

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861814

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞集塊clumps-MSCsによる歯周組織再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of periodontal tissue regenerative therapy by using clumps of MSCs/ECM complex

研究代表者

加治屋 幹人(Mikihito, Kajiya)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：00633041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、間葉系幹細胞(MSCs)の移植が組織再生療法に有用であることが明らかとなっていた。しかし、そのMSCsを用いる人工足場材料が、移植できる細胞数や細胞機能を制約するという問題点が残っている。そこで、本研究において、申請者はMSCsと細胞自身が産生する細胞外基質(ECM)を利用して間葉系幹細胞集塊Clumps of MSCs/ECM complex (C-MSC)を樹立し、このC-MSCは石灰化能を制御し、人工足場材料を用いることなく欠損組織に移植可能で、優れた組織再性能を示すことを明らかにした。この成果はCytotherapyに掲載された。

研究成果の概要(英文)：The transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs) to damaged tissue has attracted attention in scientific and medical fields as an effective regenerative therapy. Nevertheless, additional studies are required to develop an MSC transplant method for bone regeneration because using an artificial scaffold restricts the number of transplanted cells and their function. Furthermore, regulating the degree of cell differentiation in vitro is desirable for a more effective regenerative therapy. To address these unresolved issues, by using self-produced extracellular matrix (ECM), we developed clumps of an MSC/ECM complex (C-MSCs). As a result, an applicant have demonstrated that C-MSC can be induced into osteogenic differentiation and its transplantation with no artificial scaffold facilitates effective bone regeneration in rat. This result has been published in Cytotherapy.

研究分野：歯周治療

キーワード：間葉系幹細胞 間葉系幹細胞集塊 スキャフォールドフリー C-MSC

## 1. 研究開始当初の背景

重度歯周炎や侵襲性歯周炎といった大規模組織破壊疾患に対して、生体外から大量の細胞を供給する細胞治療法の開発が進められており、特に間葉系幹細胞 (MSCs) を利用した研究が注目を集めている。MSCs は患者自身の骨髄から安全に分離でき、遺伝子導入などの操作を必要とせず、多分化能・増殖能を発揮するため、現在のところ、最も安全・確実に臨床応用できる細胞である。しかしながら、前述した複雑で大規模な組織破壊に対しては期待されるほどの再生効果を示していない。この原因の一つに人工足場材料の問題が挙げられる。細胞移植治療において、その足場となる材料の性質が、移植できる細胞数及びその細胞機能に影響を与えると考えられるが、これまでのところ、理想的な足場材料は登場していない。

## 2. 研究の目的

上記の事実に基づき、人工足場材料を必要としない MSCs 移植方法が確立されれば、より効果的な組織再生を達成できると仮説を立てた。そこで、本研究では MSCs と自己産生された ECM を利用して間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex を樹立し、その移植による骨再生効果を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

F344 ラット大腿骨から分離した MSCs を、24well プレートに播種し、50 µg/ml のアスコルビン酸含有の増殖培地 (DMEM + 10% FBS) にて 7 日間培養した。これをマイクロピペットチップにてこそぎ、ECM と MSC から構成される細胞シートの状態を剥離させ、この浮遊した MSCs/ECM 複合体をさらに増殖培地にて培養することによって、細胞集塊 C-MSC を得た (図 1)。

C-MSC 内部の生存細胞を DNA コンテントおよび PI 染色による FACS にて評価し、細胞とタイプ I コラーゲンの分布について、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光免疫染色によって観察した。

また、C-MSC を骨分化誘導培地にて培養し OPN mRNA および蛋白発現、ALP 活性、カルシウム濃度を測定した。

ラット頭蓋冠に直径 1.6mm の骨欠損を作成し、これに人工足場材料を用いることなく C-MSC、もしくは石灰化誘導された C-MSC を直接移植し、4 週間後にマイクロ CT スキャンおよび組織学的解析によって骨再生効果を観察した。対照群として、アテロコラーゲンゲルに MSCs を混和させたものも同様に移植し評価した。

## 4. 研究成果

C-MSC 内部の細胞の DNA コンテントを定量したところ、増殖培地にて培養されている期間において特に減少することはなかった (図 2A)。これと同様に、死細胞を PI にて染色し、FACS にて評価したところ、C-MSC 内部の細胞の約 90% が生存していることが示された (図 2B)。

蛍光免疫染色の結果、C-MSC が Type I Collagen によって形作られた細胞集塊であることが明らかとなった (図 2C)。

C-MSC を石灰化誘導培地にて培養すると、経時的に OPN 発現、ALP 活性、カルシウム沈着量が上昇することが示され、C-MSC は in vitro にて分化程度を制御できることが示された (図 3)。

ラット頭蓋冠骨欠損部分に人工足場材料を用いることなく C-MSC を移植できることが確認された (図 4A)。また、通常培養された C-MSC もしくは石灰化誘導培地にて培養された C-MSC の移植 4 週後に明らかな骨再生が認められた (図 4B, 4C)。さらに、石灰化誘導された C-MSC の移植は欠損部周囲のみならず、欠損中央部からも異所性に骨形成をしてい

る像が観察された(図4C)。一方、アテロコラーゲンゲルと混和した MSCs の移植は、何も移植しなかった群と同様に骨再生を誘導できなかった(図4)。

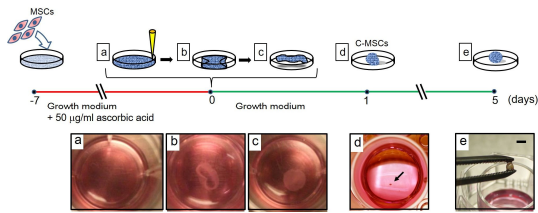


図1. C-MSCの作成方法

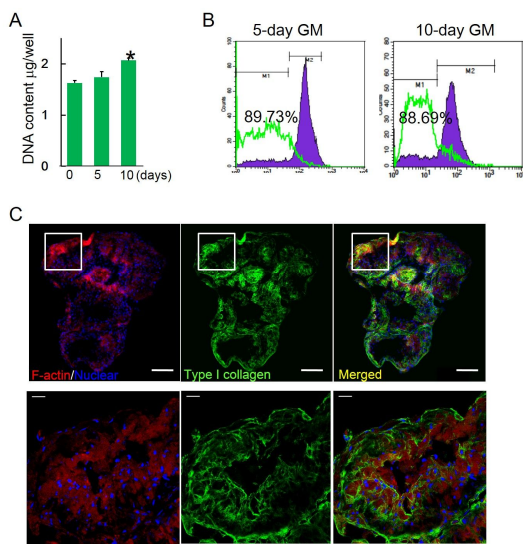


図2. C-MSC 内部の細胞と ECM の状態

A. 各培養期間の C-MSC 内部の DNA コンテンツ。  
B. 各培養期間の C-MSC 内部の生存細胞数  
C. C-MSC 内部の免疫染色像。F-actin (赤)、核(青)、タイプIコラーゲン(緑)

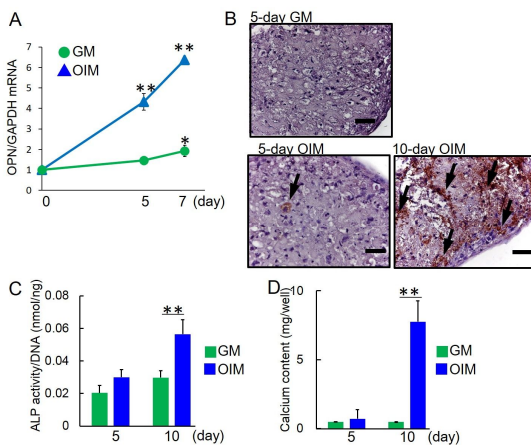


図3. C-MSC の石灰化誘導

A. OPN mRNA 発現レベル。GM: 通常培地にて培養された C-MSC。OIM: 石灰化誘導培地にて培養された C-MSC

B. OPN 蛋白発現(免疫染色)。5-day GM: 通常培地にて5日間培養された C-MSC。5-day OIM: 石灰化誘導培地にて5日間培養された C-MSC。10-day OIM: 石灰化誘導培地にて5日間培養された C-MSC。

C. ALP activity. GM: 通常培地にて培養された C-MSC。OIM: 石灰化誘導培地にて培養された C-MSC

D. カルシウム沈着量: GM: 通常培地にて培養された C-MSC。OIM: 石灰化誘導培地にて培養された C-MSC

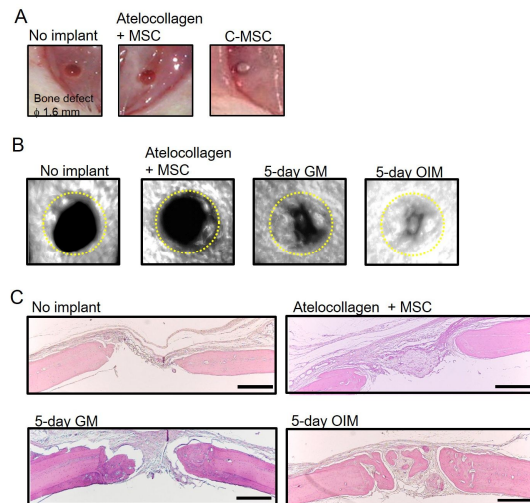


図4. ラット頭蓋冠骨欠損に対する C-MSC の移植効果

A. 欠損作成、C-MSC 移植時の肉眼所見

B. 移植4週後のマイクロCT画像。5-day GM: 通常培地にて5日間培養された C-MSC 移植。5-day OIM: 石灰化誘導培地にて5日間培養された C-MSC 移植。

C. 移植4週後の HE 像。5-day GM: 通常培地にて5日間培養された C-MSC 移植。5-day OIM: 石灰化誘導培地にて5日間培養された C-MSC 移植。

これらの成果は Cytotherapy に掲載された。

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 1 件)

1. Mizuho Kittaka, Mikihito Kajiya (equally first author), Hideki Shiba, Manabu Takewaki, Kei Takeshita, Khung Rathvisal, Takako Fujita, Tomoyuki Iwata, Truong Quoc Nguyen, Kazuhisa Ouhara, Katsuhiko Takeda, Tsuyoshi Fujita, and Hidemi Kurihara

Clumps of a mesenchymal stem cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration

Cytotherapy, 17 (2015) 860-873 査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 加治屋幹人

三次元培養で実現する有効・安全な組織再生技術の新展開

日本組織培養学会第88回大会  
(シンポジスト招待講演)

2015年5月26日~5月27日  
広島県広島市

〔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

加治屋 幹人 (Mikihito Kajiya)

広島大学・大学病院・助教

研究者番号：00633041

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：