

令和 2 年 11 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05044

研究課題名(和文) Direct Conversion誘導基質による臍帯由来細胞からの骨再生法の開発

研究課題名(英文) Direct conversion of umbilical mesenchymal stem cells facilitates the bone regeneration

研究代表者

住田 吉慶 (SUMITA, Yoshinori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：50456654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、in vivo Direct Conversionを誘導する遺伝子活性化基質によって、生体内で臍帯由来MSCを骨芽細胞へ直接分化させることで、簡便で確実な骨組織の再生法を開発することにある。即ち、培養により大量に増殖させた臍帯MSCと、骨芽細胞分化を誘導する遺伝子群を組み込んだ基質を一体化して骨欠損部へ移植することで、顎骨の再生を図る。本研究期間中の成果としては、細胞骨格因子であるアクチンの脱重合に関わる遺伝子群とBMPシグナルの制御に関わるmiRNA群をGAMに応用し、それを臍帯MSCの担体とすることで骨再生を促す技術の可能性について一定の知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の独創的な点は、臍帯MSCの利点を最大限に活用するin vivo Direct Conversionの手法によって、骨芽細胞分化と血管網構築の両面から効果的に骨再生を成し遂げようとするところである。本研究の研究分担者らは、様々な希少・難治疾患に対する臍帯MSCの応用研究を実施しており、そのための系統的資源化を推し進めている。同種移植可能で、安定供給が可能である細胞による効果的な骨再生法を開発できれば、革新的な細胞治療法が実現する。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic method for in vivo stem cell or gene delivery has not been established on bone engineering though its potential usefulness has been suggested. Meanwhile, human umbilical cord-derived MSCs (UC-MSCs) have a higher proliferative potential and an ability to differentiate into osteoblasts. Moreover, UC-MSCs are thought to be able to be applied in an allogeneic setting without eliciting host immune responses. However, the osteoblastic differentiation ability of UC-MSCs is limited when compared with that of bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs). Therefore, we have made a try at developing an atelocollagen-based gene activated matrix (GAM) containing plasmid DNAs encoding the genes which induce the direct conversion to osteoblasts to UC-MSCs in vivo. Then, in this study, we found GAM containing the genes related to the actin-depolymerization and/or miRNAs related to BMP signals may be useful to induce the direct conversion to osteoblasts from UC-MSCs in vivo.

研究分野：口腔外科・再生医学

キーワード：骨再生 間葉系幹細胞 同種細胞移植 遺伝子 生体材料 骨芽細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

顎骨欠損の再生は重要な課題であるが、現在のところ、外科的侵襲を要し、採取量に限界のある新鮮自家骨移植に代わる有効な方法は無い。申請者らは、現在までに人工代用骨に骨誘導能を付与するために、骨形成蛋白質 (BMP) を応用した骨再生を試みてきた。その中で、老齢な高等動物の大きな骨欠損を確実に再生するには、成長因子単独の移植ではなく、それに応答する細胞の添加が有効であることを明らかにした。その後、我々は自己骨髄由来の間葉系幹細胞 (MSC) を用いた歯槽骨再生の第 I 相臨床研究にて、一定の成果を得たものの、培養細胞の増殖・分化能に個体差が大きく、培養操作には多大な労力と経費を要することが明らかになった。更に、初代培養 MSC は高い可塑性を有するが、移植に必要な細胞数を確保するために培養を重ねると、急速に可塑性を失うことも見出した。一方で、大きな骨欠損の修復には、移植細胞周囲に速やかに血管網を誘導することが重要であることは周知の事実である。そのため、我々は、骨芽細胞に分化可能で、血管網の構築にも寄与する移植細胞を探索し、その必要十分量を簡便に確保する手段を検討することが重要であるとの考えに至った。

一方で、近年細胞の周辺環境や遺伝子発現に人為的な操作を加えることで、分化状態を強制的に変換して全く別の形質の細胞を生み出せることが明らかになった。この現象は Direct Reprogramming と呼ばれ、主に線維芽細胞にターゲットとする細胞の運命決定因子と言える転写因子と初期化因子を併せて組み込むことで、心筋細胞や軟骨細胞などに直接分化転換させることが可能になっている。この目的の細胞を直接誘導する Direct Reprogramming の手法については、膵臓外分泌細胞をインスリン産生  $\beta$  細胞に生体内で変換させる *in vivo* Direct Conversion が報告されており、このような手法によって移植細胞を生体内で直接骨芽細胞へ転換できれば、培養や分化誘導に関わる過程を簡略化し、確実性の高い骨再生を実現できると考えられる。

本研究は、これらの背景から 1) 移植に有効な細胞を安定的に十分量確保できること、2) 移植細胞の分化転換を誘導する生体材料を開発することの 2 点を念頭に立案した。まず、細胞について、我々はこれまで骨髄や脂肪、歯髄・歯根膜由来の MSC を応用し、骨組織の再生に取り組んできた。中でも、BMP の臨床応用を目指した研究を中心に行ってきたが、BMP による浮腫誘発の副作用とコストの問題を解決するには至っていない。そのため、最近では BMP4 をコードする遺伝子活性化基質 (gene activated matrix; GAM) を作製して、脂肪 MSC を生体内で骨芽細胞へ分化誘導する試みも行ってきた。しかしながら、分化誘導は可能であるものの、その効率は十分ではなく、ヒト脂肪 MSC の分化能に個人差が大きいのも問題である。そこで我々は、組織採取が確実にでき、高い増殖能を発揮するにも関わらず、培養を重ねても未分化性が失われない臍帯 MSC に着目した。臍帯 MSC は、その系統的資源化 (バンキング) が進められており、HLA-class II の発現を認めず、低免疫原性を備えていることから、同種移植での使用が期待される。臍帯は出産時に確実・豊富に採取でき、MSC も容易に増殖することから、バンキングが進めば、HLA-class I 抗原の一致する細胞を用いることは容易く、骨再生に対する細胞の安定供給源として非常に有用性が高い。しかしながら、臍帯 MSC は骨髄 MSC と比較して、より未分化な状態にあり、骨髄 MSC の骨分化誘導培地では、骨芽細胞への分化に時間を要し、その効率は低い。一方で臍帯 MSC は、移植局所で血管内皮細胞に分化し、血管網を構築する能力を持つことが明らかになった。これについては、骨髄 MSC と比較して高い能力を持つことが既に報告されている。そのため、骨芽細胞への誘導性を解決できれば、骨再生に有用な移植細胞源になると考えられる。バンキングにより大量に確保できる同種移植可能な未分化細胞で、血管網の構築をも期待できる利点は計り知れない。

次に、Direct Conversion 誘導基質の開発に関して、近年 mi RNA を用いた効率的な多能性細胞の作製に関する報告が相次いでおり、例えば、ヒト脂肪 MSC から iPSC を誘導するのに、従来の初期化因子と比較して、Oct4 や Sox2 をターゲットとする miR302s や 200c、369s を使用すると、短期間に 100 倍以上の効率で初期化を達成できる。又、分化転換について、初期化因子と軟骨形成転写因子 Sox9 を導入することで、線維芽細胞を軟骨様細胞へ転換できることが示されている。一方で、BMP2 遺伝子を組み込んだプラスミドベクターとリン酸カルシウムをコラーゲン溶液で混合し、凍結乾燥して作製した GAM を骨欠損へ移植することで、効率は十分ではないものの、骨を再生し得ることが示されており、申請者らも BMP4 遺伝子をコードするプラスミドとアテロコラーゲンにより作製した GAM を用いて、ラット頭蓋骨の増生を一部確認している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*in vivo* Direct Conversion を誘導する遺伝子活性化基質 (GAM) によって、生体内で臍帯由来間葉系幹細胞 (臍帯 MSC) を骨芽細胞へ直接分化させることで、簡便で確実な骨組織の再生法を開発することにある。即ち、培養により大量に増殖させた臍帯 MSC と、骨芽細胞分化を誘導する遺伝子群を組み込んだ基質を一体化して骨欠損部へ移植することで、顎骨の再生を図る。現段階では、臍帯 MSC の骨再生に対する有用性は確立されていない。本

研究では、系統的資源化が期待される臍帯 MSC を骨再生の有効な細胞源として確立させることを念頭に、臍帯 MSC の移植細胞としての利点を最大限に活用した新規骨再生法を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 臍帯 MSC の分離：

ヒト臍帯MSCは、東京大学医科学研究所の臍帯血・臍帯バンクで分離・培養された臍帯MSC を分与いただき、これらの細胞を継代して解析に用いた。一方で、マウス臍帯MSCの分離方法は、非医薬品のCollagenaseを必要としないExplant法にてMSCを分離する方法を応用した。具体的には、上記マウス胎生18日の胎仔を取り出し、羊膜を切除後、臍帯 (Wharton's jelly) を採取し、細断した。細断組織は乾いた培養皿に貼り付け、組織片が少し乾燥して皿に張り付いた時点で、10%FBS含有 $\alpha$ MEM培地にて培養を開始した。その後、細胞がconfluentになった時点で、細胞を組織片ごと回収後、セルストレイナーにて細胞のみを回収し、2~3継代することで、臍帯MSCを得た。

#### (2) 細胞の特性解析：

ヒト臍帯 MSC は、MSC としての表現型 (CD73<sup>+</sup>, 90<sup>+</sup>, 105<sup>+</sup>, HLAclass I<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, HLAclass II<sup>-</sup>) と、未分化性の指標である ES 特異的マーカー (Nanog, Oct4, Klf4, Rex1, Sox2, SSEA4) の発現を 9 継代目でも維持している。そこで、マウス臍帯 MSC についても、MSC の表現型 (positive; CD29, Sca-1 / negative; CD11b, 45) と、未分化性に関する ES 特異的マーカー (Nanog, Oct4, Klf4, Sox2, SSEA1) の発現を骨髄 MSCs と比較して、特性を解析した。又、骨分化誘導について、骨分化培地 (dexamethasone + ascorbic-acid +  $\beta$ -Glycerophosphate) と recombinant (r) BMP2 の添加による誘導性を検証し、その困難性の程度を把握した。

#### (3) 導入遺伝子の探索：

臍帯 MSC を 80% confluent まで増殖させた後、前述の骨分化培地に rBMP2 を添加した誘導培地で培養を行なった。誘導培地に交換する直前を Day0 とし、分化が成熟してくる Day7~Day21 までの細胞について、2 日毎に total RNA を抽出・精製し、その miRNA の発現プロファイルマイクロアレイにより網羅的に解析した。Day0 における発現プロファイルと、Day7~21 までの発現データを比較し、いずれかの時点での発現レベルに 3 倍以上の上昇があった miRNA を抽出し、5 因子程度を候補にすることとした。対照として骨分化能の高い皮質骨 MSC でも同様の解析を行ない、臍帯 MSC で特に上昇のある因子について考慮した。一方で、臍帯 MSC では、初期化因子の Oct4 や Sox2, Klf4 の発現が維持されている。そのため、これらの発現の増強や抑制に関わる miRNA を探索した。Oct4 や Sox2 をターゲットとする miR302S, miR200c, miR369 は、従来の初期化因子と比較して、ヒトやマウスの MSC から短期間・高効率に iPSC を誘導することが報告されているので、このようなものを候補として探索した。候補とした遺伝子は、培養臍帯 MSC への導入での評価や、遺伝子の GAM への搭載による移植実験により有効な因子の探索を実施した。また、培養には、通常培養のほか、Type コラーゲンによるゲル上培養なども実施し、異なる培養条件下での臍帯 MSC からの骨芽細胞への分化誘導性や導入遺伝子の有効性などについて検討を加えた。

#### (4) GAM 基質作製：

プラスミドベクターとリン酸カルシウムをコラーゲン溶液に混和し、凍結乾燥することを基質作製の基本とした。コラーゲンについては、miRNA を組み込むために、アテロコラーゲンを用いた。リン酸カルシウムは DNA 吸着と細胞貪食による遺伝子の効率的な取り込みを目的に添加するが、その微細粒子や顆粒などを使用し、遺伝子導入効率の向上を試みた。

#### (5) 頭蓋骨再生モデルへの移植：

免疫不全と野生型の両方のマウスにて頭蓋骨膜下に移植を行ない、骨組織形成能を評価した。また、GAM 基質と搭載遺伝子のみでの評価には、野生型ラットを使用した。移植試料は、臍帯 MSC を GAM に播種し、移植を行なった。移植後は、経時的に高速  $\mu$ CT を撮影することで、同一個体での硬組織形成を評価すると共に、試料を 2, 4, 6, 8 週などで回収し、組織学・免疫組織学的に骨形成を評価した。

### 4. 研究成果

実験は、マウスを用いた臍帯 MSC の分離・培養から開始した。胎生 18 日の C57BL/6 マウスを取り出し、羊膜を切除後に臍帯を採取し、細断した組織から細胞を分離して、2~3 継代した細胞の特性を解析したところ、MSC の表現型である CD29, Sca-1 陽性、CD11b, CD45 陰性の細胞群を得ることができた。次に、ヒトとマウスの臍帯 MSC について、それらの骨芽細胞分化の誘導性に関する評価を開始した。骨分化誘導培地 (dexamethazon, ascorbic-acid,  $\beta$ -Glycerophosphate) に BMP2,3,4,5,6,7, VitD, PTH, PDGF-bb などと組み合わせることで、効果的に骨分化を誘導する条件を検討した。その結果、様々な条件で誘導を行っても、培養 1 週間での ALP 活性など有意に上昇するものの、骨髄 MSC と比較して低く、骨髄 MSC と同等

の活性を示すレベルへの誘導は困難であった。ヒト臍帯 MSC にて骨髄 MSC と比較して困難であることを確認した後、マウス臍帯 MSC でも検討を実施したが、同様の結果であった。そのため、臍帯 MSC の骨芽細胞への分化誘導性の向上や培養期間の短縮を目指し、新たな培養条件の検討を行った。その中で、コラーゲンゲル上に細胞を播種して培養を行うと、1 週間程度で骨芽細胞分化の誘導性が有意に向上することを確認できた。そして、その培養期間中に変動する遺伝子群を検索したところ、BMP 遺伝子のシグナルカスケードの下流に存在し、細胞骨格因子であるアクチンの脱重合に関与する遺伝子の発現上昇が顕著であることが明らかとなった。そのため、臍帯 MSC や骨髄 MSC の骨芽細胞分化誘導中のアクチン脱重合の状態を通常の培養皿とゲル上とで比較検討したところ、ゲル上培養中の臍帯 MSC ではアクチンの断片化が進むことで骨芽細胞分化の誘導が容易になっていることが示唆された。一方で骨芽細胞分化誘導中の miRNA 発現に関するマイクロアレイを実施したところ、BMP 遺伝子の発現をサポートするいくつかの miRNA の発現変動が確認された。そのため、これらの miRNA 群を臍帯 MSC や骨髄 MSC へ導入することで骨芽細胞分化への影響を検討したところ、導入による誘導性の向上が認められた。さらに、このような miRNA を搭載した GAM を作製し、ラット頭蓋骨膜下に移植を実施したところ、効率の問題はあるものの、生体局所でこれらの miRNA が直接局所の細胞に取り込まれることで骨再生を誘導し得ることも確認された。このような知見をもとにして、アクチン脱重合に寄与する遺伝子や骨芽細胞分化を誘導する遺伝子 (miRNA など) の両方を導入することの有効性について検討を実施することとし、まずそれらの培養中での骨芽細胞分化への誘導性を評価した。しかしながら、その条件設定は未だ検討中であるものの、臍帯 MSC への導入効果は、ゲル上培養での通常の骨芽細胞分化刺激以上に明確なものではなかった。そこで、これらの遺伝子を搭載した GAM にヒト臍帯 MSC を播種した試料を作製し、それを移植して直接的に機能評価を実施したところ、有効性に関する一部の知見を得ることができた。そのため、この GAM の機能をさらに高くするため、搭載するベクターや基質材料などの条件を検討することとした。ベクターについては、微小サイズの高分子ベクターの応用を現在試みているところであるが、リン酸カルシウムの微粒子を応用したところ、生体内での遺伝子導入効率の改善に一定の知見が得られた。そのため、現在これらの微粒子と顆粒の適切な配合比の条件などを微小サイズベクターの組みあわせと共に、その最適化を図っているところである。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 8 件 )

1. Ohba S, Sumita Y, Nakatani Y, Noda S, Asahina I. Alveolar bone preservation by a hydroxyapatite/collagen composite material after tooth extraction. Clin Oral Imvestig. 23(5):2413-2419, 2019. ( 査読有 ) doi: 10.1002/jbm.b.34384
2. Egashira K, Sumita Y\*, Zhong W, Takashi I, Ohba S, Nagai K, Asahina I: Bone marrow concentrate promotes the bone regeneration with a suboptimal-dose BMP-2. 18;13(1): e0191099, 2018. ( 査読有 ) doi: 10.1371/journal.pone.0191099
3. Bakkar M, Liu Y, Fand D, Stegen C, Su X, Ramamoorthi M, Lin LC, Kawasaki T, Nakhoul N, Pham H, Sumita Y, Tran SD. A simplified and systematic method to isolate, culture and characterize multiple types of human dental stem cells from a single tooth. Methods Mol Biol. 1553:191-207, 2017. ( 査読有 ) doi: 10.1007/978-1-4939-6756-8\_15
4. Nakatani Y, Agata H, Sumita Y, Koga T, Asahina I\*. Efficacy of freeze-dried platelet-rich plasma in bone engineering. Arch Oral Biol. 73:172-178, 2017. ( 査読有 ) doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.006
5. 住田吉慶\*: 難治性口腔疾患を対象とした再生医療. 長崎県歯科医師会学術誌, 第 2 巻 1 号, 37-41, 2017. ( 査読無し )
6. Koga T, Minamizato T, Kawai Y, Miura K, I T, Nakatani Y, Sumita Y, Asahina I. Bone regeneration using dentin matrix depends on the degree of demineralization and particle size. PLoS One. 21;11(1): e0147235, 2016. ( 査読有 ) doi: 10.1371/journal.pone.0147235
7. Ohba S, Sumita Y, Umebayashi M, Yoshimura H, Yoshida H, Matsuda S, Kimura H, Asahina I, Sano K. Onlay bone augmentation on mouse calvarial bone using hydroxyapatite/collagen

composite material with total blood or platelet-rich plasma. Arch Oral Biol. 61:23-27, 2016. ( 査読有 ) doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.10.012

8. Umabayashi M, Sumita Y, Kawai Y, Watanabe S, Asahina I. Gene activated-matrix with atelocollagen/ tricalcium-phosphate and plasmid DNA encoding BMP4 or Runx2 promotes rat calvarial bone augmentation. Biores Open Access. 4(1): 164-174, 2015. ( 査読有 ) doi: 10.1089/biores.2014.0057.

[ 学会発表 ] ( 計 9 件 )

1. Shido R, Sumita Y, Hara M, Narahara S, Asahina I: Gene Activated-matrix (GAM) comprised of atelocollagen and plasmid DNA encoding microRNA promotes rat cranial bone augmentation., The American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, Montreal, Canada, October, 2018.
2. Iwatake M, Sumita Y, Nagamura T, Asahina I: Actin-depolymerization inducing by Col-1 culture accelerates osteoblastic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. 5th TERMIS World Congress, Kyoto, Japan, September 2018.
3. 住田吉慶: シンポジウム「骨代謝学と口腔外科学のクロスオーバーからクロスイノベーションへ」【歯槽骨の再生を目指した細胞治療開発への挑戦】第 36 回日本骨代謝学会学術集会, 2018 年 7 月 26 日-28 日, 長崎ブリックホール ( 長崎県長崎市 )
4. Sumita Y: Translational Research: Cell-based therapy to repair oral tissues, Keynote lecture, 13<sup>th</sup> Annual Graduate Research Day, Montreal, Canada, April 2018.
5. 住田吉慶: 老化と口の疾患に挑戦する再生医療 -健康長寿のために- 招待講演, 日本口腔インプラント学会第38回中部支部学術大会, 名古屋, 11月 2017.
6. Egashira K, Sumita Y, I T, Shiraishi T, Asahina I: Non-cultured adipose-derived cells promote the bone augmentation induced by low-dose BMP-2:10th World Biomaterial Congress (WBC), (Montreal, Canada), 2016.
7. Umabayashi, Y Sumita, I Asahina I: Bone augmentation by gene activated matrix composed of plasmid DNA, BMP4 or Runx2 embedded in atelocollagen. 10th World Biomaterial Congress (WBC), (Montreal, Canada), 2016.
8. 住田吉慶: 再生療法が可能にする歯科治療. 九州臨床再生歯科研究会, 福岡, 2016.
9. 住田吉慶, 黒嶋伸一郎, 澤瀬隆, 朝比奈泉: 難治性口腔疾患を対象とした再生療法—基礎から臨床研究段階までの長崎大学の取り組み—. 第16回長崎口腔科学フォーラム, 長崎, 2016.

[ 産業財産権 ]

○出願状況 ( 計 2 件 )

1. 名称: ヒト臍帯由来間葉系幹細胞から骨芽細胞の製造を目的としたアクチン重合阻害剤による分化誘導技術  
発明者: 住田吉慶, 岩竹真弓, 朝比奈泉, 小守壽文  
権利者: 国立大学法人 長崎大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2018-069695  
出願年: 2018  
国内外の別: 国内
2. 名称: ヒト臍帯由来間葉系幹細胞から骨芽細胞の製造を目的としたアクチン重合阻害剤による分化誘導技術

発明者：住田吉慶、岩竹真弓、朝比奈泉、小守壽文  
権利者：国立大学法人 長崎大学  
種類：特許  
番号：PCT/JP2019/015045  
出願年：2019  
国内外の別：国外

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：朝比奈 泉  
ローマ字氏名：ASAHINA, Izumi  
所属研究機関名：長崎大学  
部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：30221039

研究分担者氏名：小守 壽文  
ローマ字氏名：KOMORI, Toshihisa  
所属研究機関名：長崎大学  
部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：00252677

研究分担者氏名：長村 登紀子  
ローマ字氏名：NAGAMURA, Tokiko  
所属研究機関名：東京大学  
部局名：医科学研究所  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：70240736

研究分担者氏名：各務 秀明  
ローマ字氏名：KAGAMI, Hideaki  
所属研究機関名：松本歯科大学  
部局名：総合歯科医学研究所  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：80242866

研究分担者氏名：黒嶋 伸一郎  
ローマ字氏名：KUROSHIMA, Shinichiro  
所属研究機関名：長崎大学  
部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：40443915

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。