

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20480

研究課題名(和文) 浮遊培養による純化間葉系幹細胞スフェアを用いた顎骨組織再生技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of regenerative technique for jaw bone using MSCs spheroids culture using with floating condition.

研究代表者

新部 邦透(Niibe, Kunimichi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50468500

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)：本研究はまず、接着培養にて未分化性を喪失した間葉系幹細胞(MSCs)を、我々が開発した振盪培養法を用いることで、その未分化性を回復し、長期的に新鮮なMSCsを供給可能な細胞塊(スフェア)を形成する技術を開発し、国内特許出願につなげる事ができた。さらに、このMSCsスフェアを顎骨再生に応用するために、骨分化誘導を試みた。結果、再接着させたMSCsスフェアから遊走した細胞は効率よくアルカリフォスファターゼ陽性となったが、スフェア自体は陽性細胞が少なく、未分化性が高い状態が維持されている可能性が示唆されている。そこで、現在はこのスフェアを3次元的に骨芽細胞へ誘導する技術開発に着手している。

研究成果の概要(英文)：We successfully established the newly culture method for mesenchymal stem cells (MSCs) to keep their stem-ness under shaking condition. MSCs are getting spheroids with shaking culture method. MSC spheroids can supply undifferentiated MSCs for a long period. This technology is patent pending. Moreover, We try to generate bone tissues with MSC spheroids to apply jaw bone regeneration. From our results, MSC spheroid can re-attach on a culture dish. Then, migrated cells from MSC spheroids are positive for alkaline phosphatase (ALP) after osteogenic induction. However, there are few positive cells in spheroids itself after ALP staining. It suggested that MSC spheroid kept their stem-ness robustly. From these findings, we are trying to establish the newly osteogenic induction method using MSC spheroids.

研究分野：再生歯科

キーワード：間葉系幹細胞 神経堤幹細胞 振盪培養 浮遊培養 未分化性維持 骨再生 スフェア

1. 研究開始当初の背景

現在の補綴歯科治療は人工材料による修復・補填治療が一般的であり、症例によってはインプラント療法が用いられる。しかしながら、インプラント治療は脆弱な顎骨には適応することができず、自家骨や他家骨・人工材料を用いた骨増成が適応される。しかし、自家骨・他家骨混合による上顎洞挙上術や、自家骨によるオンレイグラフトでは、移植骨が吸収するという報告がある。また、人工材料に頼っている現在の治療法では、骨置換率や材料の原料が他家動物由来であるなど、多くの問題が残っている。特に、自家骨を用いた再生療法における「移植片の吸収」は打破しなければならない重要な問題である。

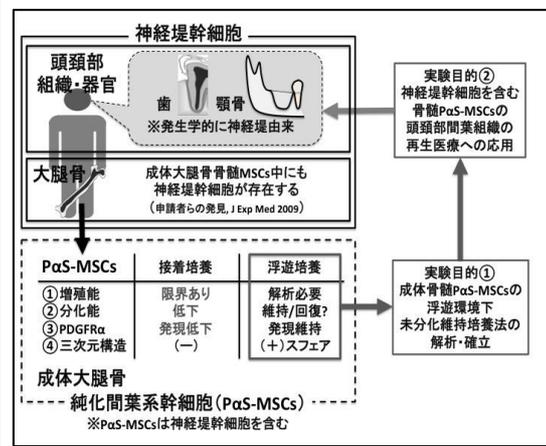
頭頸部の発生に目を向けると、歯を構成する象牙質や歯髄、歯槽骨を含めた頭頸部間葉組織は神経堤由来である (Chai *et al. Development*, 2000)。また最近の報告では、象牙芽細胞は神経堤細胞から一度シュワン細胞へ分化した後に歯髄内へ入り、再度、間葉系の細胞へ脱分化し象牙芽細胞へ分化する事が報告されている (Kaukua *et al. Nature*, 2014)。本研究では、「頭頸部領域における顎骨の再生には移植細胞の細胞源を発生学的に類似させることが重要である。」との仮説を立てる。

これに基づき、採取が容易な骨髄組織の細胞群から頭頸部間葉組織の起源である“神経堤細胞”を同定し、解析・利用することが再生医療実現への近道ではないかと考えた。

申請者は、これまで慶應義塾大学医学部岡野栄之教授・松崎有未准教授(現島根大学医学部教授)の研究チームで、フローサイトメーターを用いた間葉系幹細胞(MSCs)の純化技術の構築、およびこの純化MSCsを用いた基礎研究に取り組み、マウスの大腿骨骨髄中のPDGFRα⁺Sca-1⁺分画が高い増殖能を示し、骨・軟骨・脂肪へ分化可能なMSCsを高純度に含有している事を報告した (Morikawa *et al. J Exp Med*, 2009)。さらに、この純化MSCs(PaS-MSCs)が、神経堤系である神経・グリア・平滑筋への分化能を有することを明らかにしている (Morikawa *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2009)。また、申請者はPaS-MSCsは神経堤由来・中胚葉由来のMSCsを含んでおり、その由来に関係なく神経堤系への分化能を有する事を明らかにしている (Niibe *et al. Inflamm Regen*, 2011, Morikawa *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2009)。

2. 研究の目的

本研究では、神経堤幹細胞を含む成体骨髄由来のPaS-MSCsを用いた新規顎骨再生技術の構築を最終目的とする。これを達成するために、PaS-MSCsに付随する以下の問題を解決していく。



- (1) 従来の接着培養では増殖能に限界がある。
- (2) 継代を繰り返すと分化能が失われていく。
- (3) 継代を重ねるとPDGFRαの発現が低下していく。

幹細胞を用いた再生医療を大きな骨欠損に適用する場合には膨大な細胞数が必要になる。接着培養を用いることで必要細胞数の確保が可能でも、その細胞が既に骨芽細胞への分化能を消失しては再生医療に利用することはできない。

実際、予備実験の結果、PDGFRαおよびSca-1を発現しているマウスMSCs(Oricell™マウスMSC: Cyagen社)を接着培養で17回継代すると、PDGFRαの発現は25%にまで減少した。一方で申請者は、攪拌震盪培養装置(BR-40LF: TAIKEC)を用いてこのマウスMSCs株を浮遊震盪培養すると、2か月間培養しても65%以上の細胞のPDGFRα発現を維持でき、未分化の性質を保つという興味深い知見を得ている。また、この浮遊培養条件下では、三次元的な細胞塊(スフェア)を形成する。

さらに、接着培養では5回継代すると脂肪細胞への分化能が消失するが、すでに分化能を消失した30回継代後のマウスMSCs株をこの浮遊条件で培養すると、消失したはずの脂肪細胞への分化能が飛躍的に回復した。つまり、この浮遊培養環境は、MSCsの未分化性を維持できるだけでなく、未分化な状態に引き戻す技術に繋がる可能性が期待される。

以上を背景に本研究では以下を明らかにしていく。

- (1) 攪拌震盪培養装置を用いた培養条件を検討することでMSCsの未分化性の維持を可能にする培養環境を明らかにする。
- (2) MSCsスフェアから、三次元的に骨芽細胞・骨様石灰化物への分化誘導を行い、移植実験によりこの細胞構造体が顎骨・歯槽骨の再生医療に有用であるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

<平成28年度研究計画>

(1) 浮遊培養条件におけるMSCの性状(未分化状態)解析

増殖能および細胞塊形成の定量評価
間葉系(骨・軟骨・脂肪)および神経堤(神経・グリア・平滑筋)への分化能評価および遺伝子発現解析による定性評価
PDGFR α の発現維持の定性評価

<平成29年度研究計画>

(2) 浮遊培養条件で形成されたMSC細胞塊の骨分化誘導法の確立

*In vitro*における三次元的な骨芽細胞・骨様硬組織の形成能解析
MSC細胞塊から誘導した三次元的骨様組織の移植実験による*in vivo*解析

(3) 得られた技術のヒト純化MSCへの応用

4. 研究成果

(1) 振盪培養環境下でのMSCの最適な未分化維持環境を明らかにする。

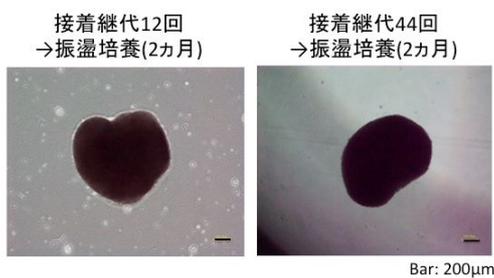
マウスMSCの細胞塊形成

MSCは接着培養を繰り返す事でその未分化性を喪失する。

そのため、本研究では継代数の少ない細胞(継代 8~12)、多い細胞(継代 30~45)に分けスフェア形成させる事で、その性状解析を行なった。MSCはOricell™マウスMSCを購入し、使用した。なお、この細胞は購入時にPDGFR α 、Sca-1共陽性分画が約90%存在することを確認済みである。

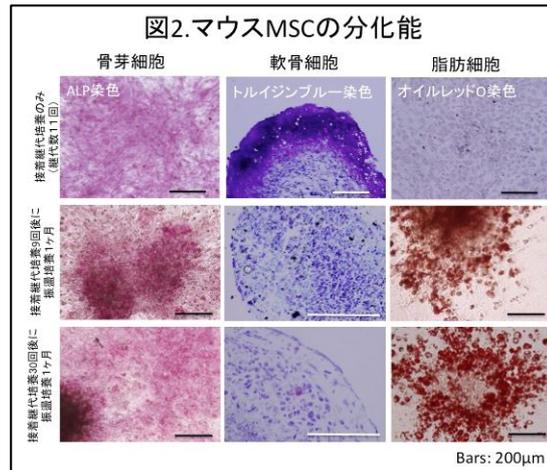
振盪培養を行った結果、どちらも細胞塊を形成する事が可能であった(図1)。 1×10^7 個の細胞を振盪培養環境下で2ヵ月培養すると、継代数の少ない細胞は平均34.3個(n=3)、継代数の多い細胞は平均29.6個(n=3)の細胞塊を形成した。さらにFeret's径計測では、継代数(少)平均 908.8 ± 2578.8 (n=25)、継代数(多)平均 779.2 ± 195.1 (n=10)で大きさに有意差は認めなかった。

図1.マウスMSCの細胞塊形成



マウスMSCの分化能

接着培養のみでは、継代数が少ない(継代数 11)場合でも脂肪への分化能(オイルレッドO染色)を喪失したが、継代数の少ない(9回)細胞及び多い(30回)細胞を振盪培養して作製した細胞塊は、骨芽細胞(アルカリフォスファターゼ:ALP染色)、軟骨細胞(トリジンブルー染色)脂肪細胞(オイルレッドO染色)と間葉系細胞への分化能を確認することができた(図2)。

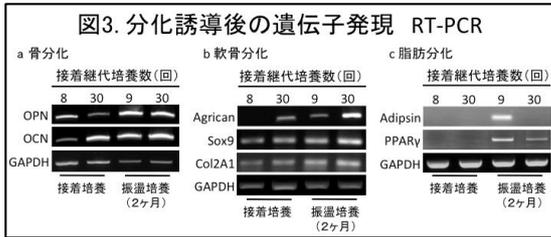


さらに分化誘導後の骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞に関連する遺伝子発現をRT-PCRにて解析した。骨芽細胞分化誘導後の解析から、接着培養継代数の少ない細胞(継代数 8~9)では、振盪培養細胞の方が接着培養細胞よりも骨芽細胞マーカーであるOCN、OPNの発現が高かった。接着継代培養数の多い(継代数 30回)細胞では、振盪培養細胞の方が接着培養細胞に比べてOPNの発現が高かった(図3-a)。

軟骨細胞分化誘導後の解析から、接着培養継代数の少ない(継代数 8~9)細胞では、振盪培養細胞の方が接着培養細胞よりも軟骨細胞マーカーであるAgrican、Sox9、Col2A1の発現が高かった。接着継代培養数の多い(継代数 30回)細胞では、振盪培養細胞の方が接着培養細胞に比べてAgrican、Sox9の発現が高かった(図3-b)。

脂肪細胞分化誘導後の解析から、接着継代培養後すぐに分化誘導を行った接着継代数の少ない(継代数 8)細胞及び多い(継代数 30)細胞は、脂肪細胞マーカーであるAdipsinやPPAR γ の発現を認めなかった。それに対し、振盪培養を行った接着継代数の少ない細胞(継代数 9回)はAdipsinとPPAR γ の発現が確認でき、接着継代数の多い細胞(継代数 30回)細胞はPPAR γ の発現が確認できた。

(図 3-c)



マウス MSC 細胞塊の PDGFR α の発現解析

マウス MSC の純化マーカーである PDGFR α はこれまでの解析から、接着継代を繰り返すことで、その発現が落ちることが明らかになっている。Oricell™ マウス MSC は、接着継代わずか 8 回で約 46% と PDGFR α の発現は半減し、25 回では約 25% まで落ちた。一方、接着継代 44 回後に新党培養を行なった Oricell™ マウス MSC は PDGFR α の発現を 68% 以上まで回復していた (データ未表示)。

RT-PCR の解析から、接着継代培養の少ない (接着継代 9 回) 細胞から多い (接着継代 41 回) 細胞に連れて PDGFR α の発現は減少しているが、接着継代を 11 回及び 37 回行なった Oricell™ マウス MSC は、その発現が回復している (データ未表示)。

神経幹細胞用培地を用いたマウス MSCs 細胞塊形成と性状解析

MSC 維持培地を用いた解析から、我々が用いている PDGFR α + / Sca-1+ マウス MSC は間葉系である骨・軟骨・脂肪への分化能を保有することが明らかになった。我々の最終目的は、神経堤幹細胞としての性質を維持することにある。MSC 維持培地を用いた解析では、神経堤幹細胞マーカーとして知られる Nestin 等の一部のマーカーの発現回復までは確認することができなかった (データ未表示)。

今回、細胞培養液をより神経堤幹細胞の生存条件に近づけるため、神経幹細胞用培地 (Laura et al. Protoc Exch, 2006 を改変) での培養を試みた。この方法で、Oricell™ マウス MSC が細胞塊を形成するかを検証した。さらに形成した細胞塊の未分化性を、中胚葉系への分化能 (骨、脂肪、軟骨) と神経細胞への分化能について検証した。さらに、RT-PCR にて神経堤幹細胞マーカーである Nestin, Twist の発現、間葉系幹細胞マーカーである PDGFR α の発現を解析した。

結果、接着継代培養の少ない (継代数 9 回) 細胞は神経幹細胞用培地を用いて振盪培養を行うと、細胞塊を形成した

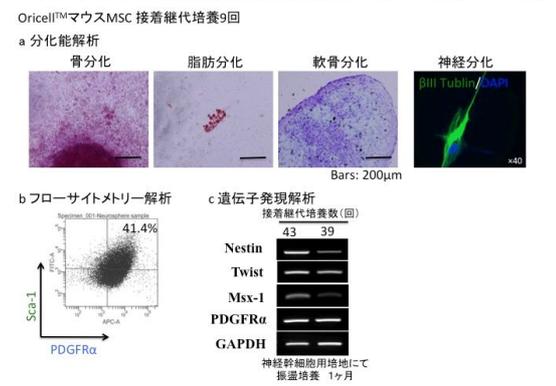
(データ未表示)。

この細胞塊の分化能解析を行なったところ、骨芽細胞 (ALP 陽性) 脂肪細胞 (オイルレッド O 陽性) 軟骨細胞 (トリジンブルー陽性) の中胚葉系細胞への分化能を確認できた (図 4-a)。さらに、神経細胞への分化能解析では、細胞塊から遊走した細胞の神経細胞への分化能 (β -Tublin 陽性) を確認できた (図 4-a)。

フローサイトメトリー解析では、PDGFR α + / Sca-1+ 分画の減少を確認した (図 4-b)。

しかしながら、接着継代培養の多い (継代数 39 回、43 回) 細胞も神経幹細胞用培地を用いることで細胞塊を形成した (図示せず)。この細胞塊の遺伝子発現を RT-PCR にて解析した結果、神経堤幹細胞マーカーである Nestin, Twist の発現と PDGFR α の発現を確認できた (図 4-c)。これまでの解析から、神経幹細胞用培地の有効性が確認された。今後、さらに培養期間や培養細胞数等より詳細な最適培養条件を探索する予定である。

図 4. マウス MSC の神経幹細胞用培地を用いた細胞塊形成



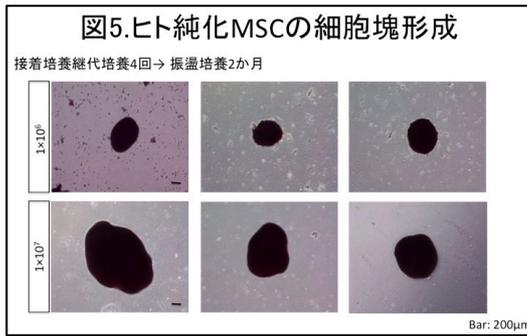
(2) ヒト純化 MSCs 細胞塊への応用の可能性探索

MSC 維持培地を用いた細胞塊形成能

我々の開発した新規培養法がヒト純化 MSC (LNGFR+ / Thy-1+) へも応用することが可能かを検証した。ヒト MSC 維持培地 (Mabuchi et al. Stem Cell reports, 2013) を用いてヒト純化 MSC の細胞数を 1×10^6 個/フラスコと 1×10^7 個/フラスコに分けて振盪培養を行なった結果、接着継代数 4 回のヒト純化 MSC もマウス MSC 同様に細胞塊を形成した (図 5)。

1 ヶ月の培養では、 1×10^6 個/フラスコでは 14.3 ± 2.0 個の細胞塊を、 1×10^7 個/フラスコでは 15.0 ± 1.0 個の細胞塊を確認した。2 ヶ月の培養では 1×10^6 個/フラスコでは 10.7 ± 2.1 個の細胞塊を、 1×10^7 個/フラスコでは 11.7 ± 2.5 個の細胞塊を確認した。Feret's 径計測では、2 ヶ月の培養で

1×10^6 個/フラスコは $699.0 \pm 205.4 \mu\text{m}$ (n=5))
 1×10^7 個 / フラスコは $794.0 \pm 440.0 \mu\text{m}$
(n=19) であった。



さらに、接着継代数 19 回のヒト純化 MSC も同様に細胞塊を形成することを確認しており、1ヶ月の培養では、 1×10^6 個/フラスコでは 21.3 ± 7.0 個の細胞塊を、 1×10^7 個/フラスコでは 23.3 ± 8.5 個の細胞塊を確認した。2ヶ月の培養では 1×10^6 個/フラスコでは 17.0 ± 11.6 個の細胞塊を、 1×10^7 個/フラスコでは 17.3 ± 4.5 個の細胞塊を確認した。Feret's 径計測では、1ヶ月の培養で 1×10^6 個/フラスコは $534.2 \pm 269.1 \mu\text{m}$ (n=6))、 1×10^7 個/フラスコは $759.9 \pm 369.5 \mu\text{m}$ (n=9) であった。2ヶ月の培養で 1×10^6 個/フラスコは $733.8 \pm 193.2 \mu\text{m}$ (n=5))、 1×10^7 個/フラスコは $1158.3 \pm 225.1 \mu\text{m}$ (n=6) であった。

ヒト純化 MSC の遺伝子発現解析とフローサイトメトリー解析

接着継代数培養数の少ない (継代数 7 回) 及び多い (継代数 19 回) 細胞、そこから2ヶ月の振盪培養を行った細胞の未分化維持に関連する遺伝子発現を RT-PCR にて解析した。

解析の結果、Sox2, Oct3/4 の発現は振盪培養後に増加することが確認できた (データ未表示)。フローサイトメーターによる解析では、接着継代数培養を2ヶ月間繰り返した (接着継代数 21 回) 細胞は間葉系幹細胞マーカーである CD106 の発現は 6.0 と 7.5% (n=2) と著しく低下したが、接着継代数培養数の少ない (継代数培養数 7 回) 細胞を同期間である2ヶ月振盪しフローサイトメトリー解析を行うと、59.6%と 87.1% (n=2) と発現がある程度維持されていることが確認できた (データ未表示)。

ヒト純化 MSC の分化能

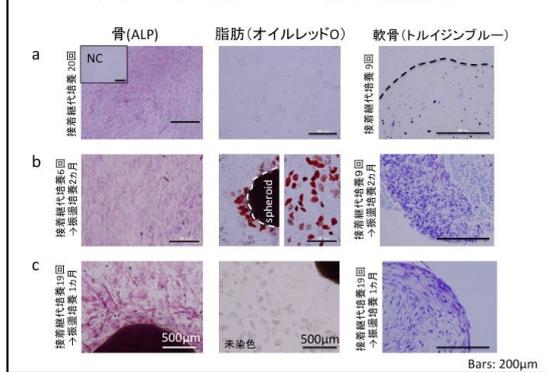
次に接着培養を行なったヒト純化 MSC の分化能を解析したところ、接着継代数の多い (接着継代数 20 回) 細胞では、ALP 陽性の骨芽細胞への分化能を確認したが、オイルレッド O 陽性の脂肪細胞は確認できず、軟骨分化誘導においては軟骨ペレットの形成が確認できなかった (図 6-a)。接着継代数の少ない (接着継代数 9 回) の細胞は、軟骨分化誘導

行なったところ、軟骨ペレットを形成したが、トルイジンブルー陽性細胞はごくわずかであった。

接着継代数の少ない (継代数 6 回及び 9 回) 細胞を2ヶ月振盪培養行くと、細胞は骨芽細胞 (ALP 陽性) 脂肪細胞 (オイルレッド O 陽性) 軟骨細胞 (トルイジンブルー陽性) への分化能を確認できた (図 6-b)。

さらに接着継代数培養数の多い (継代数 19 回) 細胞を1ヶ月振盪培養行っても、骨芽細胞、軟骨細胞への分化能が確認でき、脂肪細胞誘導においても脂肪滴形成が確認できた (未染色) (図 6-c)。

図6. ヒト純化MSCの分化能解析

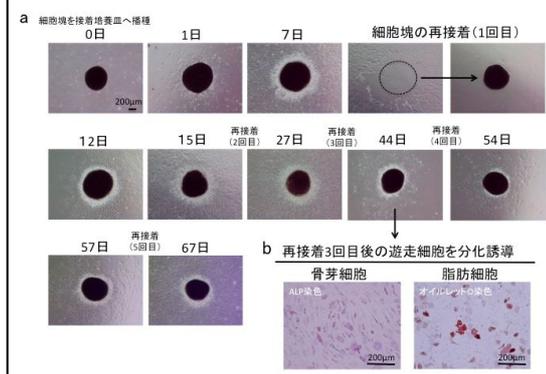


ヒト純化 MSC 細胞塊の形態保持及び細胞供給能力

作製したヒト MSC 細胞塊は、再度接着性の培養皿へ播種すると、すべての細胞塊において、崔接着性が確認できた。さらに接着は数時間後に確認でき、細胞塊周囲から接着性細胞が遊走してくることが確認できた (図 7-a)。

細胞塊は機械的に剥がすことで、再度別の培養皿に播種することが可能であり、再接着3回目の細胞は、骨芽細胞 (ALP 陽性) 脂肪細胞 (オイルレッド O 陽性) へ分化する能力を保持していた (図 7-b)。

図7. ヒト純化MSC細胞塊の形態保持及び細胞供給能力



これまでの解析から、ヒト純化 MSC においてもマウス MSC 同様、我々の振盪培養が未分化製の維持・回復に影響を与える可能性が示唆された。現在、この

研究は国内特許出願（特願 2017-83483）を行い、さらに神経幹細胞用培地を用いた神経堤幹細胞に特化した培養が可能かを解析中である。

(3) MSC 細胞塊の三次元的な骨様石灰化物への分化誘導

マウス MSC 及びヒト純化 MSC から作製した細胞塊を骨分化誘導培地（LONZA 社製）にて分化誘導を行うと、一度細胞塊を接着性培養皿に接着させ、遊走した細胞は効率よく ALP 陽性細胞に分化するが、細胞塊自体の染色性が弱いことが分かっている（データ未表示）。そこで現在、作製した細胞塊の未分化維持のための最適条件の探索と共に、細胞塊を三次元的に効率よく骨分化するための分化誘導法の探索を行なっている段階である。

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 4 件)

Kayaba A, Itoh-Nakadai A, Niibe K, Shirota M, Funayama R, Sugahara-Tobinai A, Wong YL, Inui M, Nakayama K, Takai T*. Bone marrow PDGFR α ⁺Sca-1⁺-enriched mesenchymal stem cells support survival and antibody production of plasma cells *in vitro* through IL-6. *Int Immunol*, 査読有, *in press*, 2018. Doi: 10.1093/intimm/dxy018

Sato Y, Mabuchi Y, Miyamoto K, Araki D, Niibe K, Houlihan DD, Morikawa S, Nakagawa T, Nakajima T, Akazawa C, Hori S, Okano H, Matsuzaki Y*. Notch2 signaling regulates the proliferation of murine bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells via c-Myc expression. *PLoS One*. 査読有, 11(11): e0165946, 2016. Doi:10.1371/journal.pone.0165946

Niibe K, Zhang M, Nakazawa K, Morikawa S, Nakagawa T, Matsuzaki Y, Egusa H*. The potential of enriched mesenchymal stem cells with neural crest cell phenotypes as a cell source for regenerative dentistry. *Jpn Dent Sci Rev*. 査読有, 53(2): 25-33, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2016.09.001>

Niibe K, Suehiro F, Oshima M, Nishimura M, Kuboki T, Egusa H*. Challenges for stem cell-based Regenerative Prosthodontics. *J Prosthodont Res*. 査読有, 61(1):3-5, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2016.09.001>

〔学会発表〕(計 2 件)

大堀悠美, 新部邦透, 江草 宏. 神経堤の特徴を呈する間葉系幹細胞塊を用いた再生歯科医療技術の開発. 第 7 回補綴若手研究会, かずさアカデミアパーク(木更津), 2018 年 3 月 11 日

Niibe K, Ohori-Morita Y, Zhang M, Egusa H. Novel sphered culture of mesenchymal stem cells for regenerative prosthodontics. *International Collage of Prosthodontists*, Santiago (Chile), 7-9 September, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 振盪浮遊培養を用いた間葉系幹細胞の未分化性維持方法

発明者: 新部邦透、江草 宏

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-83483

出願年月日: 平成 29 年 4 月 20 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新部 邦透 (NIIBE, Kunimichi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 50468500

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号:

(4) 研究協力者

江草 宏 (EGUSA, Hiroshi)

松崎有未 (MATSUZAKI, Yumi)

Zhang Maolin

大堀悠美 (OHORI, Yumi)