

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462729

研究課題名(和文)新規機能性ペプチド含有担体と臍帯由来幹細胞を用いた骨・軟骨再生に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Research for bone and cartilage regeneration using umbilical cord derived mesenchymal stem cells and novel functional peptide modified scaffold

研究代表者

蛭沢 克己 (Ebisawa, Katsumi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：20397459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドアレイ上における細胞制御ペプチドスクリーニング法で骨・軟骨分化促進ペプチドを、候補タンパク質中から探索し、機能的足場設計のための候補ペプチドのリストアップを行った。これらペプチドを自己配列ペプチド担体に化学修飾を行い、ハイドロゲルを作製した。本材料に臍帯由来間葉系幹細胞を播種・培養を行い、マウス皮下へ移植し、骨形成および軟骨形成の生化学および組織学的評価を行った。いずれのサンプルでも骨及び軟骨特有の細胞外器質の形成が乏しかった。本研究では、候補タンパク質中からリストアップしたペプチドを修飾した担体に、臍帯由来間葉系幹細胞を播種した複合体を、骨および軟骨へ効率的に分化誘導できなかった。

研究成果の概要(英文)：Using peptide array-based interaction assay of solid-bound peptide and anchorage-dependent cells, we listed up some peptides enhancing umbilical cord derived mesenchymal stem cells (UCSCs) differentiation for osteogenesis and chondrogeneses. We modified self-assembling peptide hydrogel with these peptides, and seeded UCSCs into this scaffold. After cultivation, we transplanted them into mice subcutaneous tissue. Samples were harvested, and evaluated concerning to osteogenesis and chondrogenesis with biochemical and immunohistological methods. We identified poor bone-specific and cartilage-specific extracellular matrix formation in each samples. In conclusion, we couldn't induce efficient osteogenesis and chondrogenesis using UCSCs-seeded self-assembling peptide hydrogel modified with peptides we selected.

研究分野：再生医療

キーワード：臍帯由来間葉系幹細胞 骨再生 軟骨再生 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

形成外科では、日常の診療において組織欠損に対して組織移植や再建術を行っている。しかし、ドナーの犠牲が必要なことから、再生医療に関する研究に注目が集まっている。これまでわれわれは骨髄、歯髄、皮膚、脂肪、大網由来など組織幹細胞を用いた軟骨・骨再生や創傷治癒に関する研究を行ってきた (Ebisawa K. et al.: *Tissue Eng.* 10(5): 921-9, 2004)。

唇顎口蓋裂は、形成外科領域では比較的多い先天奇形であり、生後3ヶ月の口唇形成から成人になるまで複数回の手術を要する。その際、骨・軟骨欠損に対して海面骨や肋軟骨・耳介軟骨を採取する場合も多く、患者のQOL向上の点からも、ドナーの犠牲のない治療法の開発が期待されている。

そのため、唇顎口蓋裂に対して、自家組織由来幹細胞を利用する骨・軟骨再生目的とした細胞治療の可能性を検証したいと考えている。なかでもヒト臍帯内に存在するヒト臍帯由来間葉系幹細胞 (human umbilical cord derived stem cells: hUC-MSC) は、他の幹細胞と比較し優れた増殖能を有する事が報告されており (Wang HS et al: *Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells.* 22(7): 1330-7, 2004.)、また通常は産後破棄される組織であることから、倫理面でも問題が少なく細胞源としては非常に魅力的である。しかし最近の研究では、骨形成能において骨髄由来間葉系幹細胞の方が同細胞より優れているとの報告もあり (Kouroupis D. et al: *Assessment of umbilical cord tissue as a source of mesenchymal stem cell/endothelial cell mixtures for bone regeneration. Regen Med.* 8(5):569-81, 2013)、新たな手法の検討が必要な状態である。

研究分担者の加藤らは、ペプチドアレイを用いた網羅的解析により、細胞接着選択性を有する機能性ペプチドを多数発見し、人工血管のコーティング剤として使用して血栓予防や血管リモデリングの促進させている。

同様な骨・軟骨形成誘導機能性ペプチドを網羅的に検索することで、機能的な唇顎口蓋裂部位の再生促進を行う足場材料を設計できるのではないかと着想した。

本研究では、自己幹細胞源として UCMSCs を細胞源とし、骨や軟骨再生能を有する新規機能性ペプチド含有担体と併用することにより、より効率的な骨・軟骨再生医療としての可能性を検討する。

2. 研究の目的

口唇口蓋裂では、標準的な術式が一定の効果を上げている。しかし、顎裂部骨欠損や成

長に伴う変形改善には、新たなドナーの犠牲が必要な場合も多く、解決すべき問題である。再生医療によるアプローチの観点から、われわれは複数の組織再生を効率的に行う機能性を有する担体と、幹細胞、なかでも出産時に廃棄される臍帯組織中に存在するヒト臍帯由来間葉系幹細胞 (hUC-MSC) に注目している。

本研究では、骨・軟骨系への分化誘導を効率的に行うための新規機能性ペプチド含有担体と hUC-MSC を利用して、低侵襲かつ効率的な骨・軟骨再生を行い、ドナーの犠牲をなくし、患者の QOL 向上に寄与する新たな治療法の創出を試みる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト正常骨芽細胞 (CC-2538, LONZA, Basel, Switzerland) は OGM Bullet Kit (CC-3207, LONZA) で、ヒト胎盤由来間葉系幹細胞 (C-12971, Promo Cell, Heidelberg, Germany) は間葉系幹細胞培地 (C-28010, Promo Cell) で、ヒト真皮線維芽細胞 (KF-4109, KURABO, Osaka, Japan) は 10% ウシ胎児血清および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン添加 DMEM にて、37°C、5% CO₂ 下で培養し、それぞれ P4~6 の細胞を実験に使用した。

(2) 骨分化誘導および軟骨分化誘導候補ペプチドのスクリーニング

ターゲットタンパク質配列の選定を行うため、プロテインデータベース (Uniprot) を用い、骨形成にかかわっているサイトカインである BMP-2、BMP-4 に着目した。その配列中に骨形成促進ペプチドが存在するのではないかと考えた。そこで、8種の異種動物の BMP 配列を用いアライメントすることにより、どの種の動物でも共通して保存されている配列こそが最重要配列であると考え、絞り込みを行った (図1)。

また、軟骨形成にかかわっているサイトカインである TGF-β でも、上記と同様に行った。

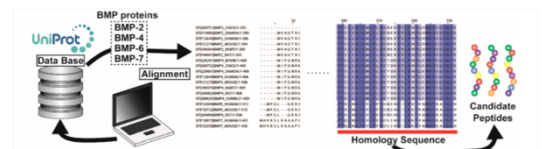


図1. 候補ペプチドの in silico スクリーニング

(3) 骨形成および軟骨形成促進能を有する機能性ペプチドの探索

ペプチドアレイ上におけるコンビナトリアルかつ独創的な細胞制御ペプチドスクリーニング法 (peptide array-based interaction assay of solid-bound peptide and anchorage-dependent cells (PIASPAC) 法: *Organic Chemistry*, 8(2)171-177, 2011) を発展させた骨分化促進ペプチドを、候補タンパク質中から細胞増殖能や ALP 活性より評価し、骨分化誘導候補ペプチドのリストアップを行った

(図 2)。

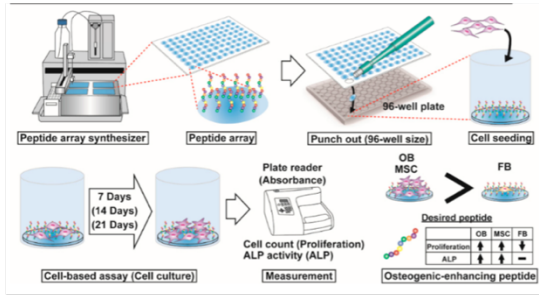


図 2. 骨分化促進ペプチドのスクリーニング

また同様に候補タンパク質中から細胞増殖能やアグリカン生成より評価し、軟骨分化誘導候補ペプチドのリストアップを行った。

(4) 機能性ペプチド付加担体の作成

生体吸収性材料として、ナノファイバーが細胞培養時に最適な自己配列 (Self-assembly) を行うヒドロゲル RAD-16 (Zhang S et al: *Curr Opin Chem Biol.* 6(6):865-71,2002) を使用した。絞られた候補ペプチドをヒドロゲルへ DMT-MM を用いた医療的安全性および副産物の生成ににくい縮合反応で作製した。

(5) 骨再生の評価

hUC-MSC を上記の担体中と混和し、骨分化誘導培地 (C-28013, Promo Cell, Heidelberg, Germany) にて培養し、hUC-MSC-担体複合体とした。2 週間培養後、培地中の ALP 活性にて最適なサンプルを決定した。

骨欠損モデルは、Nguyen らの方法 (Nguyen PD, *Plast Reconstr Surg.* 124 (6): 1829-39,2009.) に従い、ヌードラット上顎骨に欠損を作成した。欠損部に hUCMSCs-担体複合体を移植した実験群、移植しないものを対照群とした。移植後 12 週で CT 撮影を行い、最初の欠損部体積に対する割合で再生骨量を比較検討した。

(6) 軟骨形成の評価

hUC-MSC を上記の担体中と混和し、軟骨分化誘導培地 (C-28012, Promo Cell, Heidelberg, Germany) にて培養し、hUCMSC-担体複合体とした。2 週間培養後、サンプルを回収し、サンプル中のアグリカン量にて最適なサンプルを決定した。

軟骨欠損モデルは、Moyer らの方法 HR, (Moyer HR, *Tissue Eng Part A.* 16:2321-2330,2010) に従い、ヌードラット剣状突起に欠損を作成する。欠損部に hUC-MSC-担体複合体を移植した実験群、移植しないものを対照群とした。移植後 12 週で組織を採取し、サンプル中のアグリカン量を測定した。

4. 研究成果

(1) 骨再生

タンパク質配列中から 25 種類の 9 残基ペプチドの候補を取得した (表 1)。

表 1 候補ペプチド

No.	Peptide Sequences
(1)	HRINIEII
(2)	TRLLDTRLV
(3)	DVTPAVMRW
(4)	NHGFVVEVT
(5)	VEVTHLEEK
(6)	RHVIRISRL
(7)	SWSQIRPLL
(8)	RPLLVTFGH
(9)	TFGHDGKGH
(10)	LYVDFSDVG
(11)	SDVGWNDWI
(12)	NDWIVAPPG
(13)	AFYCHGECF
(14)	GECFPFLAD
(15)	PLADHLNST
(16)	LNSTNHAIV
(17)	HAIVQTLVN
(18)	TLVNSVNSK
(19)	VNSKIPKAC
(20)	PKACCVPT
(21)	VPTLSAIS
(22)	SAISMLYLD
(23)	EKVVLKQNYQ
(24)	KNYQDMVVE
(25)	MVEEGCGCR
	RGD
	Blank (no peptide)

この 25 配列に対し、骨芽細胞 (OB), 臍帯組織由来間葉系幹細胞 (UC-MSC)、線維芽細胞 (FB) を用いて、WST-8 活性にて細胞増殖能を解析した (図 3)。

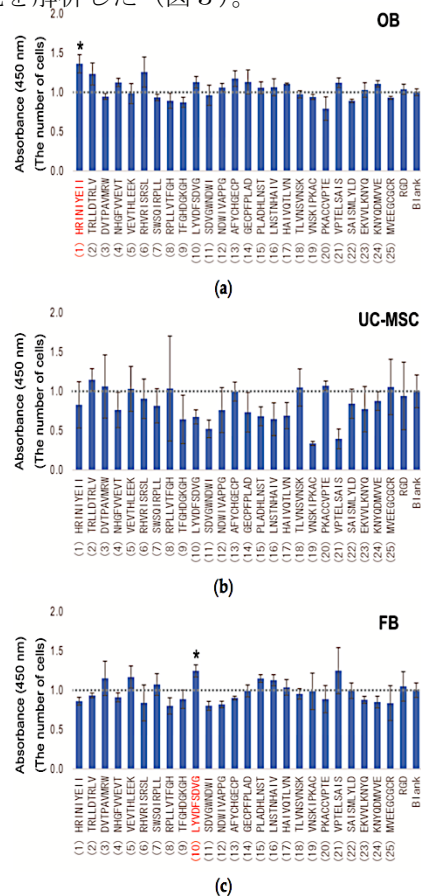


図 3 PIASPAC 法を用いた骨芽細胞 (OB), 臍帯組織由来間葉系幹細胞 (UC-MSC)、線維芽細胞 (FB) の WST-8 活性 (*blank との有意差 $p < 0.05$ を示す)

次に骨芽細胞 (OB), 臍帯組織由来間葉系幹細胞(UC-MSC)を用いて ALP 活性を測定した (図 4)。

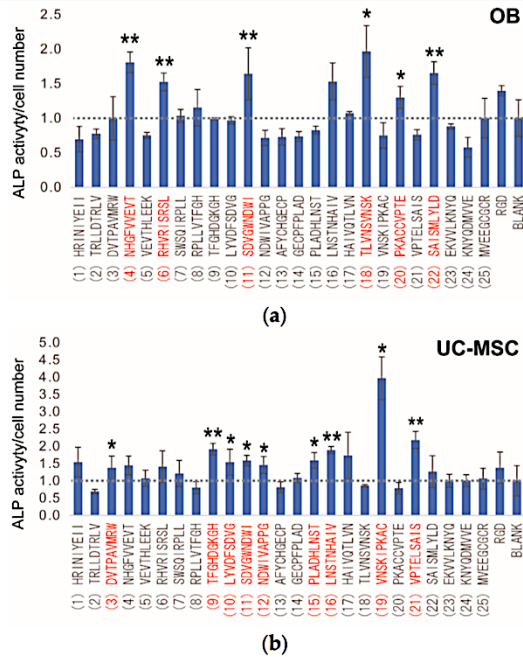


図 4 PIASPAC 法を用いた骨芽細胞 (OB), 臍帯組織由来間葉系幹細胞(UC-MSC)の ALP 活性 (*blank との有意差 $p < 0.05$, ** blank との有意差 $p < 0.01$ を示す)

以上の結果より骨分化促進ペプチドスクリーニング用にヒートマップを作成した (図 5a, b)。

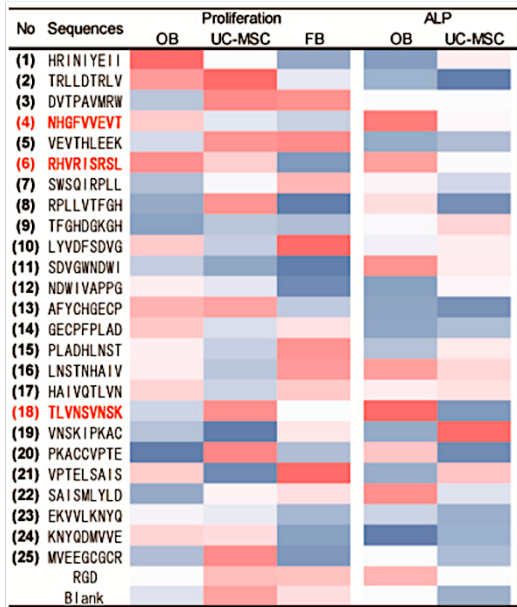


図 5a ヒートマップ
赤、青はそれぞれ細胞増殖と ALP 活性の高値、低値を示す。

No	Sequences	Proliferation			ALP		Score	
		OB	UC-MSC	FB	OB	UC-MSC	Proliferation	ALP
(1)	HRINIEYII	1.4	0.8	0.9	0.7	1.5	1.3	2.2
(2)	TRLLDTRLV	1.2	1.1	0.9	0.8	0.7	1.4	1.5
(3)	DVTPAVMRW	0.9	1.1	1.2	1.0	1.4	0.9	2.4
(4)	NHGFVVEVT	1.1	0.8	0.9	1.8	1.4	1.0	3.3
(5)	VEVTHLEEK	1.0	1.0	1.2	0.8	1.1	0.8	1.8
(6)	RHVRISRSL	1.3	0.9	0.8	1.5	1.4	1.3	2.9
(7)	SWSQIRPLL	0.9	0.8	1.1	1.0	1.2	0.7	2.0
(8)	RPLLVTFGH	0.9	1.0	0.8	1.2	0.8	1.1	2.2
(9)	TFGHDGKGH	0.9	0.6	0.9	1.0	1.9	0.6	2.9
(10)	LYVDFSDVG	1.1	0.7	1.2	1.0	1.5	0.6	2.5
(11)	SDVGWNDWI	1.0	0.5	0.6	1.6	1.6	0.7	3.2
(12)	NDWIVAPPG	1.1	0.8	0.8	0.7	1.5	1.0	2.2
(13)	AFYCHGCEP	1.2	1.0	0.9	0.7	0.8	1.3	1.5
(14)	GECPPFLAD	1.1	0.7	1.0	0.7	1.1	0.9	1.8
(15)	PLADHLNST	1.1	0.7	1.1	0.8	1.6	0.6	2.4
(16)	LNSTNHAIV	1.1	0.6	1.1	1.5	1.9	0.6	3.4
(17)	HAI VQTLVN	1.1	0.7	1.0	1.1	1.7	0.8	2.8
(18)	TLVNSVNSK	1.0	1.0	1.0	2.0	0.9	1.1	2.8
(19)	VNSKI PKAC	0.9	0.3	1.0	0.7	4.0	0.3	4.7
(20)	PKACCPVTE	0.8	1.1	0.9	1.3	0.8	1.0	2.1
(21)	VPTELSAIS	1.1	0.4	1.2	0.8	2.2	0.3	2.9
(22)	SAISMLYLD	0.9	0.8	1.0	1.7	1.3	0.7	2.9
(23)	EKVVLKNYQ	1.0	0.8	0.9	0.9	1.0	0.9	1.9
(24)	KNYQDMVVE	1.1	0.9	0.8	0.6	1.0	1.1	1.6
(25)	MVEEGCGCR	0.9	1.1	0.8	1.0	1.1	1.1	2.1
	RGD	1.0	0.9	1.0	1.4	1.4	0.9	2.8
	Blank	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0

図 5 b 骨分化促進係数
細胞増殖能の係数は OB + UC-MSC - FB で、ALP 活性の係数は OB + UC-MSC で算出した。以上の結果より、骨分化促進ペプチドとして 4、6、18 の 3 ペプチドに絞り込んだ。

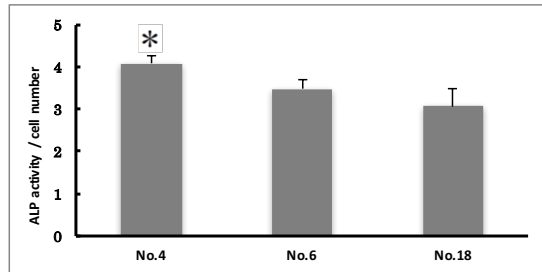


図 6 hUC-MSC-担体複合体の ALP 活性
3 種の骨分化促進ペプチドで修飾した担体に hUC-MSC を播種し ALP 活性を測定した。その結果、最終的に No.4 で移植実験を行うこととした。(* $p < 0.05$)

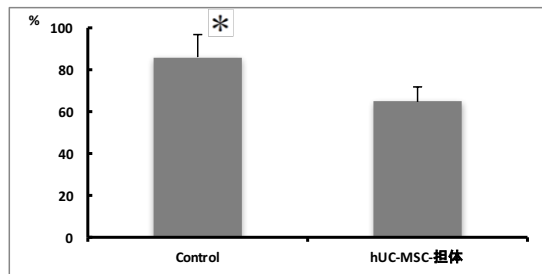


図 7 骨形成の評価
No.4 を修飾した担体に hUC-MSC を播種し、2 週間培養後に動物モデルへ移植した。実験群の方が骨形成が低い結果となった。(* $p < 0.05$)

骨様組織の形成は認めるものの、元来の骨組織と比較し、かなり劣った骨形成しか認めないという結果であった。

(2) 軟骨再生
骨分化促進ペプチドの探索と同様の手法で、TGF- β の配列をもとに軟骨分化促進ペプチドの候補を 5 つペプチドに絞った。
これらを担体へ修飾したのち、hUC-MSC を播種、軟骨分化誘導培地にて 2 週間培養し、

サンプル内のアグリカン定量を行い、候補ペプチドの最適化を行った（図8）。

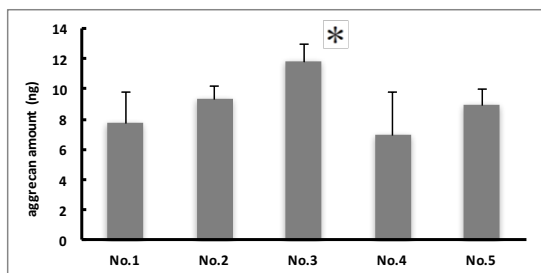


図8 hUC-MSC-担体複合体のアグリカン量5種の軟骨分化促進ペプチドで修飾した担体にhUC-MSCを播種しアグリカン量を測定した。その結果、最終的にNo.3で移植実験を行うこととした。（* $p < 0.05$ ）

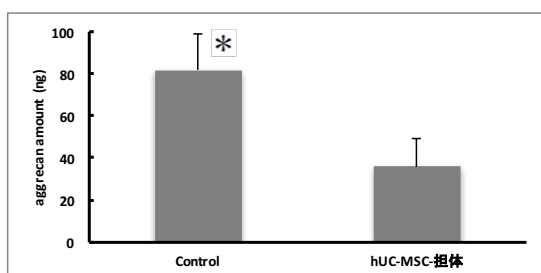


図9 軟骨形成の評価
No.3を修飾した担体にhUC-MSCを播種し、2週間培養後に動物モデルへ移植した。実験群の方が軟骨形成が低い結果となった。（* $p < 0.05$ ）

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 1 件）

- ① Kanie K, Kurimoto R, Tian J, Ebisawa K, Narita Y, Honda H, Kato R. Screening of Osteogenic -Enhancing Short Peptides from BMPs for Biomimetic Material Applications. **Materials**. 2016 Aug 25;9(9). pii: E730. doi: 10.3390/ma9090730 (査読あり) .

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蛭沢 克己 (EBISAWA, Katsumi)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号:20397459

(2) 研究分担者

亀井 譲 (KAMEI, Yuzuru)
名古屋大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号:10257678

加藤 竜司 (KATO, Ryuji)

名古屋大学・創薬科学研究科・准教授
研究者番号：50377884

蟹江 隼 (KANIE, Kei)

名古屋大学・創薬科学研究科・助教
研究者番号：80636407

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()