

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791985

研究課題名(和文)

Wnt/sFRPファミリー制御機構を組み込んだ新規骨再生医療の開発

研究課題名(英文)

Novel bone regenerative medicine promoted by regulation of human MSC by Wnt/sFRP family

研究代表者

片桐 渉 (Wataru Katagiri)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10437030

研究成果の概要(和文)：近年、Wnt シグナルが間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を調節していることが明らかになってきた。研究者らはこの点に着目し、Wnt のアンタゴニストである sFRP-3 (secreted Frizzled Related Protein-3) の骨芽細胞分化に与える影響を *in vitro* および *in vivo* で検討し、sFRP-3 添加が早期の骨芽細胞分化を誘導し、かつ動物実験では早期の骨形成能を示すことを明らかにした。このことは sFRP-3 を利用した新規骨再生医療の可能性を示唆する結果となった。

研究成果の概要(英文)：Recently it has been revealed that Wnt signaling pathway regulates the osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs). We used sFRP-3, the antagonist of Wnt, to regulate this signaling and investigated the effect on osteoblastic differentiation of hMSCs *in vitro* and *in vivo*. It was revealed that the addition of sFRP-3 showed early differentiation and mineralization of hMSCs, and also showed early bone regeneration in animal model. These findings indicated the possibility of novel bone regenerative medicine using sFRP-3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：Wnt シグナル、骨再生医療、幹細胞、MSC、sFRP-3

1. 研究開始当初の背景

これまで、歯周病や外傷、または腫瘍切

除等で失った骨を回復する手段としては自家骨移植がゴールドスタンダードであるとされてきた。現在もこの考えに大きな変更

はない。

しかしながら骨移植にはドナーサイトの手術が必要になる場合があり、患者への侵襲や負担は決して小さいものではない。このような背景で代替材料として様々な人工材料やあるいは他家骨などが市場に多く流通するようになってきた。しかしながら臨床応用を考えた際、こういった材料は様々な問題を含んでいることも見逃せない。たとえば感染の問題や異物反応の問題等が挙げられる。

このような背景により、低侵襲でかつ効果的な新しい骨再生医療の開発が期待されている。こういった中、未分化間葉系幹細胞(MSC)を用いた骨再生医療はすでに実用化の段階に入っており、われわれの施設でもこれまでにその有用性を報告してきた。

一方、細胞培養に一定の時間が必要であることや、培養などに相当のコストがかかることは患者の負担という意味では改善すべき点である。

さらにBMP-2やFGF-2といった増殖因子を使用した骨再生医療も報告されているが、増殖因子を使用した場合、過形成が起こったり、再生される骨量が十分でないなどの欠点もある。

本研究では増殖因子を用いることなく、MSCsの増殖や骨分化を効率的に行うため、細胞増殖・分化への関与が明らかにされつつあるWntシグナルに着目した。

2. 研究の目的

近年、未分化間葉系幹細胞(MSC)の増殖および骨分化の過程において、Wnt/ β -カテニン経路による制御が関連していることが明らかになってきた。ヒトMSCにおいてはWntシグナルはその分化を抑制し増殖を促進することが明らかになっている(図1)。

そこで、われわれはMSCの臨床応用における培養過程において、このWntシグナルを調節することにより効率的かつ効果的に骨分化誘導を行い、骨再生医療における更なる治療期間の短縮や効果的な骨造成を行うことを目的に検討を行った。

本研究ではこれらの検討によって増殖因子等を使うことなくいかに効率的に細胞培養を行うことができるかを検討し、臨床上新たな、そして医療者にとっても患者にとっても効果的な骨再生医療の確立を目指した。

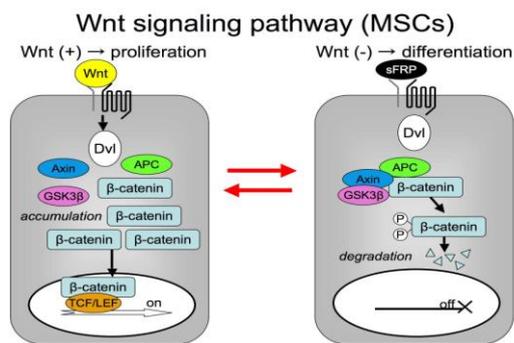


図1 hMSCsとWntシグナル

3. 研究の方法

(1) ヒトMSCの骨分化能に対するsFRP-3の効果に関する検討

ヒトMSCの骨分化過程においてWntレセプターであるFrizzledをWntと競合的に阻害し、Wnt/ β -カテニン経路を負に制御するsFRP-3を分化誘導培地に添加した効果について、Alizalin Red染色にて石灰化を、RT-PCR法およびreal-time RT-PCR法により骨形成関連遺伝子の発現を分化誘導後7、14日目に評価した。

(2) ラット頭蓋骨モデルへの培養骨移植におけるsFRP-3の効果に関する検討

8週齢Wistar/STラットの頭蓋骨にトレフィンバーを用いて直径5mmの骨欠損を作成した。ヒトMSCは骨分化誘導培地にて培養し、sFRP-3添加群に関してはsFRP-3を骨分化誘導培地に混和して培養した。分化誘導7日目に細胞を回収、ヒトPRPを同時に採取・分離し塩化カルシウム、ヒトトロンピンと混和し「培養骨」として骨欠損部に移植した。

移植後2、4、8週において屠殺し μ -CTを撮影、骨再生の様子を3次元的に画像化するとともに、同部の脱灰標本作製しH-E染色を行い組織学的にも評価を行った。

4. 研究成果

(1) ヒトMSCの骨分化能に対する検討

ヒトMSCの骨分化過程においてはsFRP-3添加群では分化誘導開始後7日目より非添加群に比較し、Alizalin Redに対する染色性を認め、分化誘導開始14日目ではさらに染色性が増強した。RT-PCRによるとアルカリフォスファターゼ(ALP)やRunx2などの骨形成関連遺伝子の発現増強を認め

た。

さらに sFRP-3 の発現が通常、sFRP-3 非添加群では 14 日目より発現するのに対し、添加群では 7 日目においてすでに発現していたことより、sFRP-3 添加は本来の骨分化の過程で発現しているもの骨分化の初期には発現しておらず、sFRP-3 添加によりその発現を早期に誘導したと考えられた。

骨形成関連遺伝子発現を定量化するためにリアルタイム RT-PCR を行ったところ、ALP、1 型コラーゲン(Col I)、オステオカルシン(OC)、Runx2 遺伝子の発現が sFRP-3 添加群では非添加群に比べ上昇していることが明らかになった。

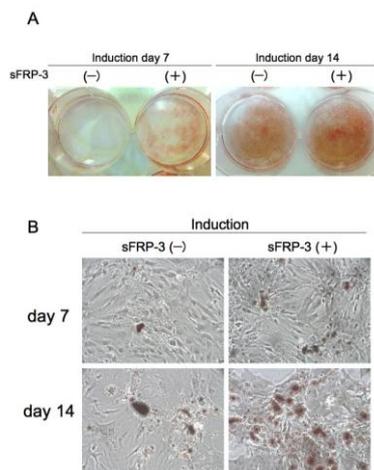


図 2 hMSCs の骨分化過程における sFRP-3 の効果

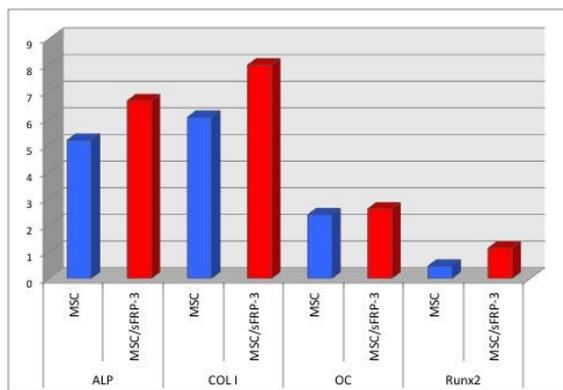


図 3 分化誘導開始 7 日目での骨形成関連遺伝子の発現における sFRP-3 の効果

(3) ラット頭蓋骨モデルへの培養骨移植における sFRP-3 の効果に関する検討

ラット頭蓋骨骨欠損部への移植 2 週後の μ -CT 画像では両群とも骨再生の開始が確認された。とりわけ sFRP-3 添加群においては非添加群に比べ良好な骨造成を示し、骨専有面積においても有意差を認めた。さらに組織学的評価においても新生骨の造成を認め、CT の結果同様、sFRP-3 添加群の良好な骨造成が確認された。

μ CT images and histology of rat calvaria after 2W

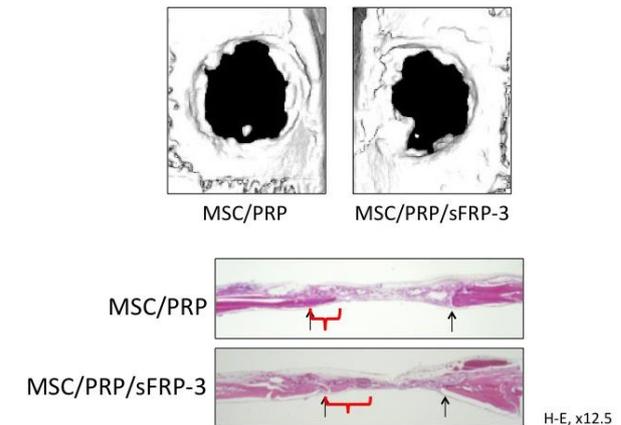


図 4 ラット頭蓋骨骨欠損モデルにおける移植 2 週後の骨形成

以上の結果より本研究により以下のことが明らかとなった。

1. ヒト MSC の骨分化誘導において Wnt シグナルを阻害する因子である sFRP-3 を添加して培養したところ、in vitro においては分化誘導開始 7 日目という早期から石灰化の亢進が確認され、かつアルカリフォスファターゼ、1 型コラーゲン、オステオカルシン、Runx2 などの骨形成関連遺伝子の発現が上昇した。
2. ラット頭蓋骨骨欠損モデルにおいても移植後 2 週において sFRP-3 非添加群にくらべ添加群において良好な骨形成を認めた。

これらの結果は現在臨床応用が進められているヒト MSC を用いた骨再生医療において、従来考慮されていなかった Wnt シグナルの作用を利用することにより、より早期かつ効果的に骨分化誘導を行うことが可能であることを示唆するものである。このことは細胞培養にまつわる時間およびコストの軽減にもつながる可能

性があり、さらに増殖因子などを利用せずして短時間でより良質な骨再生を実現しうる可能性を示した点で、本研究は一定の成果を得たものと考え。

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 2 件)

1. Regulation of the canonical Wnt signaling pathways during cell culture of human mesenchymal stem cells for efficient bone regeneration
Katagiri W, Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Hara K, Hibi H, Ueda M.
Oral Science International 7; 37-46, 2010,査読有
2. Involvement of the Wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells
Iwai S, Yonekawa A, Harada C, Hamada M, Katagiri W, Nakazawa M, Yura Y.
International Journal of Oncology 37; 1095-1103, 2010,査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片桐 渉 (Wataru Katagiri)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10437030

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし