

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10976

研究課題名(和文)ダイレクト・リプログラミング法で作成した骨芽細胞を用いた低侵襲的骨再生治療の開発

研究課題名(英文)Direct reprogramming of fibroblasts into osteoblast like cells having chemotaxis by defined factors

研究代表者

谷口 大吾 (Daigo, Taniguchi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：00642092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨折整復術や骨移植術後の早期骨癒合は廃用を最小限にするために重要である。ダイレクトリプログラミング法は幹細胞を介さずに、低コストで、さらに自家組織から短期間に多くの目的細胞作製可能であり、線維芽細胞からの骨芽細胞様細胞作製し、その低侵襲投与方法についての研究を行った。作製した骨芽細胞様細胞にケモカイン受容体遺伝子を導入して、蛋白発現とin vitroでの遊走性を確認した。In vivoでは少なくとも手術操作による皮下などの組織損傷部への集積は認められたが、骨損傷部特異的には集積していない可能性が示唆された。今後の課題として、動物モデルのやケモカイン受容体遺伝子の種類についての検討が必要と考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイレクト・リプログラミング法で作製した骨芽細胞様細胞(dOB)は、骨欠損部への直接移植によって生体内でも十分な骨形成能を持つことを報告してきた。本研究では、より低侵襲な投与方法について検討しており、われわれは間葉系幹細胞(MSC)のケモカイン受容体によるホーミング効果に着目した。大量作製可能なdOB作製過程で、MSCのような損傷組織への遊走能を新たに獲得させ、CXCR4受容体によるin vitroでの遊走性を確認した。生体内への投与では骨欠損への集積は確認できなかったが、living imageによる炎症部位への集積を認めた。本研究モデルが、低侵襲な再生医療の形の1つとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Early bone fusion after fracture reduction and bone graft surgery is important to minimize disuse syndrome. Direct reprogramming capable of producing many target cells from autologous tissue in a short period of time without using stem cells. And we have developed osteoblast like cells from fibroblasts using this technique and their administration methods were studied. The chemokine receptor gene was introduced into the prepared osteoblast-like cells, and protein expression and chemotaxis in vitro were confirmed. In vivo, at least accumulation of cells was observed in tissue-damaged areas such as subcutaneous areas due to surgical operation, but it was suggested that it may not be accumulated specifically in bone defect areas. We thought that it necessary to examine activity of other chemokine receptor genes and validity of other animal models.

研究分野：骨再生医療

キーワード：ケモカイン 骨芽細胞 ダイレクト・リプログラミング法 間葉系幹細胞 細胞遊走能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会にあたり健康寿命は重要であり、健康であるためには運動器の機能が良好である必要がある。運動器疾患の中でも高齢者に好発する骨粗鬆症をベースとした脊椎の圧迫骨折や大腿骨近位部骨折などは長期臥床による廃用に伴う ADL・QOL の低下を引き起こす。骨粗鬆症に対しては現在多くの薬剤が開発・使用されているが、依然としてビスホスホネート製剤による顎骨壊死や非定型骨折、テリパラチド製剤の発がん性による使用期限制限などの問題がある。

われわれは早期に強力に骨癒合を得られる治療は康寿命に寄与するため、強力な骨癒合促進効果のある新規治療法の開発が必要であると考えた。

これまでわれわれは、ダイレクト・リプログラミング法を用いた骨芽細胞様細胞 (direct converted osteoblast: dOB) の *in vitro* における作製方法を確立し、その成果を報告してきた。本法は iPS 細胞と比較して低コスト・短期間で多量の細胞作製が可能で優れており、また採取が容易な皮膚などの自家組織の細胞を使用するため安全な方法であると考えられる。また、dOB の臨床応用に向けて、本細胞を免疫不全マウスの左大腿骨欠損モデルに直接移植し、優れた骨形成能を確認した。しかし、局所への直接移植は侵襲が高く、より低侵襲な投与方法についての検討が必要であると考えた。

そこで、われわれは間葉系幹細胞のホーミング効果に着目した。間葉系幹細胞はケモカイン受容体を細胞膜表面に発現し、炎症性骨破壊部位のケモカインへの走化性を有することが報告され、既に再生医療への応用にむけての研究が進められている。しかし、間葉系幹細胞は採取時の侵襲が高く、単離できる細胞数が少ない。

われわれは大量作製可能な dOB 作製過程で、間葉系幹細胞のような損傷組織への遊走能を新たに獲得させ、低侵襲での再生医療に応用する着想を得て本研究を開始した。

2. 研究の目的

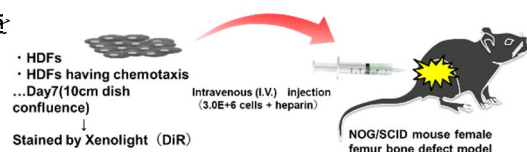
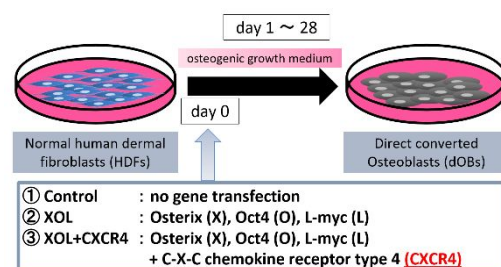
本研究の目的は direct converted cells を用いた骨損傷に対する低侵襲な再生医療を実現するために、骨損傷部への遊走能を有する骨芽細胞様細胞を作製することである。

3. 研究の方法

細胞はヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) を用いて平板培養を行った。目的細胞への誘導には、レトロウイルス・ベクターを使用して遺伝子導入を行った。まず、pMX puro ベクターに、Osterix, Oct-4、L-myc といった骨芽細胞誘導遺伝子を組み込み、Plat GP パッケージ細胞に導入した。この細胞にレトロウイルスを導入し、産生されたレトロウイルス・ベクターをヒト皮膚線維芽細胞にトランスフェクションさせた。その後、培地を α -Glycerolphosphate、アスコルビン酸等を含む骨誘導培地に交換し培養した。骨芽細胞誘導培地に交換した後、培養した細胞を以下のように評価した。骨形成能の評価は、光学顕微鏡を用いて細胞の形態を評価した。組織評価は、Alizarin Red 染色 (4 weeks) で骨基質の産生を、骨芽細胞の性質の評価は、Real time RT-PCR (4 weeks) により骨芽細胞に特異的な遺伝子 (Runx2, Osteocalcin, Osteopontin) の発現を比較検討した。

さらに、本研究では低侵襲的に骨芽細胞様細胞を用いた骨の治療を行う方法として、conversion の過程でケモカイン受容体遺伝子 (CXCR4) を追加で導入した。ケモカイン受容体発現および遊走能の評価は CXCR4 の遺伝子発現を Real time RT-PCR (4 weeks) で、CXCR4 のタンパク発現を Flow cytometry および免疫染色 (day3) で、CXCR4 発現細胞の遊走能を Cell migration assay (day5) で評価した。

最後に、CXCR4 を導入した細胞の *in vivo* での遊走能を評価するため、予備実験として HDFs および CXCR4 のみ導入した HDF (CXCR4(+))HDFs を用意し、NOG/SCID マウス大腿骨骨折モデルおよび部分的骨欠損モデルを作製し、細胞投与 (腹腔内 and 経尾静脈) 後に *in vivo* imaging system (IVIS) および組織像で局所への遊走の有無を観察した。

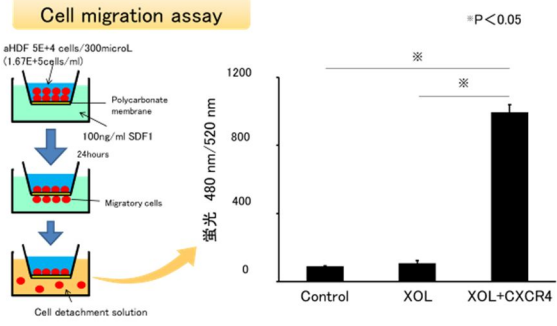
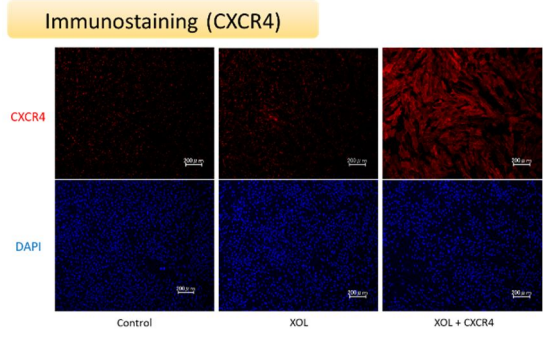
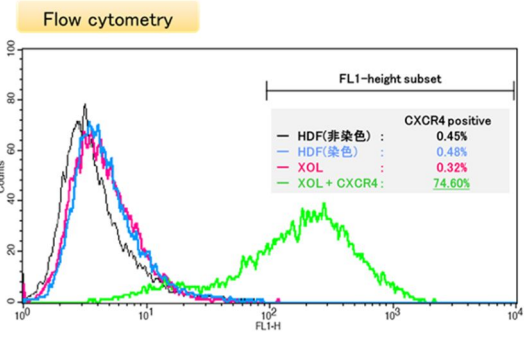
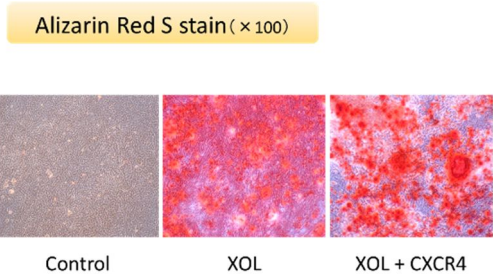
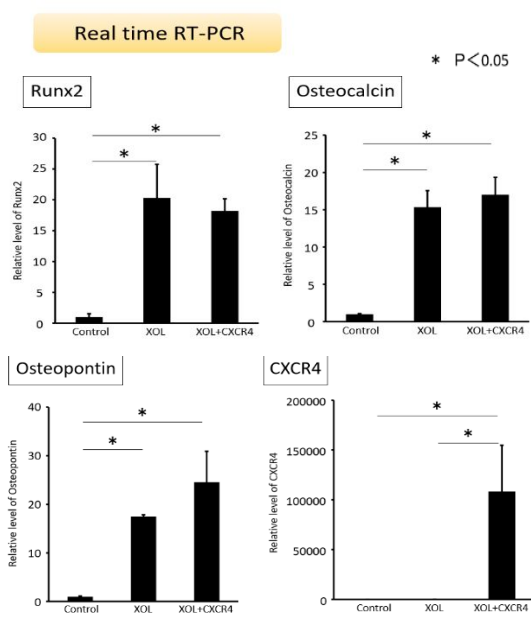


4. 研究成果

ダイレクト・リプログラミング法で再現性をもって骨芽細胞様細胞を作製することに成功した。また、作製した細胞にケモカイン受容体遺伝子を追加で導入しても骨基質産生能に有意差はなく、*in vitro* assay にて遊走能を有することを確認した。

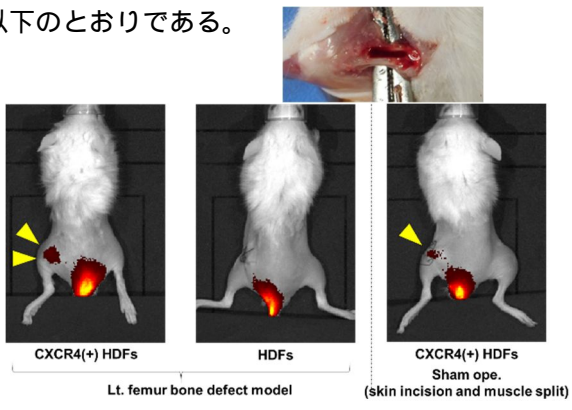
Real time RT-PCR では、Control 群と比較して XOL 群および XOL+CXCR4 群では Runx2、Osteocalcin、Osteopontin の遺伝子発現は有意に上昇した。また、他の 2 群と比較して、XOL+CXCR4 群で CXCR4 の遺伝子発現は有意に上昇していた。その他にも、Alizarin Red 染色における XOL 群と XOL+CXCR4 群で骨基質産生を認めた。Flow cytometry では XOL + CXCR4 群で

CXCR4 陽性細胞は増加し、免疫染色においても、XOL + CXCR4 群で CXCR4 蛋白が染色された。
 Transwell assay では他の 2 群と比較して、XOL + CXCR4 群で細胞浮遊液内に移行した細胞数は有意に上昇していた。

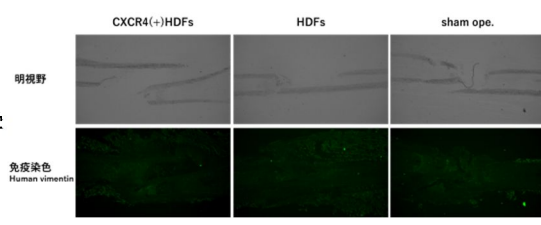


IVIS による生体内遊走能の予備実験結果は以下のとおりである。

免疫不全マウスの右大腿骨骨折モデルに対する CXCR4 (+)HDFs の腹腔内投与 (I.P.) では、明らかな細胞の遊走・集積は認めなかった。一方、経尾静脈投与 (I.V.) では 24h 経過時点で細胞の集積を認めた。以上から、われわれの先行研究で使用した左大腿骨欠損モデルに、normal HDFs および CXCR4 (+)HDFs を尾静脈より投与し、生体内での動向を IVIS で再度観察した。結果、CXCR4 (+)HDFs を投与したマウスにおいて、24 時間時点で骨欠損部への細胞の明らかな集積を認めた。(右上図)



次に、骨欠損部への細胞の集積の有無を組織学的に観察した。脱灰組織標本の human vimentin に対する免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で細胞の集積の有無を確認した。しかし、CXCR4 (+)HDFs を投与したマウスにおいて、組織学的には骨欠損部への明らかな細胞の集積を認めず、normal HDF 投与との差は認めなかった。(右下図)



これまでわれわれは in vitro における dOB の低侵襲投与の可能性について示しており、本研究では in vivo での評価・検討を進めていた。IVIS では sham ope. のマウスにおいても CXCR4 (+)HDFs の集積を認めており、少なくとも手術操作による皮下などの組織損傷部への集積はあると考えるが、骨損傷部特異的には集積していない可能性が示唆された。

dOB の低侵襲投与による骨再生医療の実用化にむけて、今後の課題として、骨損傷部を有する動物モデルのさらなる検討や使用するケモカイン受容体遺伝子の種類についての検討を進める必要があると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masato Ohara, Daigo Taniguchi, Ryo Oda, Hiroyoshi Fujiwara1, Tsunao Kishida, Osam Mazda, Toshikazu Kubo1
2. 発表標題 Direct reprogramming of fibroblasts into osteoblast-like cells having chemotaxis by defined factors.
3. 学会等名 ORS 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小原 将人, 谷口 大吾, 藤原 浩芳, 小田 良, 岸田 綱郎, 松田 修, 久保 俊一
2. 発表標題 ダイレクト・リプログラミング法を用いた 遊走能を有する骨芽細胞様細胞の開発
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岸田 綱郎 (Kishida Tsunao) (00370205)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	遺伝子導入効果についての検討、動物実験の指導
研究分担者	小田 良 (Oda Ryo) (80516469)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	研究指導、動物実験実施

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	藤原 浩芳 (Fujiwara Hiroyoshi) (90381962)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・客員講師 (24303)	動物実験指導