

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25年 5月14日現在

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2009 ～ 2012
 課題番号：21249079
 研究課題名（和文） 磁性化前駆・幹細胞と外磁場装置による血管再生を介した組織再生への戦略的研究
 研究課題名（英文） Magnetic stem/progenitor cell targeting for tissue regeneration through the angiogenesis
 研究代表者
 越智 光夫（OCHI MITSUO）
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
 研究者番号：70177244

研究成果の概要（和文）：軟骨、骨、骨格筋、脊髄などの損傷モデルを用いて、骨髄間葉系幹細胞と血管内皮前駆細胞の磁気ターゲティングによる組織再生に関する研究を行った。いずれの損傷モデルにおいても骨髄間葉系幹細胞や血管内皮前駆細胞の移植による組織修復効果が磁気ターゲティングによって促進された。磁気ターゲティングは損傷部への細胞集積を促進するとともに、局所での移植細胞の接着や増殖を高めることで、組織修復に寄与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We performed the basic research about tissue regeneration using magnetic targeting of bone marrow mesenchymal stem cells or endothelial progenitor cells in musculoskeletal and spinal cord injury models. Magnetic cell targeting enhanced the effect of cell transplantation on the tissue repair in all injury models. We suspected that magnetic cell targeting contributed the tissue repair by promoting accumulation, adhesion and proliferation of transplanted cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2010年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
総計	36,600,000	10,980,000	47,580,000

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：移植・再生医療，再生医学，細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞磁気ターゲティング

運動器再生を中心とする整形外科領域において、四肢の再生を企画するにあたり変形性関節症は避けては通れない。変形性関節症は主に関節の骨、軟骨、滑膜、関節包の変性、増殖を主体とし関節破壊を引き起こす疾患で、関節可動域の制限、疼痛により日常生活に著しい支障をきたす。変形性関節症の発症には環境要因や遺伝的要因も関与することが明らかになってきており、遺伝的要因のゲ

ノムワイドな解析とそこから抽出された因子を利用した変形性関節症のメカニズム解明及び治療戦略は着々と進んでいる (Ikegawa S Nat Genet 2007, Ikegawa S., Kawaguchi H. Nat Med 2007)。この流れの中で申請者は自己の軟骨細胞を利用したアテロコラーゲン包埋自家培養軟骨細胞移植を世界で初めて臨床応用し、変形性関節症を予防するべく細胞移植という手段を用いて四肢再生療法開発を行ってきた (Ochi M et al., Artif Organs 2001)。この経験を生かし、細

胞移植療法の可能性を探求すべく我々は自家骨髄間葉系幹細胞と磁気ビーズ、独自に開発してきた磁気ビーズを封入した「磁性体リポソーム」及び外磁場装置を用いた四肢再生のための細胞移植療法開発のバイオニアを担ってきた（特許出願）。間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell; MSC) においては磁気ビーズを取り込ませ、その分化能を阻害しない状態で、外磁場により望ましい部位に細胞を集積させる空間コントロールが可能であることを確認し報告している (Nishida K. et al. Neuroreport 2006, Yanada S. et al. J Biomed Mater Res A 2006, Hamasaki T. et al. Neuroreport 2006, Kobayashi T. et al. Arthroscopy 2007)。さらに、細胞膜の刺激によるシグナル伝達の促進、また局所に細胞を凝集させることによる細胞間情報伝達の促進など、磁場の間接的な刺激による様々な効果が期待でき、MSC と磁場による再生療法の臨床応用への期待が非常に高まってきている。最近の研究から磁性化 MSC を外磁場にて骨形成部位に局所集積させることで骨形成を促進できることを我々は明らかにしている。

(2) 細胞ソース

MSC は培養が必要であり、培養中の感染、培養設備、コストなど、そこから派生する様々な問題も存在する。そこで、さらなる自己由来細胞ソースとして、我々は血管内皮前駆細胞 (Endothelial Progenitor Cell; EPC) に着目して研究を開始している。末梢血中の CD34 陽性細胞は血液幹細胞分画として知られていたが、分担研究者の浅原孝之らがその分画における EPC の存在を 1997 年に Science に報告して以後、血管学は急速に発展しており、まず循環器領域に重点が置かれ、重症下肢虚血患者への臨床治験も浅原らにより開始されている。また、最近になりこの EPC は血管再生能に加えて多分化能を示し、これらによる組織再生への関与が明らかになってきており (Iwasaki H. et al. Circulation 2006)、その応用分野は循環器領域のみならず様々な領域への応用の可能性を秘めている (Matsumoto et al. Am J Pathol 2006)。最近の報告でも血管関連因子と組織再生 (Carmeliet P. BioEssay 2004) も報告されており血管と組織再生は密接な関係にある。筋再生、筋由来幹細胞の研究で有名な研究協力者の Huard からも筋組織に存在する血管内皮比マーカーを発現する細胞が筋組織再生に重要な役割を持つことを報告している (Huard J. Nature Technol. 2007)。整形外科領域においては様々な組織損傷が存在し、軟骨などの特殊な組織を除いて血管は必ず存在している。よって損傷の修復には酸素、栄養素、細胞の供給のための血管が不可欠であり、損傷組織の再生に血管再生は不可欠要素と考え

た。これまで、EPC による血管再生を介した組織再生を仮定し、*in vitro* での器官培養モデル及び様々な動物モデルへの移植で効果を検討してきた。現在までに EPC 移植による神経再生、骨再生、腱再生、筋再生が確認できており、その驚くべき効果が示された。これまでの MSC と EPC 移植の結果を統合し、磁場による時間的空間的細胞コントロール及び細胞へのダイナミックな磁場の影響に加え、多分化能が証明されている MSC と優れた再生環境改善効果を持つこの EPC を移植細胞ソースとし、自己細胞を用いたこれまでにない強力な組織再生促進療法が可能になると考えた。EPC は培養を必要とせずさらに、表面抗原により効率的に細胞単離が可能であり、MSC との併用移植も容易に遂行できると考えている。

2. 研究の目的

申請者らは外磁場装置の開発を行い、磁気ビーズでラベルした MSC を *in vitro*, *in vivo* 下に空間コントロールできることを確認している。また、詳細なメカニズムは証明していないが、ヒト末梢血由来の EPC の移植により神経再生、腱再生、骨再生及び筋再生も確認している。本研究では、可塑性をもつ MSC と血管再生の重要な因子である EPC を磁性化し外磁場で損傷部へ局所集積させることにより損傷組織の再生が促進されるかどうかを解明する。

3. 研究の方法

(1) MSC 磁気ターゲティングによる軟骨再生

ミニブタ (6 か月) の腸骨より骨髓液を採取し、単層培養後に得られた MSC を使用し、MRI 造影剤である Ferucarbotran を用いて MSC を磁性化した。 *in vitro* において、磁性化し磁場をかけた MSC の細胞増殖能、軟骨分化能を標識していない MSC と比較・検討した。 *In vivo* ではミニブタ膝蓋骨中央に直径 6mm の全層軟骨欠損を作製し、4 週後に、関節鏡下に外磁場装置を用いて磁性化 MSCs 5×10^6 個を軟骨欠損部に誘導し (図 1)、10 分間静置した群 (外磁場群) を作製。重力下に MSC: 5×10^6 個を軟骨欠損部に誘導し 10 分間静置した群 (重力群)、PBS のみを注射した群 (PBS 群) の 3 群を作成した。評価は軟骨欠損部の肉眼的評価、超音波評価および組織学的評価を行った。

(2) MSC 磁気ターゲティングによる骨再生
生体発光イメージングによる移植細胞の動態解析のために、ルシフェラーゼ遺伝子導入ラットの骨髓から MSC を樹立し、磁気標識した。骨折部周囲の骨膜を焼灼する大腿骨難治性骨折モデルを野生型ラットで作製し、 1×10^6 個の磁性化 MSC を骨折部周囲へ注入した。細胞投与時に、骨折部が磁場勾配の頂点となるように体外磁場発生装置を設置して磁場

を 10 分間作用させた群(MSC+M 群)、非磁場下に MSC を投与した群(MSC 群)、磁場作用下に PBS のみを投与した群(PBS 群)の 3 群を作製した。移植細胞の分布の経時的变化を生体発光イメージングで観察し、さらに骨形成の X 線学的小および組織学的評価を行った。

(3) MSC 磁気ターゲティングによる筋再生
 ルシフェラーゼ遺伝子導入ラットの骨髄から MSC を培養樹立した。野生型ラットの前脛骨筋に 6x4x5mm の損傷を加え、以下の 3 群を作製した。MSC+M 群：損傷部が磁場勾配の頂点となるように体外磁場発生装置を設置して、磁性化した MSC を 1×10^6 個筋損傷部へ注入し、磁場を 10 分間作用。MSC 群：非外磁場下に細胞を注入。PBS 群：磁場作用下に PBS のみを注入。In Vivo Imaging System を用いて、細胞移植後 0、12、24、72 時間後、1、4 週後の移植細胞の動態を観察し、損傷後 1、4 週で損傷筋の電気生理学的および組織学的評価を行った。

(4) EPC 磁気ターゲティングによる脊髄再生

IH インパクトを用いて免疫不全ラットの胸髄に圧挫損傷を加え、以下の 3 群を作製した。CD133M 群：第 4/5 腰椎高位髄腔内にヒト末梢血 CD133 陽性細胞 1×10^5 個を注入し、胸髄損傷部が磁場勾配の頂点となるように体外磁場を 30 分間作用させた群、CD133 群：非磁場下に CD133 陽性細胞を髄腔内投与した群、PBSM 群：磁場存在下に PBS のみを髄腔内投与した群、BBB スコア、運動誘発電位測定による脊髄機能評価および免疫染色による組織学的評価を行った。また、ルシフェラーゼ遺伝子を導入した CD133 陽性細胞を投与して、in vivo イメージングによる移植細胞の動態観察を行った。

(5) EPC 磁気ターゲティングによる筋再生
 スードラットの前脛骨筋筋腹中央部に損傷を加え、損傷部を超電導バルク磁石システムの中心(磁束密度が突出して高い位置)に設置して周囲と磁場勾配が発生するようにし、以下の 3 群を作製した。PBSM 群：3.0T 外磁場の下で PBS のみを注入。CD133 群：非外磁場の下 1×10^4 個(従来の 10 分の 1)の CD133 陽性細胞を注入。CD133M 群： 1×10^4 個の CD133 陽性細胞を 3.0T 外磁場の下で注入。評価は損傷後 1、4 週に電気力学的および組織学的評価を、損傷後 3 日目に遺伝子発現の評価を行った。

4. 研究成果

(1) MSC 磁気ターゲティングによる軟骨再生
 Kamei G, Adachi N, Ochi M et al. Am J Sports Med *in press*

In vitro

磁場が骨髄間葉系幹細胞の増殖能に与える影響について

培養中の骨髄間葉系幹細胞を磁場に暴露し、

経時的に細胞数を計測した。磁性化の有無によって細胞増殖能に変化はなかった。磁場により細胞増殖能が増加したが、磁場条件間での差は無かった(図 1)。

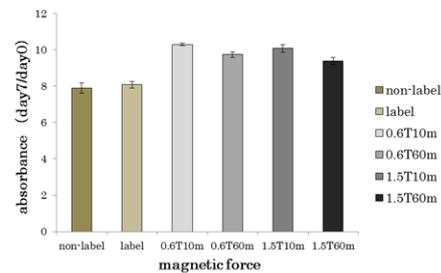


図 1：培養 7 日後の MSC の増殖

磁場が MSC の軟骨分化に与える影響について
 ペレット培養では標識の有無や磁場の有無による軟骨分化に差を認めなかった(図 2)。また、磁場への暴露により、aggrecan や type II collagen などの細胞外基質の産生が増加した。

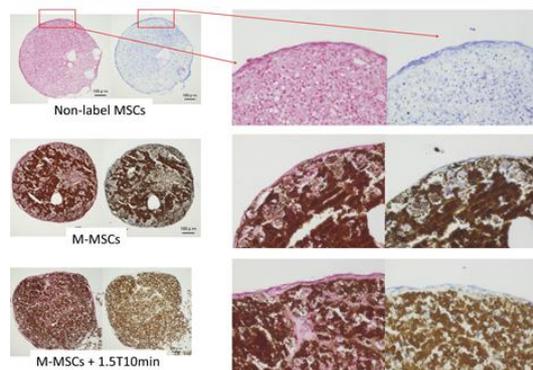


図 2：MSC のペレット培養後のサフラニン O 染色とトルイジンブルー染色

In vivo (軟骨欠損モデルへの MSC 移植)

肉眼評価

外磁場群で最も性状が硬さ正常軟骨に近い軟骨が形成されていた(図 3)。



図 3：肉眼評価

超音波評価

外磁場群で最も硬さと滑らかさが正常軟骨に近い軟骨が形成されていた。

組織学的評価

サフラニン O 染色による組織学的評価では外磁場群、重力のみ群、PBS 群の順に良い染色

性を示した (図4)。

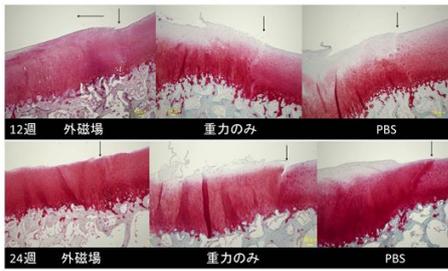


図4：サフランニンO染色による組織学的評価

(2) MSC 磁気ターゲティングによる骨再生
Kodama A, Kamei N, Ochi M et al. J Bone Joint Surg Br 2012

生体発光イメージングにおける骨折部での発光強度は、いずれの細胞移植群においても移植後3日で著明に増強し、その後漸減した。細胞投与後早期(1, 3日)では骨折部における発光強度のピーク値がMSC+M群で有意に高く、細胞投与後2, 4週では発光量がMSC+M群で有意に大きかった(図5)。これらの結果はMSC+M群において移植細胞が骨折部へより多く集積し、より多く長期的に生存したことを反映していると考えられた。X線学的、組織学的評価においてMSC+M群では他の群と比較し移植後4週と8週で、有意な仮骨形成の促進を認めた(図6)。

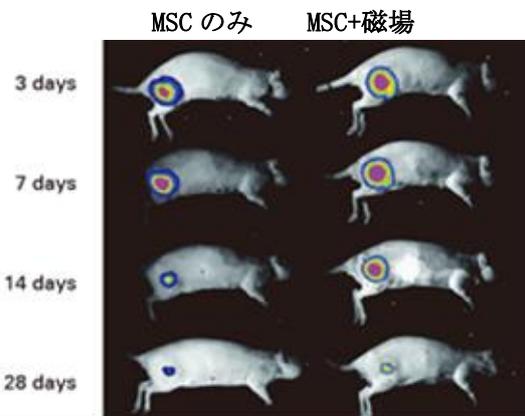


図5：骨折モデルのイメージング

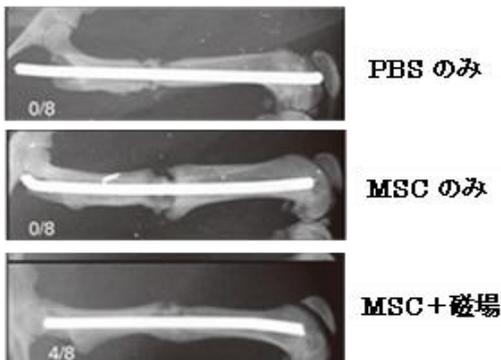


図6：X線学的評価(移植後8週)

(3) MSC 磁気ターゲティングによる筋再生
Nakabayashi A, Kamei N, Ochi M et al. J Orthop Res 2013

In Vivo Imaging において、MSC+M群ではMSC群に比べて、磁場勾配に従って移植細胞が損傷部へと集積しており、長期間にわたって移植細胞が残存していた(図7)。電気生理学的评价において、術後1週ではMSC+M群はPBS群に比べ有意に筋力が強かったが、MSC群との有意差は認めなかった。一方、術後4週では、MSC+M群における筋力はPBS群、MSC群のいずれよりも有意に強かった。組織学的評価では、術後1週でMSC+M群、MSC群ともにPBS群と比べ有意に癒痕形成が少なかったが、MSC群とMSC+M群との間に有意差はなく、術後4週ではMSC+M群、MSC群、PBS群の順に癒痕形成が少なく、3群間に有意差を認めた(図8)。

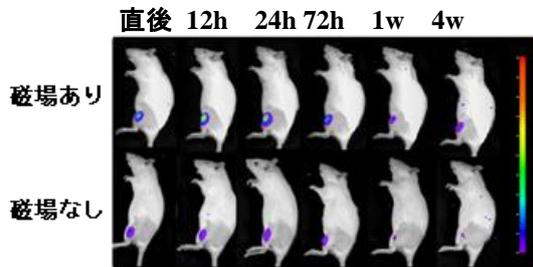


図7：筋損傷モデルのイメージング

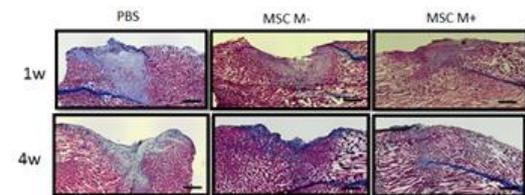


図8：組織学的評価

(4) EPC 磁気ターゲティングによる脊髄再生
Fujioka Y, Kamei N, Ochi M et al. Spine 2012
CD133M群では他の群と比べ後肢機能の改善が有意に促進されていた。損傷部における炎症性サイトカインの発現抑制、Ang-1の高い発現を認めた。In vivo イメージングで、CD133M群では主に腰椎部が発光しているのに対し、CD133M群では胸髄損傷部で強い発光を認め、移植細胞が損傷部へと集積していることが示された(図10)。

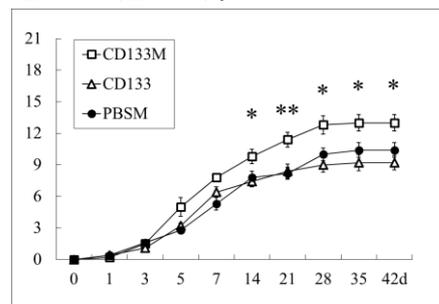


図9：後肢運動機能評価

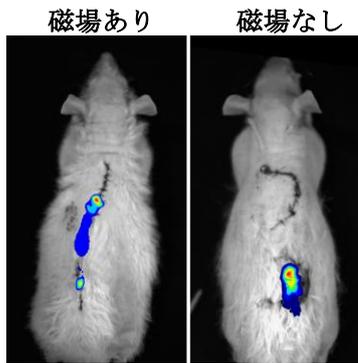


図 10 : 脊髄損傷モデルのイメージング

(5) EPC 磁気ターゲティングによる筋再生
Ohkawa S, Kamei N, Adachi N, Ochi M et al. Tissue Eng Part C Methods 2013
CD133M 群では損傷後の癒痕組織の面積が他の 2 群よりも有意に小さく、再生筋の数、筋径および筋収縮力が他の 2 群よりも有意に大きかった (図 11)。また、筋再生に関連した転写因子の発現レベルが他の 2 群に比べ有意に高かった。一方、CD133 群では PBS 群よりも改善した評価項目も散見されたが、CD133M 群よりも有意に劣っていた。

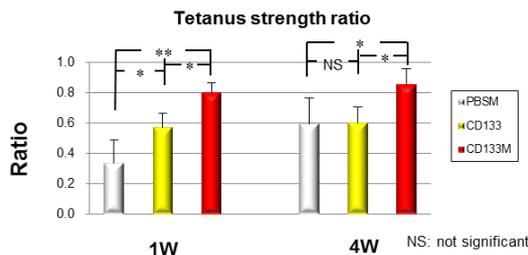


図 11 : 筋収縮力の評価

まとめ

軟骨、骨、骨格筋、脊髄などの損傷モデルを用いて、骨髄間葉系幹細胞と血管内皮前駆細胞の磁気ターゲティングによる組織再生に関する研究を行い、いずれの損傷モデルにおいても骨髄間葉系幹細胞や血管内皮前駆細胞の移植による組織修復効果が磁気ターゲティングによって促進された。磁気ターゲティングは損傷部への細胞集積を促進するとともに、局所での移植細胞の接着や増殖を高めることで、組織修復に寄与していると考えられた。

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 27 件)

1. Goki Kamei, Mitsuo Ochi et al. Articular cartilage repair with magnetic mesenchymal stem cells. American Journal of Sports Medicine. 査読有 in press, 2013

2. Goki Kamei, Mitsuo Ochi et al. A new distraction arthroplasty device using magnetic force; a cadaveric study. Clinical Biomechanics. 査読有 in press, 2013

3. Shingo Ohkawa, Mitsuo Ochi et al. Magnetic Targeting of Human Peripheral Blood CD133(+) Cells for Skeletal Muscle Regeneration. Tissue Engineering Part C: Methods. 査読有 in press, 2013

4. Naosuke Kamei, Mitsuo Ochi. Ex-vivo expanded human blood-derived CD133(+) cells promote repair of injured spinal cord. Journal of the Neurological Sciences. 査読有 328, 2013, 41-50

5. Akihiro Nakabayashi, Naosuke Kamei, Mitsuo Ochi et al. In vivo bioluminescence imaging of magnetically targeted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in skeletal muscle injury model. Journal of Orthopaedic Research. 査読有 31, 2013, 754-759

6. Akira Kodama, Naosuke Kamei, Mitsuo Ochi et al. In vivo bioluminescence imaging of transplanted bone marrow mesenchymal stromal cells using a magnetic delivery system in a rat fracture model. Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume. 査読有 94, 2012, 998-1006

7. Takeshi Shoji, Tomoyuki Nakasa, Naosuke Kamei, Nobuo Adachi, Mitsuo Ochi et al. The effect of intra-articular injection of microRNA-210 on ligament healing in a rat model. Am J Sports Med. 査読有 40, 2012, 2470-2478

8. Shin Ohtsubo, Naosuke Kamei, Mitsuo Ochi et al. The therapeutic potential of ex vivo expanded CD133+ cells derived from human peripheral blood for peripheral nerve injuries. Journal of Neurosurgery. 査読有 117, 2012, 787-794

9. Yuki Fujioka, Naosuke Kamei, Mitsuo Ochi et al. Magnetic field-based delivery of human CD133+ cells promotes functional recovery after ratspinal cord injury. Spine. 査読有 37, 2012, E768-777

10. Keiichiro Yamasaki, Tomoyuki Nakasa, Yuji Yasunaga, Mitsuo Ochi et al. Angiogenic microRNA-210 is present in cells surrounding osteonecrosis. Journal of Orthopaedic Research. 査読有 30, 2012, 1263-1270

[学会発表] (計 76 件)

1. 亀井豪器, 越智光夫. Distraction arthroplasty と磁気ターゲティングシステムを用いた変形性膝関節症治療 (招待講演)

第 12 回日本再生医療学会総会 2013 年 3 月 21 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

2. 越智光夫. 磁気誘導を用いた軟骨の再生 (招待講演) 平成 25 年電気学会全国大会 2013 年 3 月 20 日 名古屋大学 (名古屋市)

3. 越智光夫. 膝関節のスポーツ外傷・障害 (招待講演) 朝日医学・医療セミナー 2013 年 3 月 9 日 電気ビルみらいホール (福岡市)

4. 越智光夫. 膝関節の生物学的再建 (招待講演) 福島県整形外科学術講演会 2013 年 3 月 6 日 ホテルサンルートプラザ福島 (福島市)

5. 越智光夫. 運動器の再生医療 (招待講演) 日本再生医療学会エデュケーショナルセミナー 2013 年 2 月 26 日 六本木ヒルズ (東京)

6. Mitsuo Ochi. The future treatment of osteoarthritis (招待講演) The 18th National Congress of Indonesian Orthopaedic Association 2012 年 11 月 21 日 Jakarta, Indonesia

7. Mitsuo Ochi. Past, present and future for cartilage repair (招待講演) The 7th International Congress of Chinese Orthopaedic Association 2012 年 11 月 15 日 Beijing, China

8. Mitsuo Ochi. Cartilage repair; treatment options and outcomes (招待講演) Congress of Arthroscopy and Sports Medicine 2012 年 11 月 8 日 Jaipur, India

9. Mitsuo Ochi. Biological reconstruction of the knee joint (招待講演) Annual Fall Meeting of Korean Orthopaedic Association 2012 年 10 月 19 日 Seoul, Korea

10. Mitsuo Ochi. Cartilage repair by cell therapy; Past, Present and Future (招待講演) Seminar in National Taiwan University 2012 年 8 月 24 日 Taipei, Taiwan

11. Mitsuo Ochi. Distraction arthroplasty in cartilage repair (招待講演) The 15th ESSKA CONGRESS 2012 年 5 月 2 日 Geneva, Switzerland

12. Mitsuo Ochi. Emerging technology for cartilage repair (招待講演) The 9th IFOSMA & 22nd Chinese Endoscopy 2012 年 4 月 26 日 Shanghai, China

[図書] (計 2 件)

1. 亀井豪器, 越智光夫. 先進医療 NAVIGATOR (5. 磁性化幹細胞, CD133 陽性 細胞と外磁場装置を用いた再生医療). 日本医学出版 2013 189 ページ

2. 亀井直輔, 越智光夫. 再生医療叢書 6 骨格系 (11. 骨格筋の再生). 朝倉書店 2013 181 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: 創外固定器および固定器セット

発明者: 越智光夫, 青木雅昭

権利者: 越智光夫, 青木雅昭

種類: 特許

番号: 特願 2012-135636

出願年月日: 2012 年 06 月 15 日

国内外の別: 国内

名称: 磁気誘導システムとその動作方法

発明者: 村上雅人, 越智光夫

権利者: 村上雅人, 越智光夫

種類: 特許

番号: 特願 2011-537331

出願年月日: 2012 年 04 月 20 日

国内外の別: 国内

名称: 磁気誘導装置, 磁気誘導システム

発明者: 越智光夫, 村上雅人

権利者: 越智光夫

種類: 特許

番号: 特願 2009-244942

出願年月日: 2009 年 10 月 23 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号: 7 0 1 7 7 2 4 4

(2) 研究分担者

安永 裕司 (YASUNAGA YUJI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・寄附講座教授

研究者番号: 4 0 2 5 3 0 7 5

浅原 孝之 (ASAHARA TAKAYUKI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 2 0 2 4 6 2 0 0

安達 伸生 (ADACHI NOBUO)

広島大学・病院・准教授

研究者番号: 3 0 2 9 4 3 8 3

亀井 直輔 (KAMEI NAOSUKE)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号: 7 0 4 4 4 6 8 5

中佐 智幸 (NAKASA TOMOYUKI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号: 6 0 4 6 7 7 6 9

(3) 連携研究者

浅原 弘嗣 (ASAHARA HIROSHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 7 0 2 9 4 4 6 0