

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03136

研究課題名（和文）動的ゴーストイメージング技術を用いた高骨形成細胞集団の分取と機能的再生骨の実現

研究課題名（英文）Selection of the highly-osteogenic cell population by ghost cytometry for the regeneration of functional bone

研究代表者

星 和人（Hoshi, Kazuto）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30344451

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨再生能の高い細胞群の選択的採取法の確立を試みた。骨髄細胞に対しFicoll濃度勾配遠心法による単核球濃縮を行ったが、赤血球破碎群に比べ骨形成能が低下した。Flow cytometryではCD34-CD73+CD51+細胞群の割合が減少しており、これを防ぐ方策が重要と考えられた。また、蛍光標識の細胞分裂による希釈を利用して、細胞分裂が速い群と遅い群を分取し、骨形成能を比較した。骨髄細胞に先立ち、軟骨細胞をGhost cytometerにより分取し、細胞分裂の速い、高い再生能を持つ群を濃縮できた。さらに、骨形成足場材として各種ゲルの比較検討を行い、細胞増殖能などについて解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨再生療法の臨床応用が期待されているが、コストの大きさが実用化の障害となっている。本研究では、低コストで優れた骨形成が可能な骨再生法の実現のため、採取した骨髄細胞から骨形成能が高い細胞を選択的に取り出す方法の確立を試みた。また、Ghost cytometryにより再生能の高い軟骨細胞の濃縮が可能であった。この研究の結果は、低コストで質の高い骨再生法の確立に向けて重要な知見を与えるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We tried to establish methods to harvest a highly-osteogenic cell population. When mononuclear cells were harvested from mouse bone marrow cells by the Ficoll gradient centrifugation, the osteogenic ability of the cells were less than those prepared by red blood cell removal. Analysis by flow cytometry indicated that the ratio of CD34-CD73+CD51+ cell population was reduced in the cells treated with Ficoll gradient centrifugation, suggesting that the prevention of the loss of this cell population by this method is important. Prior to bone marrow cell experiments, rapid-dividing chondrocytes with high regenerative ability could be concentrated by Ghost cytometry. In addition, by utilizing the dilution of fluorescence dye by cell division, cells were harvested according to the cell division rate (high and low), and the osteogenic abilities of both groups were evaluated. Furthermore, several kinds of hydrogels were examined as scaffolds in which cells were to be proliferate.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 骨再生 細胞分取

1. 研究開始当初の背景

顎顔面再建、咬合再建は、先天的・後天的顎顔面変形を扱う口腔外科においては重要な基本技術であり、優れた骨形成能を示し、実臨床で実装できる安全で経済的な骨増高材を開発することは、同領域の本質的な課題である。例えば、デンタルインプラントは、歯欠損により失われた機能を回復し、審美的な改善が可能な優れた治療法である。しかし、上顎洞底部に至るまでの既存骨量が乏しい場合には、上顎洞粘膜を挙上し、生じた空隙に骨造成を行う(サイナスリフト)。空隙に移植する材料として、自家骨や他家骨、異種骨、人工材料がある(図1)。

自家骨は骨形成能、骨誘導能、骨伝導能を持ち、骨造成という点においては最も優れているが、患者への侵襲が大きく、また採取骨量には限界がある。さらに、インプラント植立は自由診療で行われるため、患者の経済的負担も無視できない。一方他家骨は本邦では保険収載されてお

自家骨	異種骨(ウシ)
○骨造成、骨置換性	○コスト
×採取の侵襲	○採取の侵襲がない
×コスト	×未知の感染症リスク
他家骨	×骨置換性不良
○採取の侵襲がない(本人)	人工材料
×入手性	○コスト
×未知の感染症リスク	○採取の侵襲がない
	×骨置換性不良の可能性

図1: 骨造成に用いる既存の材料

らず、安定した供給に課題があり、また未知の感染症のリスクも存在する。

異種骨としてはウシ骨から有機成分を除去した、ウシ由来代用骨が臨床において頻繁に使用されており、優れた長期成績が報告されている(Starch-Jensen et al. Int J Oral Maxillofac Surg. 2018)。しかし、ヒトサイナスリフト患者からの組織検体の評価で、10年を超える長期間体内に残存することが確認されており(Mordenfeld. Clin Oral Implants Res. 2010、Ayna et al. Int J Periodontics Restorative Dent. 2015、Traini et al. Clin Implant Dent Relat Res. 2015)。これが異物反応や慢性的な炎症、軟部組織穿孔などの原因になっている可能性がある(Rodriguez et al. J Indian Soc Periodontol. 2019)。さらに、牛海綿状脳症の原因となるプリオンの伝達を懸念する報告もある(Kim et al. Clin Implant Dent Relat Res. 2013、Kim et al. Clin Implant Dent Relat Res. 2016)。

人工材料として、炭酸アパタイトは良好な臨床成績が報告されており、既存の人工骨に比べ吸収を受けやすいとされるが、臨床例において8か月時点ではまだ体内への残存が認められる(Nakagawa et al. J Periodontal Implant Sci. 2019)。完全に分解されるかどうかは今後の長期観察が必要である。

サイナスリフトに対するこれらの現行治療における問題点を解決可能な方法として、細胞、足場、成長因子などを組み合わせて使用し、組織・臓器の再生を図る再生医療の応用が期待されている。口腔外科領域においても、動物モデルにおいてインプラント周囲の骨欠損に対し、間葉系幹細胞を足場に搭載して移植した報告のメタアナリシス(Shanbhag et al. J Tissue Eng Regen Med. 2018)、サイナスリフトに間葉系幹細胞を用いた報告のレビュー(Parnia et al. Stem Cells Int. 2018)などで、細胞搭載の有効性が示されている。しかし、間葉系幹細胞を得るためには細胞加工施設での培養が必要であるが、それによるコストの増大が実際に再生医療を臨床応用する上での障壁となっている。再生医療が実際の臨床でサイナスリフトへ応用される治療法となるには、適切な足場材料の選定に加え、低コストで有用な細胞を得

るための方策が必要とされている

2. 研究の目的

本研究の目的は、サイナスリフトなどに応用可能な、低侵襲かつ低コストで優れた機能的骨再生を実現する方法を開発することである。骨再生能の高い細胞群を選択的に採取して、さらには骨芽細胞増殖・分化能の高い分解性ゲルとともに移植することで、サイナスリフトに応用可能な骨再生法の確立を試みる。

3. 研究の方法

骨髄細胞を採取し、その後赤血球破碎や Ficoll 濃度勾配遠心法による単核球濃縮などの処理を加え、得られた細胞の骨形成能を評価することで、適切な処理法を決定する。また、骨形成能の高い骨髄細胞中の細胞集団を single cell RNA sequence あるいは細胞分裂速度の違いを利用して同定し、Ghost Cytometry を用いた分取法確立につなげる。細胞とともに移植する足場としては、自己組織化ペプチドハイドロゲルやアテロコラーゲン、1型コラーゲンおよび2型コラーゲンを種々の割合で混和したものなどについて検討し、その濃度や修飾などの仕様を決定する。

4. 研究成果

優れた骨再生を実現するための細胞群の同定のため、まず、C57BL/6J マウス脛骨および大腿骨骨髄をフラッシュして採取した直後の骨髄細胞を、1.そのまま播種したもの、2.赤血球を破碎したもの、3.Ficollを用いた密度勾配遠心で単核細胞を分離したものについて、in vitro での検討を行った、具体的には、これらの方法で分取した細胞を一定期間増殖させた後に、 β -Glycerophosphate、アスコルビン酸を添加した培地で骨芽細胞分化培養を行い、アルカリフォスファターゼ染色、アリザリンレッド染色を行って骨形成能を比較した。

その結果、赤血球を破碎したもので最も良好な石灰化結節の形成が認められた。Ficollを用いた密度勾配遠心による分離法においては石灰化結節の形成が弱く、この方法で処理した細胞については細胞数が少ないことが問題になることが示唆された。この結果をさらに検証するために、細胞数をそろえて3群の細胞を播種し、骨芽細胞分化能を比較したが、やはり同様の結果であった(図2)。これは、骨芽細胞前駆細胞の基となる間葉系幹細胞はFicollを用いた密度勾配遠心による単核球分取により濃縮され、骨形成が良好となるという予想に反するものであ

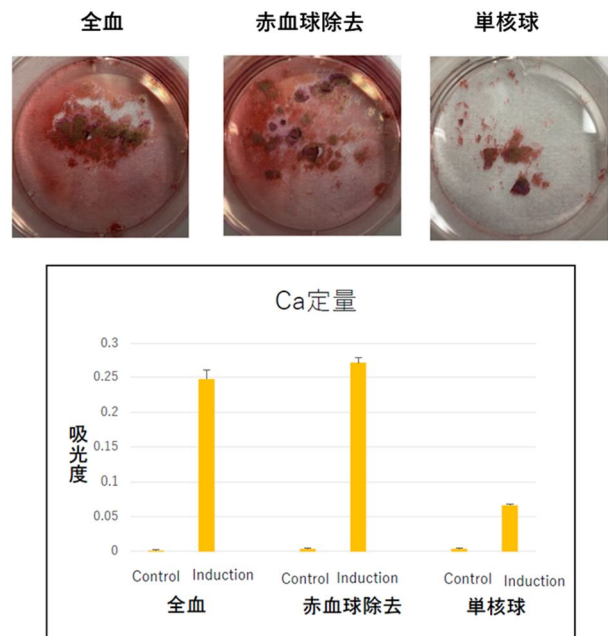


図2：骨髄細胞の各処理群における骨芽細胞分化能の検討

った。

この理由については、1. Ficoll 密度勾配遠心による単核球分取では間葉系幹細胞が濃縮されていると仮定していたが、実際は何らかの原因で濃縮されていない可能性、2. 間葉系幹細胞以外の細胞が骨芽細胞分化を促進しており、Ficoll による分取でそれらの細胞が失われる可能性、が考えられた。

そのため、まず上記1の仮説について、間葉系幹細胞マーカーである CD90, CD105 等の発現についてフローサイトメトリーでの検証を行った。しかし、採取直後の骨髓細胞は非常に雑多な集団であり、明らかな傾向がつかめなかった。そのため、多重染色による細胞集団の解析を行った。具体的には、細胞を CD34、CD73、CD51 に対する蛍光標識抗体でラベルし、CD34-CD73 + CD51 + 細胞群の割合についてフローサイトメトリーでの検証を行ったところ、Ficoll 群では赤血球破碎群に比べてこの細胞群の割合が減少していた(図3)。そのため、

骨髓細胞を濃縮して骨形成の促進を図るためには、Ficoll を用いた密度勾配遠心におけるこの細胞群の喪失を防ぐ方が重要であると考えられた。

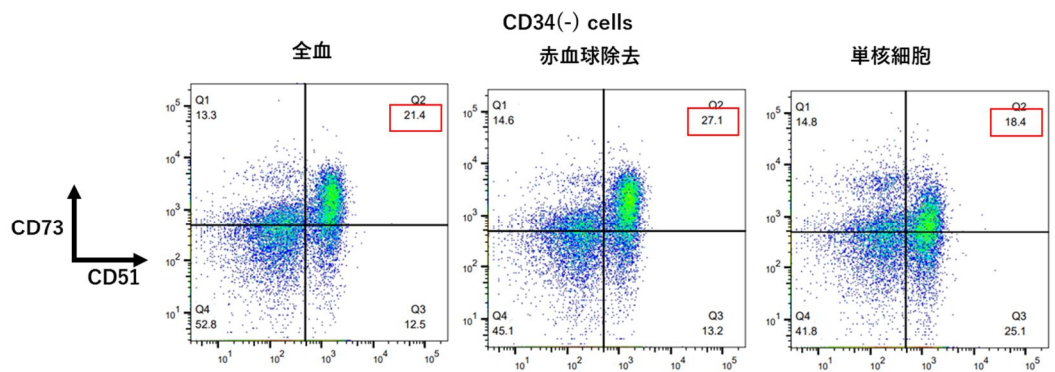


図3：骨髓細胞の各処理群におけるCD34(-)CD51(+)-CD73(+)細胞

また、骨髓細胞中に含まれる骨形成能の高い細胞集団を同定する方法として、細胞分裂速度の違いによる細胞の分取法を検討した。間葉系幹細胞を蛍光試薬 Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)を用いて標識し、一定期間培養したのちに、Flow cytometry を用いた解析を行った。その結果、細胞分裂速度の違いにより細胞当たりの試薬の希釈の程度が異なることで、蛍光強度を示すヒストグラムが幅広く分布することを確認した(図4)。これにより細胞分裂が早い群と遅い群を分取し、それぞれの骨形成能を比較した。

並行して、Ghost Cytometry による骨髓細胞分取に先立ち、間葉系幹細胞の分化した細胞であるヒト軟骨細胞について、CFSE 染色することで細胞分裂の早い群と遅い群を識別し、Ghost cytometer での分取を試みた。細胞分裂の早い群 (Rapid 群) の形態情報を AI に学習させ、判別モデルを作成した。このモデルを基に、形態情報に基づいた分取を行ったところ、Rapid 群を2倍以上に濃縮することができた。また、分取した Rapid 群は分取していない細胞群に比べ、高い軟骨形成能を示した。これは、以前の研究で得た、細胞分裂の早い細胞群が高い軟骨形成能を示すという結果に一致しており、Ghost cytometry を用いた分取法の有用性を示すものとなった。

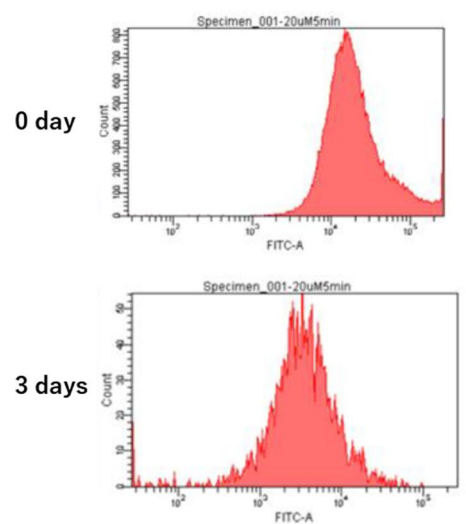


図4：CFSE染色後のヒストグラム

また、自己組織化ペプチド水素ゲル(PuraMatrix)、アテロコラーゲンを用いて細胞を懸濁し、作製した細胞含有ゲルを *in vitro* 分化培養、あるいはマウスへの移植を行い、回収して病理組織切片を作製し、組織形成を比較検討し、ゲルの素材の違いによる組織成熟の様式について解析した。また、I型コラーゲンとII型コラーゲンの混和物についても検討を進めており、その混合割合を変えた際の細胞増殖能などについて解析を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Igarashi H, Nishizawa S, Miyamoto T, Hikita A, Hoshi K.	4. 巻 48 (1)
2. 論文標題 Involvement of Impaired Angiogenesis and Myelosuppression in Antiresorptive-agent Related Osteonecrosis of the Jaw Mouse Model.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tokai J Exp Clin Med.	6. 最初と最後の頁 22 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Uto Sakura, Hikita Atsuhiko, Mori Daisuke, Sakamoto Tomoaki, Yano Fumiko, Ohba Shinsuke, Saito Taku, Takato Tsuyoshi, Hoshi Kazuto	4. 巻 29
2. 論文標題 Subcutaneously Transplanted Fresh Cartilage in Allogeneic and Xenogeneic Immunocompetent Mouse	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 541 ~ 556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEA.2023.0052	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 Inaki Ryoko, Sato Yoshihiko, Nakamura Daisuke, Aikawa Yoshiyuki, Takato Tsuyoshi, Hoshi Kazuto, Hikita Atsuhiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Lipoaspirate stored at a constant low temperature by electric control suppresses intracellular metabolism and maintains high cell viability	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 662 ~ 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2023.11.005	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 Zheng Chenhuang, Hoshi Kazuto, Hikita Atsuhiko	4. 巻 42
2. 論文標題 miR-92a-3p-inspired shRNA exhibits pro-chondrogenic and chondrocyte protective effects in osteoarthritis treatment through targeting SMAD6/7	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 1 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-023-01474-3	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 Hisao Igarashi, Satoru Nishizawa, Takeshi Miyamoto, Atsuhiko Hikita, Kazuto Hoshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Involvement of impaired angiogenesis and myelosuppression in antiresorptive-agent related osteonecrosis of the jaw mouse model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tokai J Exp Clin Med.	6. 最初と最後の頁 22 - 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kengo Kanda, Yukiyo Asawa, Ryoko Inaki, Yuko Fujihara, Kazuto Hoshi, Atsuhiko Hikita	4. 巻 11
2. 論文標題 Requirement of direct contact between chondrocytes and macrophages for the maturation of regenerative cartilage.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01437-6	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 Reina Shimizu, Yukiyo Asawa, Makoto Komura, Kazuto Hoshi, Atsuhiko Hikita	4. 巻 19
2. 論文標題 Superior stemness of a rapidly growing subgroup of isolated human auricular chondrocytes and the potential for use in cartilage regenerative therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 47-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.12.005	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 星和人
2. 発表標題 口腔科学が牽引する21世紀の医療
3. 学会等名 第77回NPO法人日本口腔科学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星和人
2. 発表標題 ティッシュエンジニアリング技術を活用した硬組織再生医療
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 清水 玲那, 浅輪 幸世, 能丸 寛子, 古村 眞, 星 和人, 疋田 温彦
2. 発表標題 細胞分裂速度の異なる軟骨細胞の特性評価および純化分離方法の検討
3. 学会等名 第76回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 H. Nomaru, R. Shimizu, K. Teranishi, Y. Asawa, Y. Kawamura, A. Hikita, K. Hoshi
2. 発表標題 Label-free machine vision-based cell sorting for tissue engineering
3. 学会等名 The 28th Annual ISCT Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Teranishi, Hiroko Nomaru, Reina Shimizu, Satoru Akai, Yuri An, Kaoru Komoriya, Yoko Kawamura, Asako Tsubouchi, Yukiyo Asawa, Atsuhiko Hikita, Yusuke Konishi, Kazuto Hoshi, Seiichiro Tabata, Sadao Ota
2. 発表標題 Applications of machine vision-based cell sorting for clinical diagnosis and cell therapy
3. 学会等名 Cyto2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水 玲那、浅輪 幸世、古村 眞、星 和人、疋田 温彦
2. 発表標題 細胞分裂速度の異なる軟骨細胞の特性評価
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021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	浅輪 幸世 (Asawa Yukiyo) (10769912)	東京大学・医学部附属病院・特任講師 (12601)	
研究分担者	疋田 温彦 (Hikita Atsuhiko) (60443397)	東京大学・医学部附属病院・特任教授 (12601)	
研究分担者	西條 英人 (Saijo Hideto) (80372390)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	

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