

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861669

研究課題名(和文)軟骨細胞の分化可塑性を活用した新規骨再生法の開発

研究課題名(英文)The development of new methods of bone regeneration utilizing differentiation plasticity.

研究代表者

倉林 くみ子(Kurabayashi, Kumiko)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：40586757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨細胞の分化可塑性を利用した新たな骨再生法という、骨再生法を開発・検討した。培養軟骨細胞は細胞が増殖しても分化可塑性が残るため、軟骨を骨に転化して骨の細胞源としても期待できる。大量に増殖が可能である軟骨細胞を細胞源として再生組織を作製し、この再生組織を骨化させることにより、従来成し得なかった十分な骨量を有する骨再生技術を確立した。初年度は、培養軟骨細胞における分化可塑性を確認し、培養再生骨組織作製の条件を検討し、次年度以降は、ヌードラット皮下移植実験により条件を確立し、頭蓋骨欠損モデルで最適条件を検証した。

研究成果の概要(英文)：We developed and examined the new bone regeneration process using differentiation plasticity of chondrocytes. It can also be expected as a cell source of bone by ossification of chondrocyte. We established a bone reproduction technology having enough bone masses using chondrocytes as a cell source of bone. In the first year, We confirmed the differentiation plasticity in the culture chondrocyte and examined a condition of the culture reproduction osseous tissue manufacture. After the next fiscal year, We established an optimal condition by nude rat subcutaneous implantation and the skull defect model.

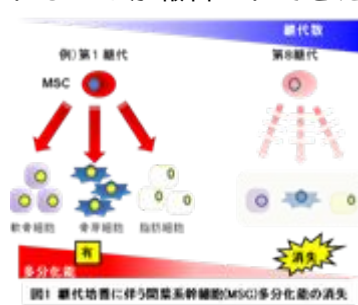
研究分野：再生医療

キーワード：軟骨細胞 分化可塑性 培養再生骨

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域には、複雑な形状を持った骨が多数存在し、これらの骨が複合して顎顔面・口腔領域のフレームワークを構成する。特に顎骨は、顔面の形状保持、歯の力学的支持のほか、咀嚼、発声、構音などにも重要な役割を果たしている。従って、これらの骨に、癌や腫瘍の手術侵襲、外傷、先天性形態異常や歯周病疾患等で骨欠損を生じた場合、自家骨移植が必要となる。しかし、自家骨移植では、採取できる骨量には限界がある。また、人工骨には露出・感染の危険性があり、他家骨移植は倫理上の問題があり本邦では使用し難い。このため、再生医療技術を用いて大量の骨を再生させて用いることが期待され、多くの研究がなされてきた。これまで、骨再生においては骨髄由来あるいは脂肪由来の間葉系幹細胞が主に用いられてきた。間葉系幹細胞は骨髄内や脂肪内に存在し、骨や軟骨、脂肪などに分化し得る多分化能を有する組織幹細胞である。しかし、間葉系幹細胞はその実態が未だに不明であり、骨髄間葉系幹細胞では骨髄細胞のうち単核球成分を分離して培養ディッシュに接着させるが、継代培養によって多分化能を急速に消失する。また、脂肪由来間葉系幹細胞では骨の作出効率が低く、骨形成量には限界があるのが現状である。その他の細胞源としては、iPS 細胞なども期待されているが、骨への分化法や分化量には大きな課題がある。一方、軟骨再生医療は、再生医療の中でも最も進んだ領域であり、自家由来培養軟骨細胞を利用した臨床応用もなされている。こうした再生軟骨において、培養や移植条件により、石灰化あるいは骨化が引き起こされることが報告されてきた

(Hinek A. J Cell Biol. 1987)。また、申請者らも、ラットや家兎の耳介あるいは肋軟骨の軟骨膜よりの軟骨再生



において、移植条件の血行状態を変化させることにより、骨化が誘導されることを観察している(Takato T. Br J Plast Surg 1993、Takato T. Plast Reconstr Surg. 1986)。このように軟骨が骨化する現象は、軟骨形成目的としては望ましくないものの、軟骨細胞が骨形成に傾く分化可塑性の分子メカニズムを明らかにすることができれば、大量に増殖培養が可能な軟骨細胞を、骨再生の細胞源に利用できるのではないかと申請者らは着想した。

2. 研究の目的

顎顔面骨は、歯の力学的支持、咀嚼、構音、顔面の形状保持などに重要な役割を果たす。先天異常、腫瘍切除後や外傷などによる骨欠

損修復においては、大量の骨移植が必要となる。しかし、自家骨採取量には限界があり、採取部の变形なども無視できない。また、小児では多量の骨採取は不可能である。このため、自身の体に大きな侵襲を加えず、大量の骨が得られれば、臨床において非常に大きな

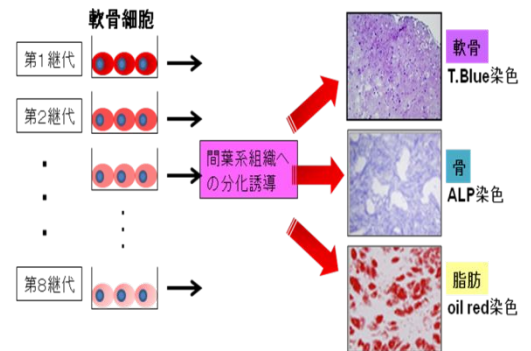


図3 各継代における軟骨細胞の分化可塑性検討

進歩になる。本研究では、軟骨細胞の分化可塑性を利用した新たな骨再生法という、まったく新しい発想に基づいた骨再生法を開発・検討する。培養軟骨細胞は細胞が増殖しても分化可塑性が残るため、軟骨を骨に転化して骨の細胞源としても期待できる。大量に増殖が可能である軟骨細胞を細胞源として再生組織を作製し、この再生組織を骨化させることにより、従来成し得なかった十分な骨量を有する骨再生技術を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

分化可塑性が高く、大量培養に適している軟骨細胞を細胞源とした骨再生技術の確立を目的とし、初年度は、培養軟骨細胞における分化可塑性を確認し、培養再生骨組織作製の条件を検討した。次年度以降は、ヌードラット皮下移植実験により条件を確立し、頭蓋骨欠損モデルで最適条件を検証した。

培養ヒト軟骨細胞における分化可塑性の検討

軟骨は、手術時に切除され治療や診断で必要がないため破棄されているヒト組織(鼻中隔軟骨、耳介軟骨、関節軟骨、肋軟骨)を、インフォームドコンセント後に患者から採取する(東京大学医学部倫理委員会承認済み、#622)。採取した軟骨組織はメスで約 1 mm 大の大きさに細切した後、0.15% コラゲナーゼ溶液で 37、24 時間酵素処理を行い、細胞を採取する。採取した軟骨細胞は、10%FBS 含有培養液で培養し増殖曲線を描き増殖能を評価する。また、各種軟骨細胞は、第 1 継代(P1)から P8 までのそれぞれについて、骨、脂肪、軟骨などの間葉系組織への分化を誘導し、多分化能を評価し、比較検討し、軟骨細胞の分化可塑性の基本データとする。軟骨分化に関しては、10<sup>5</sup> 細胞を軟骨分化培地(含インスリン、TGF-)とともに 15ml 遠沈管の中で静置し、4 週間後に、組織切片をトルイジンブルー染色で観察し、Col2、Sox9、Col10 等の軟骨マ

ーカーを realtime RT-PCR で定量的に評価する。骨芽細胞あるいは脂肪細胞への分化に関しては、それぞれの培養皿から回収した細胞を、通常の直径 12 mm 培養プレートに  $10^5$  細胞/cm<sup>2</sup> で播種し、翌日骨分化培地(含 グリセロリン酸、アスコルビン酸)および脂肪分化培地(含デキサメサゾン、インドメタシン)に交換し、1 週後 ALP 染色および oil red 染色で骨分化および脂肪分化を評価する。さらに、それぞれのマーカーである Runx2、Col1、ALP、osteocalcin および PPAR などを実time RT-PCR で定量的に評価する。これらの結果を、各細胞、各継代で比較検討し、軟骨細胞可塑性の基礎データとする。その上で、増殖能および骨分化能の優れた軟骨細胞の第 2 継代 (P2) について、さらに BMP-2、BMP-4 あるいはその組み合わせを検討し、骨芽細胞への分化を検討する。対照としてヒト骨髄由来の間葉系幹細胞を用いて同様の実験を行った。

ヒト軟骨細胞を用いた培養再生骨組織の作製

カルシウム系多孔体(気孔率 75%、5x2 mm)に軟骨細胞を投与し、前項で評価した培養条件をもちいて、培養再生骨組織を作製する。投与する細胞密度を、 $1 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$  細胞/mL に設定し、培養期間を 1, 2, 3, 4 週とし、骨再生を評価する。対照とし、骨髄由来間葉系幹細胞を用いて、同等の実験を行う。評価にはマイクロ CT による画像評価、非脱灰研磨切片によるコンタクトマイクロラジオグラム、脱灰パラフィン切片による組織学的評価、などを行う。

ヒト軟骨細胞由来再生骨のヌードラット皮下移植実験

カルシウム系多孔体(気孔率 75%、5x2 mm)に軟骨細胞を投与し、前項で評価した培養条件をもちいて、培養再生骨組織を作製する。

この培養再生骨をヌードラット(7 週齢オス、n=12)の背部に移植する。移植 2 週、2 カ月間、6 ヶ月で移植組織を摘出し、骨再生を評価する。対照とし、骨髄由来間葉系幹細胞を用いて同等の実験、ならびに足場素材(カルシウム系多孔体)のみの移植を行う。評価にはマイクロ CT による画像評価、非脱灰研磨切片によるコンタクトマイクロラジオグラム、脱灰パラフィン切片による H.E 染



図4 ヌードラット頭蓋骨欠損モデルへの移植

色・免疫染色などの組織学的評価、などを行う。

これらの結果をもとに、培養条件を絞り込む。

ヌードラット頭蓋骨欠損モデルに対するヒト軟骨細胞由来再生骨の検証

マウス頭頂骨臨界骨欠損モデルは単純な骨欠損形態での骨再生の評価に利用される。直径 4mm の全層欠損はマウス頭頂骨における臨界骨欠損となりうる。(FASEB J 21:1777-1787, 2007)ヌードラット(7w 齢雄、n=12)の頭蓋骨に長さ 8mm の骨欠損を作製し、

項で確定した培養条件で製造した再生骨を移植する(n=3)。なお、カルシウム系多孔体はあらかじめ、欠損部に相当する形状に加工しておく。再生骨を欠損部に移植し、両端の骨片を含めチタンプレートで固定する。対照としては、足場素材(カルシウム系多孔体)のみの移植を行う(n=3)。移植後 2 カ月で組織を摘出する。評価にはマイクロ CT による画像評価、非脱灰研磨切片によるコンタクトマイクロラジオグラム、脱灰パラフィン切片による組織学的評価、などを行う。これらの結果を元に、最終的な培養条件を検証する。

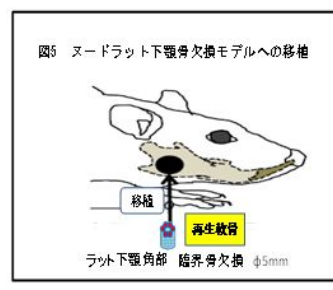


図5 ヌードラット下顎骨欠損モデルへの移植

#### 4. 研究成果

細胞培養継代後半(第 8 継代)細胞と比較して、初期継代(P1-P3)では細胞増殖能・分化能が高いが、単層長期培養では基質産までは進行するものの石灰化を誘導する肥大軟骨への分化が困難であった。そのため、三次元高密度培養(ペレット培養)により再分化誘導し添加因子の制御により肥大化軟骨へ分化誘導する必要があると言えた。高密度培養にて得られた肥大化軟骨、石灰化状態では、次のような現象を伴うことが分かった。まず GAG の産生能が少ない、コラーゲン産生が活発である 3)培養初期は COL I、COL II とともに豊富に存在し、培養期間が長くなると type I が減少する、石灰化する。培養軟骨細胞においては、COL I、II、X コラーゲン、オステオネクチンの mRNA の発現上昇を認めるのに対し、石灰化の進行に伴い、軟骨基質を維持する COL II コラーゲンの mRNA は減少し、COLX mRNA が上昇することは先行研究にてすでに周知の事象だが、in vitro での培養軟骨細胞の石灰化においても COLX 重要な因子であることが確認された。軟骨後期分化では、ALP の活性化上昇に伴い、石灰化が誘導され、

血管進入を経て、骨へと置換されていく。添加として ーグリセロリン酸 (4-20mM) 存在下にて石灰化 (肥大軟骨) を促進した。

P2 軟骨細胞培養後、コンフルエント後にイン添加因子存在下にて培養継続したところ、位相差顕微鏡においてディッシュ中央部に肥大軟骨様組織を認めるものの、その後石灰化 (骨化) の誘導は確認できなかった。

また P8 軟骨細胞を用いて、骨分化培地にて培養し、BMP4 添加下にて培養したところ

COL mRNA の上昇、ALP 上昇を認めた。

さらに カルシウム系多孔体 (気孔率 75%、5x2 mm) に軟骨細胞を投与し骨再生能を評価した。対照群として MSC, ips 細胞も評価した。ヒト MSC においてはサイトカイン IL-1, TNF-, IL-6 の添加により石灰化を早期に誘導した。

次に、ヌードラット (7 週齢オス、n=12) の背部に移植し、2 カ月後の摘出した再生組織にマイクロ CT H.E 染色・免疫染色などの組織学的評価において有意に骨組織を認めた。

軟骨が骨化する現象は、軟骨形成目的としては望ましくないものの、軟骨細胞が骨形成に傾く分化可塑性の条件によっては、大量に増殖培養が可能な軟骨細胞を、骨再生として利用できそうであると、言える。培養条件は無限に検討し得るが、細胞培養環境 (CO<sub>2</sub>, 酸素分圧) などの検討、添加因子の組合せやタイミングの検討により、より大量骨産生が可能となると言えそうである。今後臨床に向けて応用の実現性についてより詳細に検討していく必要である。

## 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)

なし

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

倉林くみ子 (Kurabayashi Kumiko)

東京大学医学部附属病院顎口腔外科

特任臨床医

研究者番号 : 40586757