

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19030

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞集塊のメカノトランスダクション制御による骨様組織の創生と再生医療応用

研究課題名(英文) Development of bone-like tissue from C-MSCs for bone regenerative therapy

研究代表者

小松 奈央(正木奈央)(Komatsu (Masaki), Nao)

広島大学・医系科学研究科(歯)・専門研究員

研究者番号：90825316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 間葉系幹細胞(C-MSCs)と細胞自身が産生する細胞外基質(ECM)から構築される間葉系幹細胞集塊C-MSCsは、直径1mmほどの立体的細胞塊であり、人工材料を用いることなく骨欠損に移植され、骨再生を誘導する。

生体のMSCsは硬い場にあると、YAP/TAZメカノシグナルを介して骨分化を開始する。そこで本研究では、浮遊培養される立体的なC-MSCsのメカノシグナルを制御することで骨様組織を創出し、骨再生療法に応用することを目指した。

その結果、多糖ベースのゲルに包埋し、場の硬さを与えることでC-MSCsから骨様組織を作製することに成功し、その骨様組織が高い骨再生効果を有していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのところ、最も理想的な骨再生療法は、骨芽細胞・骨細胞・骨基質を供給する自家骨移植である。しかし、自家骨は採取量に限りがあり、実際には大規模骨破壊患者の治療に利用できないケースが多い。そこで、MSCsから自家骨に相当する骨様組織を生体外で作製し供給する技術が確立されれば、あらゆる大規模骨破壊患者に対応可能になると予想された。

本研究では、立体的な間葉系幹細胞集塊C-MSCsから人工材料を含まず、骨芽細胞・骨細胞・骨基質からなり、高い骨再生効果を発揮する骨様組織を創生することに成功した。このことは、現在のところ有効な治療法のない大規模骨破壊患者に対して、効果的な骨再生療法の実現につながる。

研究成果の概要(英文)： Three-dimensional(3D) clumps of mesenchymal stem cells (MSCs) /extracellular matrix (ECM) complexes, which consist of cells and self-produced ECM, can be transplanted into the bony defect to induce tissue regeneration.

During the bone development process, MSCs, sensing the microenvironmental stiffness via the mechanotransducer YAP/TAZ, start the bone formation. Thus, in this present study, we aimed to generate 3D bone-like tissues from C-MSCs for the novel bone regenerative therapy.

As a result, C-MSCs, embedded in crosslinked polysaccharide gel, differentiated into bone-like tissues, composed of osteoblasts, osteocytes, and mineralized bone matrix. Besides, the developed bone-like tissue implantation into the immunodeficient rat calvaria critical defect model showed successful bone regeneration.

研究分野：再生療法

キーワード：間葉系幹細胞集塊 C-MSCs メカノトランスダクション YAP/TAZ 立体骨様組織

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らのグループでは、間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells (MSCs))と細胞自身が産生する細胞外基質(Extracellular matrix (ECM))から構築される間葉系幹細胞集塊 C-MSCs を樹立していた。C-MSCs は直径 1mm ほどの立体的な細胞塊で、人工材料を用いることなく欠損部に直接移植可能で、効果的な骨再生を促進する。

一方、生体の MSCs は場の硬さなどのような細胞周囲微小環境に対して、転写共役制御因子 YAP/TAZ を介したメカノシグナリングによって応答し、細胞分化を行っていることが報告されていた (Dupont et al., 2012, Nature)。例えば、硬い足場にある MSCs では YAP/TAZ メカノシグナルが活性化し骨分化が誘導される。反対に、軟らかい場にあると YAP/TAZ 活性は低下し、MSCs は脂肪・軟骨分化の方向へ進む。そこで研究代表者は、浮遊状態で培養される 3 次元的細胞塊である C-MSCs の YAP/TAZ シグナルについて調べたところ、浮遊状態のため場の硬さによるメカノシグナルが生じにくく、YAP/TAZ 活性が著しく低下し、脂肪・軟骨誘導がかかりやすい状態にあった。しかし、デキサメタゾン等を添加した培地で C-MSCs の ECM 産生を向上させ、その ECM による硬さを付与すると YAP/TAZ メカノシグナルが活性化し、骨分化方向に進められることを見出した(Komatsu et al., 2018, Stem Cell Res Ther)。

以上のことから、人工材料を含まず、細胞が産生した ECM からなる細胞集塊 C-MSCs に、場の硬さを感知させられる培養条件で骨分化誘導を施すことで、YAP/TAZ メカノシグナルを十分に活性化させ骨そのものに相当する骨様組織まで創生できると仮説を立てた。

2. 研究の目的

現在のところ、理想的な骨再生療法は自家骨移植である。自家骨移植は、骨芽細胞・骨細胞・骨基質を供給するものであるため、きわめて効果的な骨再生が得られる。しかし、自家骨の採取量には限りがあり、腫瘍摘出や重度感染症のため広範囲にわたって骨を喪失した患者に対しては実施できないケースが多い。

そのような、治療困難な大規模骨欠損患者に対して、生体外で骨芽細胞・骨細胞・骨基質からなる骨様組織を作製し、供給する医療技術が確立できれば、革新的な骨再生療法となりえる。前述したとおり、研究代表者は、人工材料を含まない C-MSCs の YAP/TAZ メカノシグナルを制御する微小環境を作り出すことができれば、骨様組織にまで誘導できる可能性を見出していた。そこで本研究では、C-MSCs に硬さ調節可能なゲル包埋培養を組み合わせ、YAP/TAZ 活性を向上させ、骨芽細胞・骨細胞・骨基質からなる骨様組織を創生し、その移植による骨再生効果を昭にすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1) C-MSCs の YAP/TAZ 活性を向上させるゲル包埋培養の至適化と骨様組織創生

理研から提供されたヒト骨髄由来 MSCs から、Komatsu らの方法(Komatsu et al., 2018, Stem Cell Res Ther)に従い MSCs と COL1 を主成分とする ECM からなる細胞集塊 C-MSCs を作製した。これを、アテロコラーゲンゲル(高研社製)、もしくは多糖ベースの VitroGel(TheWell Bioscience 社製)に包埋して培養を開始した。特に VitroGel は 1~20kPa で硬さを振った。培地は、デキサメタゾン、アスコルビン酸、βグリセロフォスフェートの濃度を適宜振った骨分化誘導培地を用いた。これらの培養条件から、最も効率的に YAP/TAZ 活性を向上させ、骨様組織まで誘導できるものを探索した。YAP/TAZ 活性についての評価は、YAP/TAZ の発現量を Western Blotting にて確認し、YAP/TAZ ターゲット遺伝子群の mRNA 発現量を qPCR にて定量した。骨様組織の評価は、ミネラルの沈着をマイクロ CT で定量し、骨芽細胞・骨細胞・骨基質について HE 染色・免疫染色にて観察した。

実験 2)骨様組織移植による骨再生効果および骨形成能の検討

上記の実験 1)の検討の結果から確立されたプロトコールによって、C-MSCs から骨様組織を作製した。これを免疫不全動物であるヌードラット頭蓋冠 8mm 欠損モデルに移植した。経時的な骨再生量をマイクロ CT で確認し、移植 8 週後に得られた骨組織について HE 染色及び AZAN 染色によって観察した。さらに、骨様組織そのものの骨形成能を評価するために、同所シグナルの生じないヌードラット皮下移植を行い、経時的に移植された骨様組織の石灰化程度、成熟度について同様の手法で確認した。

4. 研究成果

実験1の結果として、コラーゲンゲルに C-MSCs を包埋すると、C-MSCs からコラーゲンゲル中に細胞が遊出しやすく、YAP/TAZ 活性は向上させられるものの、C-MSCs の大きさが経時的に縮小し、骨様組織には不適切であることが示された。一方、硬さを振った多糖ベースの VitroGel に包埋培養した結果、調節可能な硬さの最大値である 20kPa において、最も高い YAP/TAZ 活性が得られることが Western Blotting および qPCR の解析からわかった。このゲル条件にて C-MSCs を包埋し、デキサメタゾン、アスコルビン酸、βグリセロフォスフェートの濃度を至適化した骨分化誘導培地にて 14 日間培養したところ、ミネラルの沈着した細胞集塊が得られた。これを脱灰して HE 染色にて観察したところ、骨基質様組織とその外周に並ぶ骨芽細胞様細胞と、その内部に取り込まれる骨細胞様細胞が観察された。骨基質様組織には、骨基質タンパクである OPN、OCN の発現が免疫染色によって認められた。さらに、骨様組織内部の骨細胞様細胞について Phalloidin を用いて F-actin を染色し、共焦点顕微鏡にて 3 次元的に観察したところ、基質内部で樹状突起を伸ばし互いにネットワーク形成をしている細胞集団が認められ、これらが骨細胞にまで分化している可能性が示唆された(図1)。

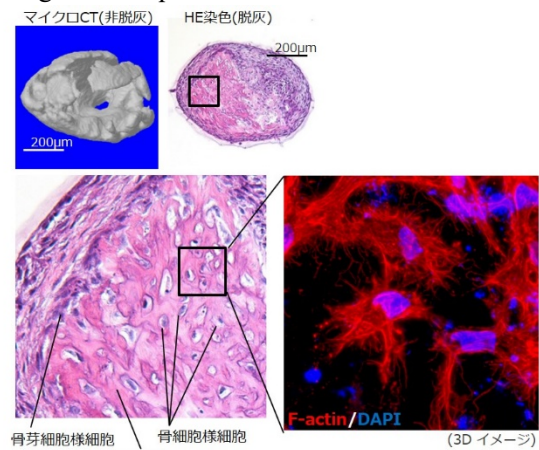
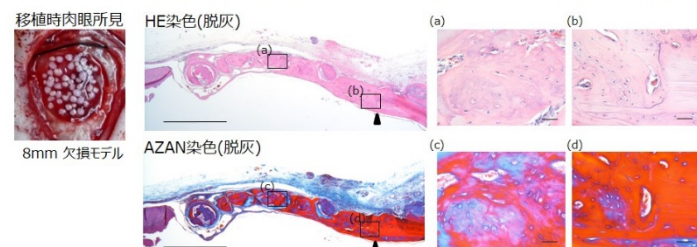


図1. ゲル包埋培養による骨様組織誘導
 ミネラルの沈着した骨基質、それを取り囲む骨芽細胞と内部でネットワーク形成する骨細胞からなる

実験2では、上記した方法で得られた骨様組織の骨再生効果をヌードラット頭蓋冠 8mm 欠損モデルに移植して評価した。このモデルは、C-MSCs 移植では骨再生は誘導できないクリティカルディフェクトモデルであることを予備的検討から確認済みであった。直径 8mm の欠損部に対して、作製した骨様組織 48 個を、人工材料を用いることなく直接移植した。移植 8 週間後には欠損部断端をつなぐ骨の再生が観察された。

実験2-1: ヒト骨様組織の免疫不全ラット頭蓋骨欠損モデル移植(骨再生能検証)



次に、骨様組織自身が骨形成能を有しているかを確認するために、ヌードラット皮下移植を行った。移植 4 週目では、移植された骨様組織は AZAN 染色に青く染まる幼弱骨であったのに対し、移植 8 週目になると赤く染まる成熟骨が観察された。骨欠損部のような同所性シグナルが得られない部位においても、骨として成熟したことから、本研究で作製した骨様組織が骨芽細胞・骨細胞による骨形成能を発揮した可能性が示唆された。

実験2-2: ヒト骨様組織の免疫不全マウス皮下移植(骨形成能検証)

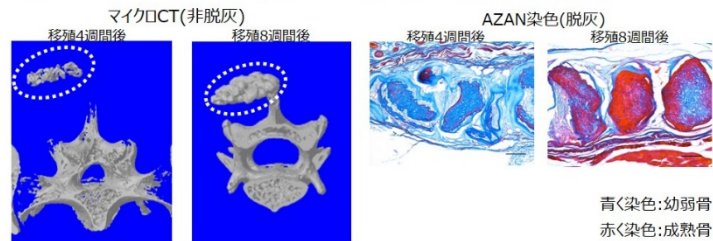


図2. 骨様移植とその効果

実験2-1) ヌードラット頭蓋冠8mm欠損に対する移植効果(骨再生能の検証)
 実験2-2) ヌードラット皮下移植後の経時的観察(骨形成能の評価)

以上の研究成果をまとめ骨様組織の製造法およびその骨再生効果について特許出願している(特願 2019-089161)。さらに、骨様組織の対照として作成していた C-MSCs の骨再生効果とその治癒機序を解析した結果を論文発表している(Motoike et al., 2019, Int J Mol Sci)。また、C-MSCs の浮遊状態が、YAP/TAZ シグナルの活性低下のみならず、p38/JNK-c-FOS シグナリングを介した COX2-PGE2 カスケードを活性化させ、アノキスを抑制し、細胞保護効果を発揮していることも一連の研究過程において同定し、論文発表を行った(Komatsu et al., 2020, Biochem Biophys Res Commun)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Motoike Souta, Kajiya Mikihiro, Komatsu Nao, Horikoshi Susumu, Ogawa Tomoya, Sone Hisakatsu, Matsuda Shinji, Ouhara Kazuhisa, Iwata Tomoyuki, Mizuno Noriyoshi, Fujita Tsuyoshi, Ikeya Makoto, Kurihara Hidemi	4. 巻 20
2. 論文標題 Clumps of Mesenchymal Stem Cell/Extracellular Matrix Complexes Generated with Xeno-Free Conditions Facilitate Bone Regeneration via Direct and Indirect Osteogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3970 ~ 3970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20163970	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 Komatsu Nao, Kajiya Mikihiro, Morimoto Shin, Motoike Souta, Yoshii Hiroki, Iwata Tomoyuki, Ouhara Kazuhisa, Matsuda Shinji, Mizuno Noriyoshi, Kurihara Hidemi	4. 巻 530
2. 論文標題 Cox2-mediated PGE2 production via p38/JNK-c-fos signaling inhibits cell apoptosis in 3D floating culture clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 448 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.100	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨様組織及びその製造法	発明者 栗原英見、加治屋幹人、小松奈央、本池 総太	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-089161	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------