

令和 3 年 10 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11847

研究課題名(和文) 臍帯MSCを用いたコラーゲンゲル培養による新規骨再生法の開発

研究課題名(英文) Development of new bone regeneration method by collagen gel culture using umbilical cord MSC

研究代表者

岩竹 真弓 (IWATAKE, Mayumi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術職員

研究者番号：40624614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：臍帯MSCは採取が非侵襲的であり未分化度の高いIMSCが得られるという特徴があるものの、他の組織から単離されたMSCよりも骨分化誘導に時間を要し、Alkaline Phosphatase (ALP)活性も低く、その分化機構についても不明な点が多い。本研究では、最適な培養系を探索するため、細胞の増殖、分化を促進するI型コラーゲンに着目し、マトリックス培養を行った。その結果、ゲル上培養において顕著な骨芽細胞分化マーカーの発現上昇が観察された。したがって、臍帯MSCは骨芽細胞分化能を十分に有し、コラーゲン培養が臍帯MSCの骨芽細胞分化に促進的に作用することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は将来の標準治療となる方法の開発を目指しており、従来多く用いられている骨髄由来MSCによる骨再生法に比べて、侵襲が少なく、治療期間の短縮や、感染などのリスクも減らすことができる。また自家細胞製品は完全オーダーメイド製品であるため高コストになりがちであるが、臍帯MSCは現在、バンクへのストックが進められているため、製造段階のスケールを大きくすることで製造コストを抑えられると予想される。よって将来的には安価で効果の高い安全な骨再生医療が実現すると考えている。

研究成果の概要(英文)：The osteoblastic differentiation ability of UC-MSCs is limited when compared with that of bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs). Therefore, UC-MSCs usually require the long-term culture for the osteoblastic differentiation even if when applied the osteogenic reagents or cytokines, such as bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), in culture. In this study, to enhance the differentiation ability of cultured UC-MSCs for future clinical setting, we examined whether type I collagen (Col-1) gel culture promotes the BMP2-induced osteoblastic differentiation of UC-MSCs. As experiments, the expression level of alkaline phosphatase (ALP) mRNA and its activity when cultured on the surface of Col-1 gel matrix for 7-10 days were significantly promoted compared with that when cultured on the plastic surfaces, and those promoted levels were comparable to the levels of BM-MSCs.

研究分野：再生歯学

キーワード：臍帯MSC 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、低侵襲かつ有効性の高い新規骨再生法として間葉系幹細胞(MSC)が提案されているが克服すべき課題が多い。MSCは間葉系組織から抽出可能な、自己増殖能および多分化能を特徴とする細胞集団である。MSCは由来する組織によって異なった分化能や増殖能特性を有しており、最も一般的な供給源である骨髄由来幹細胞(骨髄MSC)は骨分化誘導可能で免疫抑制作用も有する。しかし、骨髄採取は侵襲性が大きいことや移植の際に必要な細胞数の確保のために培養が必要な上に、培養細胞の増殖・分化能に個体差が大きく培養操作が困難であるといった問題がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、**コラーゲン・ゲル培養法を用いて臍帯間葉系幹細胞(臍帯MSC)の骨芽細胞分化を誘導促進する条件を解明し、分化誘導効率が高い臍帯MSCを作製すること**である。臍帯MSCは無侵襲で採取でき、細胞増殖能・免疫寛容能が高いといった特性をもつ。しかしながら、臍帯MSCは骨芽細胞への分化誘導メカニズムは殆ど解明されておらず、高効率な骨芽細胞分化は困難である。本研究では、細胞外基質タンパク質への臍帯MSCの接着とその骨芽細胞分化への影響に注目し、制御機構を解明することにより分化誘導効率を飛躍的に向上させる手法を見出し、新しい骨再生法を確立する。

3. 研究の方法

臍帯MSCは骨誘導性が低いため、骨芽細胞分化効率を高める遺伝子を発現調節することにより分化誘導効率を図る。さらにその細胞を免疫不全マウスに移植して骨形成能を評価する。

4. 研究成果

臍帯MSCはHLA発現がなく同種異系(アロ)で移植可能であり、バンキングが進められているため細胞の安定供給が可能であり、高い有用性がある。さらに臍帯MSCは採取が非侵襲的に可能で、高い増殖活性と骨組織への分化能を有することが報告されている。しかしながら、他の組織から単離されたMSCよりも骨芽細胞への分化誘導に時間を要し、分化してもAlkaline Phosphatase (ALP)活性も低く(図1)その分化機構について不明な点が多く残されている。

そこで我々は高い骨分化能をもった臍帯MSCを得られるような培養プロセスを開発する取り組みを進めてきた。

これまでの細胞外環境設計による幹細胞の操作技術は、BMP-2などの液性因子添加による外因性シグナル誘発による分化誘導調節が主体であった。しか

しながら、歯肉肥大などの副作用や必要な部位への局所投与が必要であるなどの面から臨床応用への問題点や課題があった。そこで本開発では新規な分化制御手法として細胞挙動を介した内因性シグナリング誘発に基づく培養手法を提案した。

臍帯MSCは、他の細胞種と同様、細胞周囲を細胞外マトリックス(ECM; extracellular matrix)に囲まれている。ECMは、単に細胞接着のための足場を提供するだけでなく、細

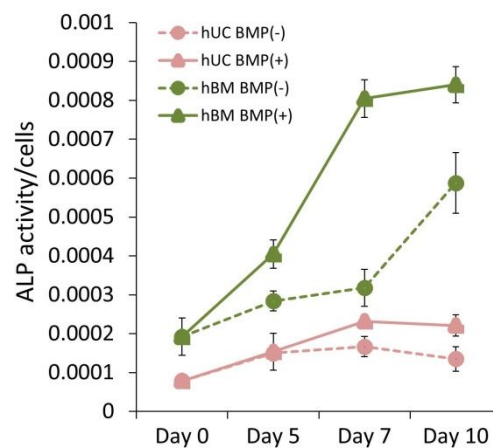


図1 臍帯および骨髄MSCのBMP-2分化誘導によるALP activity

胞膜表面に存在する受容体を介し、細胞の増殖、分化、遊走など多くの生理活性に寄与することが報告されている。コラーゲンは細胞の接着に関与する細胞接着分子と結合し、細胞内シグナルを活性化することが可能であり、細胞外マトリックスを構成する代表的な分子である。このコラーゲン基質を用いて臍帯 MSC を培養すると未分化/骨芽細胞ともに ALP 活性および上昇が見られ、特にコラーゲンゲル上培養では顕著な ALP 遺伝子発現上昇が観察され、骨髄 MSC と同レベルまで上昇した。

我々はコラーゲン比較実験においてコラーゲンゲル上培養が有効であるという知見を得た。

これらの制御機構について「BMP-2 - BMP receptor (BMPRII) - cofilin」伝達経路を解析したところ、BMPRII と cofilin とともに mRNA 発現上昇が見られた。cofilin はアクチンフィラメント(F-actin)の脱重合・切断因子であるため、cofilin が活性化すると F-actin は G-actin へ移行することが知られている。

細胞製品を製造・供給するシステムを実現するためには可及的に特別な処理をすることなく移植細胞を用意でき、細胞の取扱も容易でなければならない。ゲル上培養では細胞採取のためコラーゲナーゼ処理を要するなど手間がかかり、実用化には適していない。そのため、通常の培養で細胞数を確保しつつ、分化促進を誘導する臍帯 MSC の設計と最適化が重要となる。

そこで、我々は2種類のアクチン重合阻害剤を用いて骨分化促進の検討を行った。アクチン阻害剤の Latrunculin A、Swinholide A のどちらの添加群においても ALP mRNA の発現上昇が見られた。アクチンの動態変化については、阻害剤で処理した細胞は F-actin が崩壊するが、その後培養を重ねると F-actin は再構成し、G-actin の発現も多く見られ、ゲル上培養での形態と同様の細胞内局在変化を示した。

また幹細胞から多様な細胞が分化誘導される過程では均質な分化細胞群を安定して得ることが難しいことも課題としてある。その主な原因は細胞不均質性や多方向かつ段階的に進行する分化誘導過程において細胞間コミュニケーションや誘導などの細胞挙動を伴っているからと考えられる。臍帯 MSC は分化誘導後も Oct4、Nanog などの未分化マーカーの高発現が維持されるが、コラーゲンゲル培養では長期間の培養後、未分化マーカーは発現減少する。

臍帯 MSC は無侵襲で採取でき、通常は医療廃棄物として取り扱われるためバイキングしやすく安定供給が可能であり、成体組織由来 MSC を用いた骨再生よりも利点が多い。

本開発はヒト臍帯 MSC をアクチン重合阻害剤によって培養条件を最適化することにより、遺伝子操作なしにヒト臍帯 MSC からの骨芽細胞への分化を誘導する方法となる。

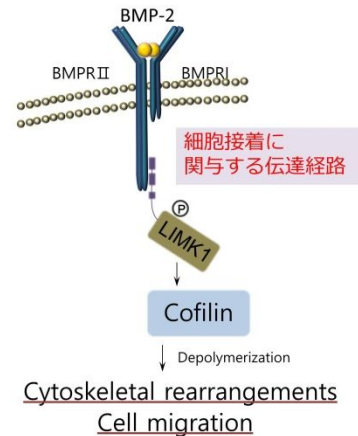


図 2 BMP-2 細胞内シグナル伝達経路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Iwatake Mayumi, Nishishita Kazuhisa, Okamoto Kuniaki, Tsukuba Takayuki | 4. 巻 359 |
| 2. 論文標題 The Rho-specific guanine nucleotide exchange factor Plekhg5 modulates cell polarity, adhesion, migration, and podosome organization in macrophages and osteoclasts | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Cell Research | 6. 最初と最後の頁 415 ~ 430 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2017.08.025 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Fuchigami Takeshi, Ono Hokuto, Oyadomari Kohta, Iwatake Mayumi, Hayasaka Daisuke, Akbari Masoud, Yui Katsuyuki, Nishi Kodai, Kudo Takashi, Yoshida Sakura, Haratake Mamoru, Nakayama Morio | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Development of a 68Ge/68Ga Generator System Using Polysaccharide Polymers and Its Application in PET Imaging of Tropical Infectious Diseases | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 ACS Omega | 6. 最初と最後の頁 1400 ~ 1407 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.7b00147 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Agata Hideki, Sumita Yoshinori, Hidaka Tatsuro, Iwatake Mayumi, Kagami Hideaki, Asahina Izumi | 4. 巻 2019 |
| 2. 論文標題 Intra-Bone Marrow Administration of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Is a Promising Approach for Treating Osteoporosis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cells International | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/4214281 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Iwatake M, Sumita Y, Nagamura T, Asahina I |
| 2. 発表標題 Actin-depolymerization inducing by Col-1 culture accelerates osteoblastic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. |
| 3. 学会等名 5th TERMIS World Congress 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 3.Sumita Y, Takashi I, Iwatake M, Yoshida T, Tran SD, Asahara T, Asahina I |
| 2. 発表標題 Effective Peripheral Blood Mononuclear Cells Promote the Regeneration of Radiation Injured Salivary Glands |
| 3. 学会等名 5th TERMIS World Congress 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

| | | |
|---|-----------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 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 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特許 第6785516号 | 取得年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |

〔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 | 住田 吉慶 (SUMITA Yoshinori) (50456654) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授 (17301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|