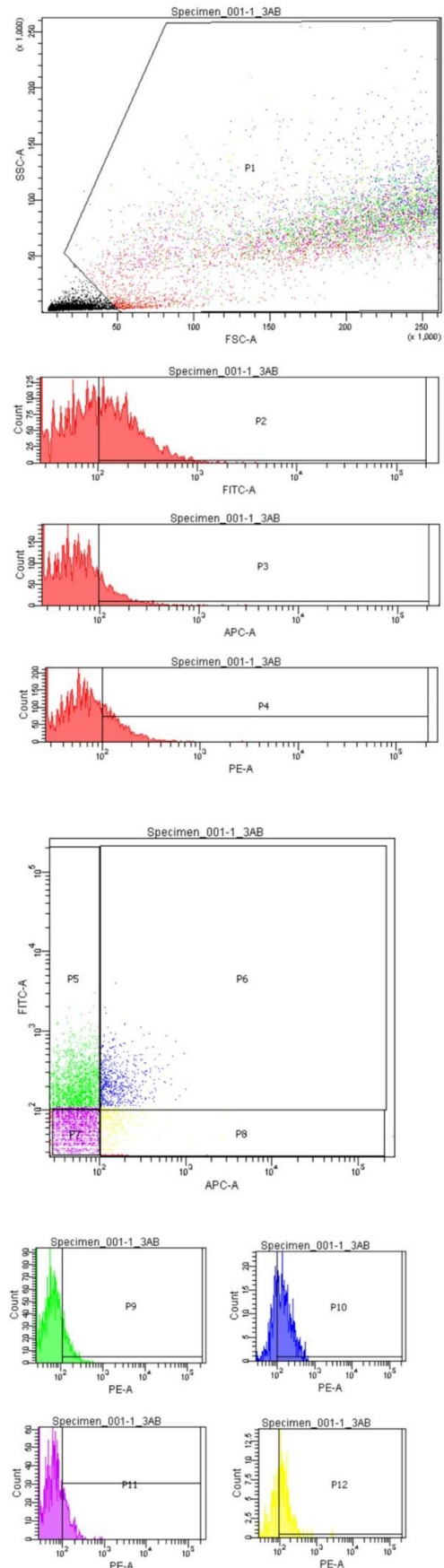
上記の全てのデータ解析は、市販のソフトウェア (Excel) による Student-T 検定を用いて実施した。有意レベルは全て  $P < 0.05$  とした。

#### 4. 研究成果

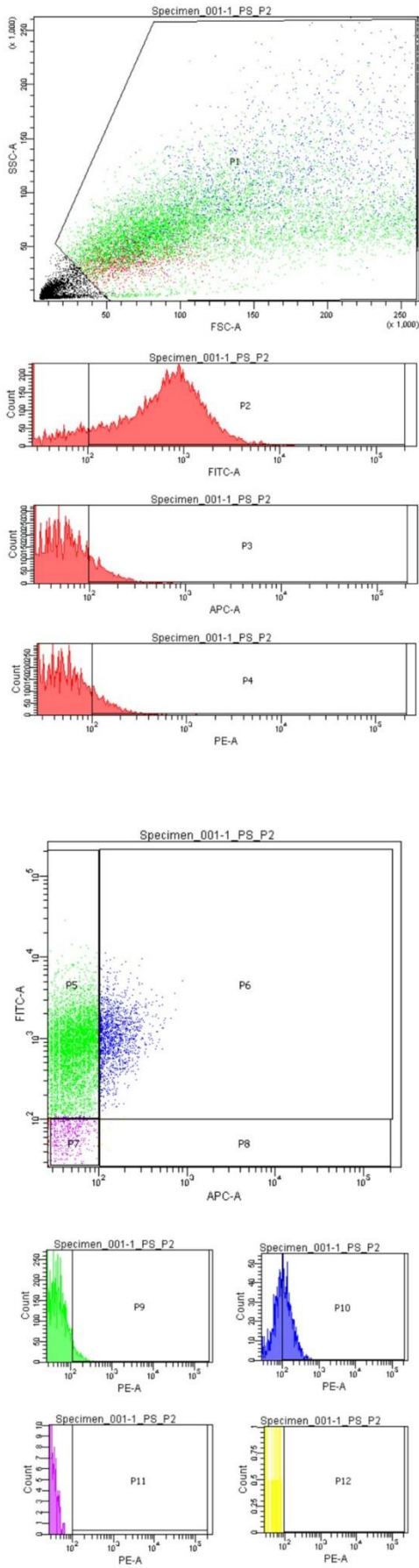
フローサイトメトリー法では、標識抗体として、三種類の抗体 (CD34、CD90、CD105) において良好な反応性を認め、陽性率は CD90、CD34、CD105 の順で高い値を示した。一方、他の陽性選別抗体 (CD45、CD73、CD130) は皮膚細胞への反応性が不十分であり、また、陰性選別抗体 (MHC-I および MHC-II) は末梢血の単核球への反応性が不十分であった。これらの結果から、間葉系幹細胞の選別には、CD90、CD34、CD105 の三種類の抗体を使用することとした。このうち、CD90 および CD34 単独でのセル・ソーティングでは、他の抗体に陽性を示す細胞が失われる傾向が認められた。また、CD90 単独でのセル・ソーティングを、最大3回まで実施した場合でも、陽性率の大幅な向上は無いにも関わらず、細胞絶対数と細胞生存率は低下する傾向が認められた。このため、複数の抗体を用いて一回のセル・ソーティングでの選別を試みるため、SCS 群は CD90 のみに陽性の細胞集団、DCS 群は CD90 と CD34 の両方に陽性の細胞集団、TCS 群は CD90、CD34、CD105 の三つとも陽性の細胞集団と定義した。

フローサイトメトリー法による抗体陽性細胞の選別では、選別速度を上げる (速度1 → 6) ことでセル・ソーティングに要する時間を短縮させて、細胞生存率を向上できることが示されたが、最大選別速度 (速度 = 11) に上げた場合には、セル・ソーティング時間の大幅な短縮は無いにも関わらず、選別効率の顕著な低下 (不純物の混入増加) が見られたことから、全てのセル・ソーティングにおいて、中程度の選別速度 (速度 = 6) を使用することとした。

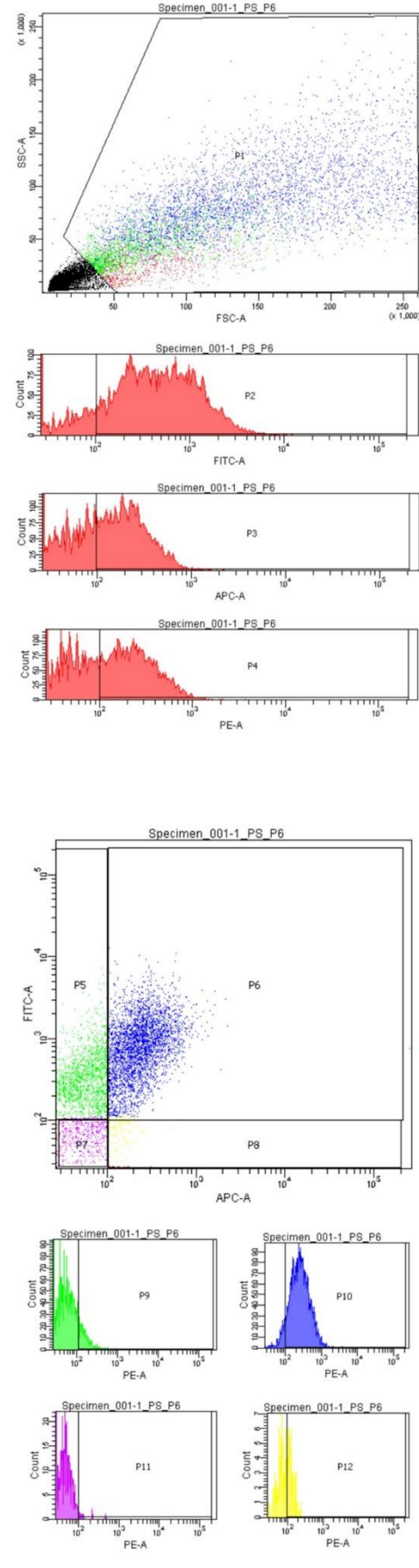
NCS 解析結果 (図1)



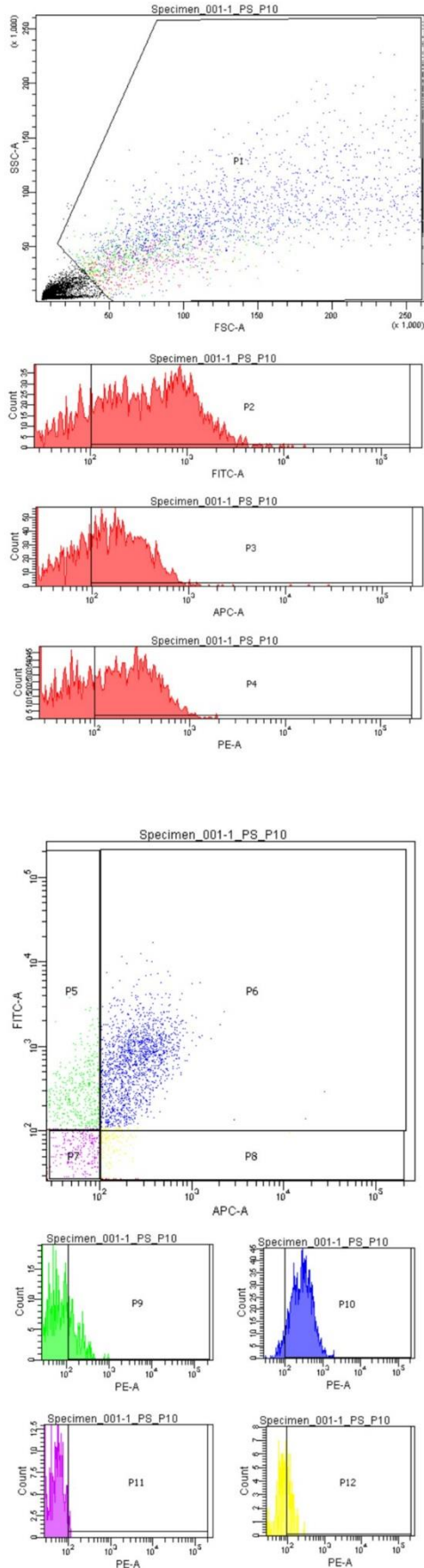
SCS 解析結果 (図 2)



DCS 解析結果 (図 3)



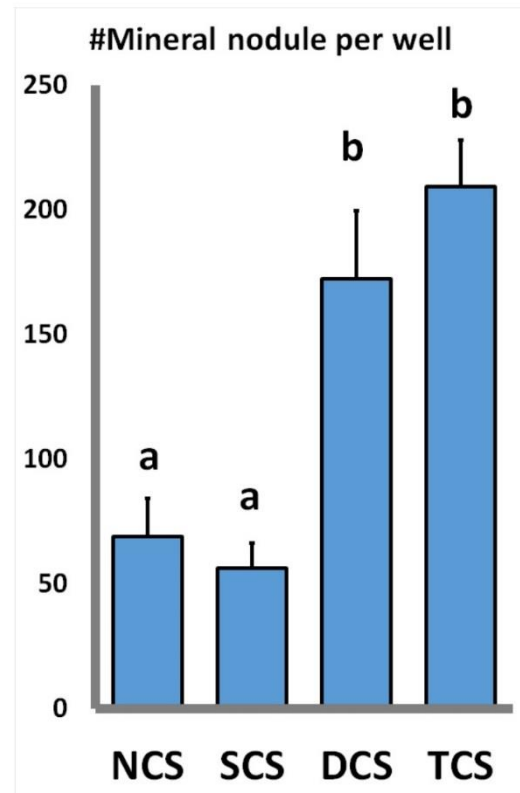
TCS 解析結果 (図 4)



フローサイトメトリー法によって選別した試験群 (SCS、DCS、TCS) では、対照群 (NCS) と比較して陽性細胞率の向上が認められた (図 1 ~ 4)。具体的には、三種類全ての抗体に陽性を示す細胞集団の割合および CD90 と CD34 の両方に陽性の細胞集団の割合は、対照群と比較して DCS 群および TCS 群にて有意な向上が認められた。

フローサイトメトリー法によって選別した試験群 (SCS、DCS、TCS) では、対照群 (NCS) と比較した場合、骨系分化能の有意な向上が認められた。これらは、市販の骨分化用培地、および、BMP 蛋白を含んだ培地においても、同様に結果を示した。PCR 解析においては、Osteocalcin の遺伝子活性が、対照群と比較して DCS 群および TCS 群において有意な上昇を示していた。また、Von-Kossa 染色においては、骨系分化能を示唆する石灰化小瘤数が、対照群と比較して DCS 群および TCS 群において有意な増加が認められた (図 5)。

Von-Kossa 染色解析結果 (図 5)



BMP含有培地における石灰化小瘤数:

NCS: ノンセルソーティング、SCS: シングルセルソーティング、DCS: ダブルセルソーティング、TCS: トリプルセルソーティング

a-b: 有意な増加 (P<0.05)

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 章和 (ISHIHARA, Akikazu)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：80707224

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし