

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390364

研究課題名（和文）大型骨欠損に対する次世代骨再生技術の開発

研究課題名（英文）Optimization of Regeneration Technique for Large Bone Defect

研究代表者

名井 陽（Myoui, Akira）

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10263261

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,300,000 円、（間接経費） 4,290,000 円

研究成果の概要（和文）：骨髄単核細胞中のLNRT細胞、MUSE細胞は細胞表面マーカーにより純化可能であったが、古典的な間葉系幹細胞（MSC）と比べて臨床応用に必要な体外での培養による増幅は困難であった。

ドキシソルビン投与後のラット骨髄、脂肪、筋肉由来のMSCの増殖能、分化能を検討した結果、化学療法の影響は脂肪由来MSCで最も少なかった。

細胞の播種密度、低酸素培養および培養皿の表面加工処理などの因子を組み合わせた技術により、iPS細胞から間葉系前駆細胞への分化誘導を高効率でかつ安全に行うことに成功し、サイトカイングラディエント法による無血清培地での骨芽細胞系細胞の誘導が可能となった。

研究成果の概要（英文）：We successfully purified LNRT cells and MUSE cells from the bone marrow mononuclear cells by the cell surface marker. However, in vitro amplification of those specific stem cells that was required for clinical application seemed difficult compared with classic mesenchymal stem cells (MSCs).

After administration of doxorubicin, rat MSCs derived from bone marrow, fat, and muscle tissue were investigated for capacity of proliferation and differentiation. The negative impact of chemotherapy was least in adipose-derived MSCs.

We succeeded in the art that a combination of factors such as seeding density of cells, surface treatment of the culture dish, and hypoxic culture condition differentiate mesenchymal progenitor cells from iPS cells safely and with high efficiency. In addition, we found that the cytokine gradient method in serum-free medium induced the progenitors into osteoblastic lineage.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨再生医療 間葉系幹細胞 化学療法 悪性骨腫瘍 骨芽細胞分化 無血清培地 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 間葉系幹細胞などを利用した骨再生医療は未だ確立された治療法では無く、海外で一部産業化されているものの、我が国では大学で臨床研究の段階である。大型骨欠損の再生医療に於いて一つの大きな課題はいかに効率的に必要な数、性質の細胞を得るか、ということである。最適化されていない方法で長期間の培養により細胞を増幅、分化誘導することは、細胞の形質転換や細菌等のコンタミネーションの可能性が増大するばかりでなく、治療スケジュールの制限、細胞準備費用の増大などを招くこととなり、医療としての実用化、産業化に大きなマイナス要素となり得る。これまで多くの臨床研究で用いられてきた「骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)」は低い細胞密度で播種した骨髄細胞の培養で付着性細胞としてえられた細胞を集めたものであり、生物学的には多様な細胞の混合と考えられている。しかし実際には骨髄有核細胞のうち 10 万から 100 万個に 1 個程度が自己複製能を持つ本当の幹細胞であり、選択的に増幅させることは難しく、また併存する他の細胞群が MSC の増幅、分化に及ぼす影響について十分な検討がなされておらず、間葉系幹細胞の細胞製剤として均一な品質を得ることを困難にしている。一方、最近の我が国の間葉系幹細胞に関する基礎研究では、従来の間葉系幹細胞のうち、特に高い増殖能、多分化を維持する分画が同定されてきた。PaS(PDGF α + Sca-1+) 細胞や LNRT(CD271[LNGFR]+ CD90[Thy-1]+)細胞、また特にストレス抵抗性と多胚葉系分化能、増殖能を持つ MUSE 細胞(SSEA-3+ CD105+)などである。これらの細胞を選択的に増幅して分化誘導する方法を最適化し骨再生医療に応用すれば、均一な品質の細胞を効率よく供給して有効性、安全性、経済性の面でも大きな技術革新となる。

大型骨欠損、特に悪性腫瘍による大型骨欠損の再生医療を応用した治療法を開発するにあたり、もう一つの大きな問題点は、抗がん剤の幹細胞に対する影響である。超大量化学療法の実施後は骨髄中に含まれる間葉系幹細胞の数が減少するという報告も見られるが、骨芽細胞への分化能、生体内での骨再生能にどのような影響

があるかは明らかにされていない。悪性骨腫瘍患者での臨床応用を実施する前に、従来法で分離増幅される骨髄間葉系幹細胞およびその機能が化学療法よりどのような影響を受けるか、増殖能/分化能の優れた上記細胞分画、あるいは他の組織由来の間葉系幹細胞がどのような影響を受けるのかについて明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

(1) 大型骨欠損における骨再生医療の臨床応用へむけて非臨床における開発を総合的に推進する。具体的には、

骨再生医療用細胞の最適増幅、骨芽細胞分化誘導法について検討する。従来の骨髄付着系細胞培養法で得られる細胞と比較し、間葉系幹細胞の中でも特に高い増殖能、多分化を維持することで注目されている分画の有効性、安全性を検討する。

免疫不全動物を用いた骨再生モデルを作製し、各種細胞の骨再生能、安全性を *in vivo* で検討して有用性を明らかにする。

化学療法後の骨再生医療用細胞ソースとして、各種細胞ソースの適切性を検討する。

3. 研究の方法

(1) LNRT 細胞、MUSE 細胞と古典的 MSCs(CD105+/CD34-)の分離と増幅に関する比較

近年、細胞表面マーカーを用いることで高い増殖能、多分化能を維持する均一な性質の間葉系幹細胞を分離することが可能となってきた。ヒトの骨髄から採取可能である LNRT 細胞、MUSE 細胞と古典的 MSCs(CD105+/CD34-)細胞を分離し、それぞれ骨髄単核細胞中の存在比率を確認し培養方法を検討した。

(2) 化学療法後ラットから分離した間葉系幹細胞の特性評価

骨肉腫・固形癌等に対する化学療法で広く使用されているドキソルピシン 8mg/kg を SD ラット(雄、9 週齢)へ経静脈的に単回投与し、骨髄抑制期(4 日後)と回復期(4 週後)に下肢骨髄・鼠径皮下脂肪・大腿直筋から MSCs の初代培養を行った。生理食塩水投与群を対

照群とし、採取細胞数・コロニー形成能・増殖能を比較した。初代培養後の細胞表面マーカー (CD11b、CD34、CD45、CD90) の発現を FACS により解析した (図 1)。

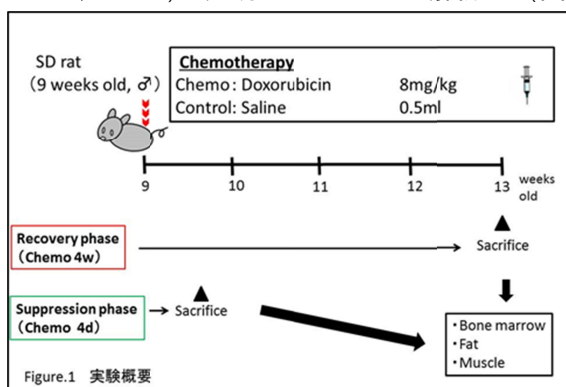


図 1 化学療法後ラット由来間葉系幹細胞の検討

(3) iPS 細胞から高効率に間葉系前駆細胞を作製する培養誘導法の確立

京大 iPS 細胞研究所で樹立されたマウス iPS 細胞株 (20D17) を用いて、サイトカインと低分子化合物併用による誘導効率について基礎検討を行った。iPS 細胞から EB 形成を経ずに平面培養を行い、中内胚葉系細胞から中胚葉系細胞を経て、有血清あるいは無血清培地での種々のサイトカインおよび低分子化合物添加による間葉系前駆細胞への培養誘導条件を検討した。骨芽細胞系細胞への分化誘導を行い、培養皿の表面処理と誘導培養条件の組み合わせについて、分化指向性および分化誘導効率に関して基礎的検討を行った。

4. 研究成果

(1) LNRT 細胞、MUSE 細胞と古典的 MSCs (CD105+/CD34-) の分離と増幅

MUSE 細胞

ヒトの骨髄由来単核細胞中の約 0.2% に MUSE 細胞 (SSEA3+/CD105+) を確認した。骨髄液 5ml 中からは約 $1.0 \sim 2.0 \times 10^3$ 程度の MUSE 細胞が採取可能であった。(図 2)

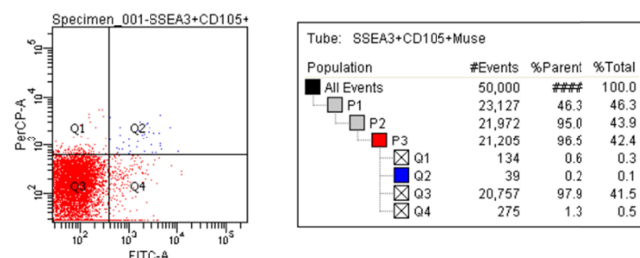


図 2 細胞表面マーカーによる MUSE 細胞の分離

次に様々な条件下で MUSE 細胞を効率的に増殖させる方法を検討した。

・メチルセルロースを用いた M-cluster 培養 → 付着培養

公表されている手順に従い (Kuroda K et al., PNAS, 2010) 48 well dish に 1.0×10^3 個の骨髄より採取した MUSE cell を M-cluster 培養 (図 3-1) ののち付着培養 (図 3-2 Day 0, x40) に移行し増殖を評価した。

付着後 7 ~ 14 日間は徐々に増殖しコロニーを形成したが、それ以降は細胞形態が変化し細胞質が腫大し 14 ~ 21 日後には細胞数の増加は停止し以降細胞数は減少傾向を認めた (図 3-3: Day12, 4: Day26, x40) (培養中の最大細胞数 $2.0 \sim 4.0 \times 10^4$ cells / well : 48well dish の 20~30% コンフルエント程度)。

次に付着培養後、7 日目程度で継代を繰り返し細胞数の増加を検討したが、むしろ継代ごとに細胞増殖能は失われ 4~6 回程度の継代操作で細胞形態は変化し、まったく増殖しない状態となった。

付着培養後、FBS 濃度を 5%、1% に減量して細胞増殖を確認したがいずれも 10% FBS 以上の増殖を認めなかった。また低酸素条件下 (5% O_2) での培養も検討したが、低酸素条件下ではほとんど細胞増殖を認めなかった。

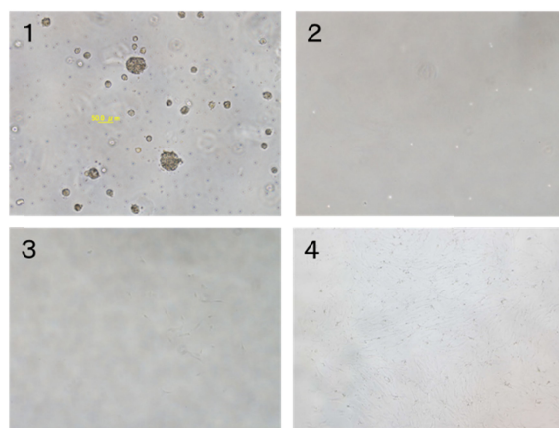


図 3 MUSE 細胞の cluster 培養と付着培養

LNRT 細胞 (CD271[LNGFR]+/CD90[Thy-1]+)

ヒトの骨髄由来単核細胞中の約 0.04% に LNRT 細胞 (CD271[LNGFR]+/CD90[Thy-1]+) を確認した。骨髄液 5ml 中からは約 $2.0 \sim 4.0 \times 10^2$ 程度の LNRT 細胞が採取可能であった。(図 4)

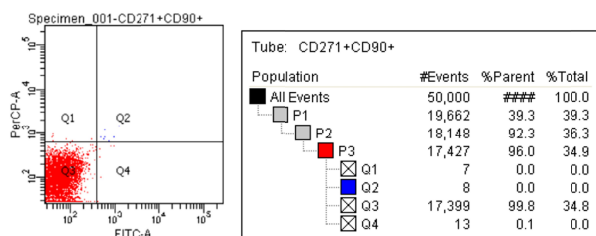


図 4 細胞表面マーカーによる LNRT 細胞の分離

採取した数百個の LNRT 細胞を DMEM(+20% FBS)で通常の付着培養を行ったところ、コロニーを形成し、培養開始後 3~4 週で急速にコロニーは増大、細胞の増殖を確認した (図 5 1: Day0, 2: Day26, x40)。しかし、個々のコロニーが接すると急激に細胞増殖は停止し以後細胞増殖を認めなかった。付着培養開始後、コロニー同士が接する前に継代操作を行っても初代培養のように急速なコロニーの増大は認めず、すぐに細胞の増加は停止した。また、低酸素条件下 (5%O₂) での培養も検討したが低酸素条件下ではコロニー形成、細胞増殖いずれも通常酸素濃度下よりも不良であった。

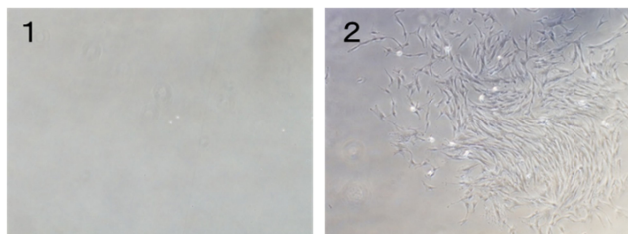


図 5 LNRT 細胞の付着培養による増幅

古典的 MSCs(CD105+/CD34-)細胞

ヒトの骨髄由来単核細胞中の約 0.6% に古典的 MSCs(CD105+/CD34-)細胞を確認した。骨髄液 5 ml 中からは約 4.0~8.0x10³ 程度の古典的 MSCs (CD105+/CD34-)細胞が採取可能であった (図 6)。

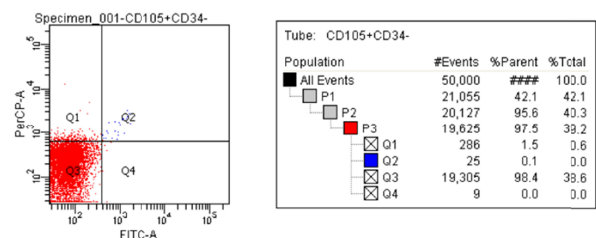


図 6 細胞表面マーカーによる MSC の分離

骨髄単核細胞中の各細胞の存在比率は LNRT 細胞、MUSE 細胞、古典的 MSCs いずれも過去の文献的報

告と比して差異のない数を分離可能で LNRT 細胞においては通常の平面培養で均一な形態の細胞を比較的速い速度で増殖可能であることを確認できたがコロニーの接触や継代操作で細胞増殖能は急激に失われた。MUSE 細胞は M-cluster 培養→付着培養を繰り返すことで非常に緩徐に細胞増殖を認めたが、付着培養を単純に継続するのみでは増殖、維持が困難で徐々に形態の異なる細胞に変化した。LNRT 細胞、MUSE 細胞ともに低酸素条件下では細胞増殖能は不良であった。

(2) 化学療法後ラットから分離した間葉系幹細胞の特性

ドキシソルピシン投与後、末梢血球数は 4 日で最小値、4 週間で正常範囲に回復し、それぞれをこのモデルにおける骨髄抑制期、回復期とした (図 7)。

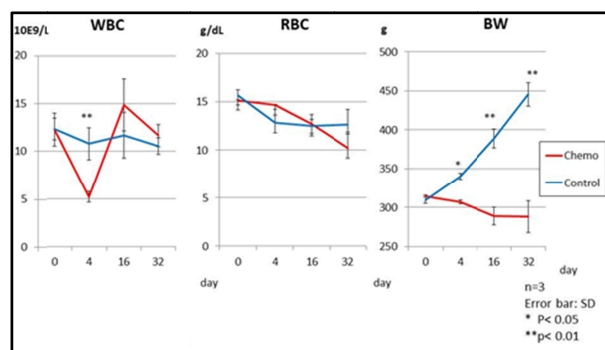


図 7 化学療法後のラットの末梢血球数と体重の変化

MSCs 分離時の組織あたりの回収細胞数 (図 8) とコロニー形成能 (図 9) は対照群に比して、骨髄抑制期、回復期共にすべて低下していた。回復期では骨髄および脂肪由来 MSCs でこれら数値の回復傾向を認めたが、筋肉由来ではさらに低下した。化学療法によるこれら影響は脂肪由来 MSCs が最も軽度であった。

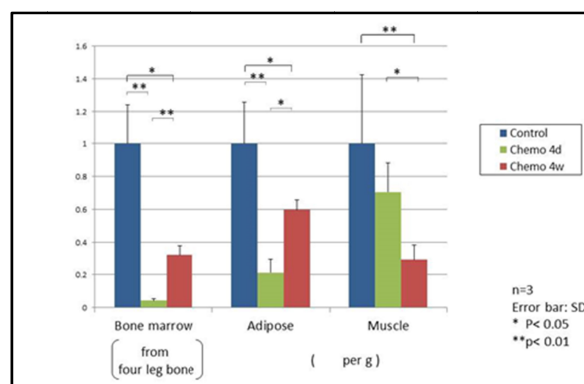


図 8 各組織からの総回収細胞数

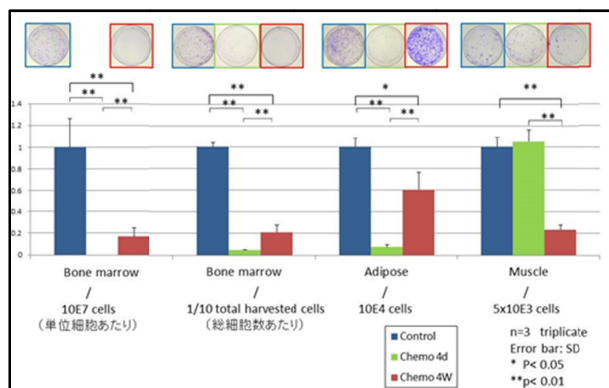


図9 各組織由来細胞のコロニー形成能

細胞増殖アッセイ (WST8 assay) では有意差はなかったものの、すべての組織由来 MSCs で増殖能が抑制される傾向にあった(図10)。

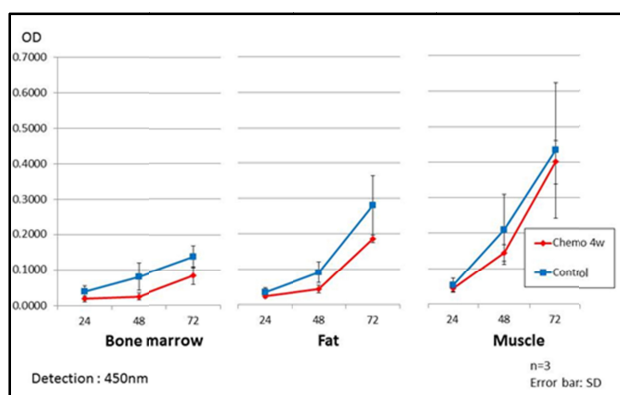


図10 各組織由来間葉系幹細胞の初代継代時の増殖能

FACS では各組織由来で CD11b-CD34-CD45-CD90+細胞群(MSC 様細胞群)を認め、継代と共にその比率は増加した(図11)。脂肪細胞においては、細胞分離直後の MSC 様細胞群の比率は低下していたものの、3回の継代によりコントロール群と同程度の比率となったが、骨髄由来細胞は回復期に採取した細胞は3回継代培養後も、コントロール群に比して MSC 様細胞群の比率は低値を示した。

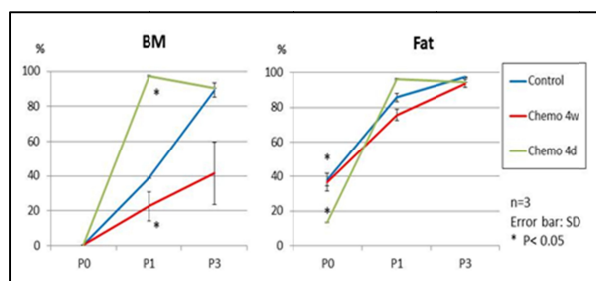


図11 骨髄および脂肪組織由来 MSC の比率の推移

以上の結果により、ドキシソルピシン投与後の生体内の骨髄、脂肪、筋肉由来の MSCs においては、脂肪由来 MSCs に対する影響が最も少ないと思われた。この治験は化学療法施行後の再生治療において細胞源や治療時期の決定に有用と考える。

(3) iPS 細胞から高効率に間葉系前駆細胞を作製する培養誘導法

iPS 細胞から間葉系前駆細胞への分化誘導において、細胞の播種密度、低酸素培養および培養皿の表面加工処理などの因子を組み合わせた技術により、高効率でかつ安全に分化誘導を行うことを可能にし、サイトカイングラディエント法による無血清培地での骨芽細胞系細胞の誘導が可能となった(図12)。iPS 細胞から間葉系前駆細胞への誘導を高効率に行うためには、分化誘導を開始する時点での細胞の播種密度が最も重要であることが示された。ES 細胞の平面培養による分化誘導法で推奨されている培養皿の各種コーティングだけでは、培養誘導は不十分であり、低温プラズマ法をはじめとする表面加工処理が重要であることが示された。とくに荷電処理された培養皿と低酸素培養条件の組み合わせにより誘導効率が著しく向上することが明らかとなった。また、遺伝子発現解析により、誘導細胞は、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞や MC3T3-E1 細胞と骨芽細胞分化マーカーの発現が同傾向であったことを確認した(図13)。今後は、誘導細胞を実験動物生体内に移植した場合、骨組織への適切な分化を遂げるのか否か検証が必要である。また、造腫瘍性試験による安全性と in vivo での骨再生能を評価することが今後の課題である。

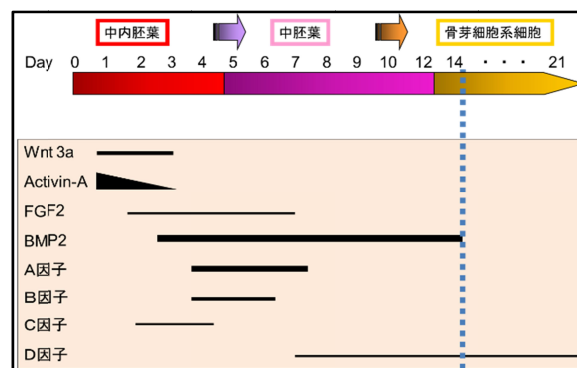


図12 サイトカイングラディエント法による骨芽細胞分化誘導

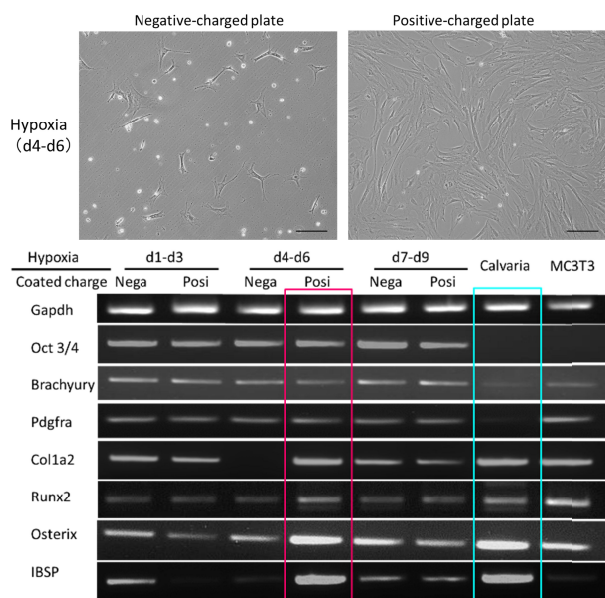


図 13 培養表面の荷電と低酸素環境による分化への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Honda H, Tamai N, Naka N, Yoshikawa H, Myoui A.: Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in Rattus norvegicus calvaria defect model. J Artif Organs, 査読有り 16:305-315, 2013.

Lee DS, Moriguchi Y, Myoui Y, Yoshikawa H, Hamaguchi S. Efficient modification of the surface properties of interconnected porous hydroxyapatite by low-pressure low-frequency plasma treatment to promote its biological performance. J Physics D: Applied Physics 査読有り 2012;45(37):1-5.

doi:10.1088/0022-3727/45/37/372001

〔学会発表〕(計 27 件)

宮本 諭、吉川秀樹、名井 陽 : iPS 細胞から骨芽細胞系細胞への分化誘導システムの確立、第 31 回日本骨代謝学会 (2013.5.30、神戸)

〔図書〕なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : バイオセラミックスを含む人工骨の改質方法

と、その方法で改質された人工骨

発明者 : 浜口 智志、吉川 秀樹、名井 陽ほか

権利者 : 国立大学法人大阪大学、株式会社電子技研

種類 : 特許

番号 : 特許公開 2013 - 215240

出願年月日 : 平成 24 年 4 月 4 日

国内外の別 : 国際

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

名井 陽 (MYOUI Akira)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 : 10263261

(2) 研究分担者

中 紀文 (NAKA Norifumi)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 : 90601964

樋口 周久 (HIGUCHI Chikahisa)

大阪大学・保健センター・助教

研究者番号 : 40432421

岡本 美奈 (OKAMOTO Mina)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 50457008

本田 博嗣 (HONDA Hirotsugu)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 40432421

橋本 伸之 (HASHIMOTO Nobuyuki)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター (研究所)・リハビリテーション科・部長

研究者番号 : 50324752

竹中 聡 (TAKENAKA Satoshi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 00588379