

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462996

研究課題名(和文)再生前駆細胞と生体内成熟促進因子を活用した新規軟骨再生法の開発

研究課題名(英文)Development of novel cartilage regeneration method utilizing regenerative precursor cells and in vivo maturation promoting factor

研究代表者

菅野 勇樹 (KANNO, Yuki)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80451813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内で再生組織を構成する再生前駆細胞を同定して選別するとともに、生体内の軟骨成熟促進因子を明らかにし、両者を利用して軟骨再生組織の移植前成熟を実現し、再生組織の特性を飛躍的に向上させることを目的とした。移植母床からの成熟促進因子確認のために培養マウス軟骨細胞を播種したPPプレートを用いたヌードマウス腹腔内に移植。移植後回収した腹水上清並びに腹水細胞をヒト軟骨細胞と共培養し、遺伝子発現を評価した。腹水細胞のmRNAにおいて発現変化を検索し、軟骨成熟を強力に誘導する遺伝子を検索した。腹水上清中のタンパク質について解析を行い軟骨成熟を促進する因子を検索した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identify regenerative precursor cells that constitute regenerative tissues in vivo, select them, clarify the cartilage maturation promoting factor in vivo, realize maturation before transplantation of cartilage regeneration tissue by utilizing both, It aimed to dramatically improve the characteristics of regenerated tissue. A PP plate seeded with cultured mouse chondrocytes for confirmation of the maturation promoting factor from the transplanting mother bed was transplanted into the abdominal cavity of a nude mouse. Ascites supernatant collected after transplantation and ascites cells were co-cultured with human chondrocytes and gene expression was evaluated. In the ascitic cell mRNA, the expression change was searched and the gene strongly inducing cartilage maturation was examined. For proteins in the ascites supernatant, analysis was performed to examine factors that promote cartilage maturation.

研究分野：顎口腔外科

キーワード：再生前駆細胞 成熟促進因子 再生軟骨

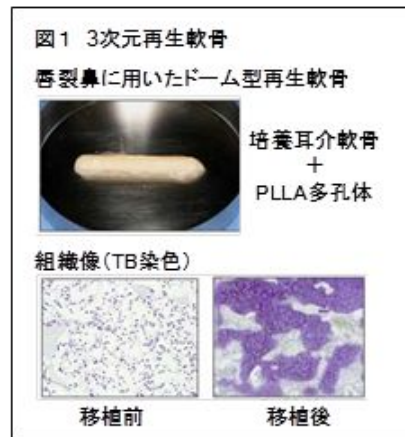
1. 研究開始当初の背景

口腔顎顔面領域の腫瘍切除に伴い、顎、鼻や顎関節など硬組織が切除される場合、審美的および機能的な障害が大きく、患者の QOL は著しく低下する。これに対し、近年のマイクロサージャリーによる血管柄付き組織移植により大型硬組織再建が可能となったが、顎顔面は形態的に複雑であり、同時に多くの機能を有しているため、これらを元のように再建するのは未だ困難で、完全に満足すべき結果を得るには至っていない。採植部位における侵襲性についても多くの課題が残る。また、若年者が罹患する口唇口蓋裂やヘミフェイスアルマイクロソミアなどを始めとする先天異常、あるいは外傷などにおいても、しばしば鼻や顎関節などの再建が必要となるが、これらを再建するための軟骨組織の採取部位は、耳介や肋軟骨などに限定されている。幼少期においては、いずれも量的に採取量が限られ、逆に 15 歳以降になると肋軟骨は骨化し始め、軟骨特有の弾性が失われてしまう。すなわち、現時点では、量的にも質的にも軟骨を用いて再建する事には、大きな制限がある。また、近年、耳介軟骨や鼻中隔軟骨が気管や関節など他臓器の軟骨再建の細胞源として注目されている。いずれの場合においても、軟骨を量・質ともに高効率に再生・再建することは、口腔顎顔面外科における重要な課題である。

この目的のため、患者から少量の細胞を採取し in vitro で培養して、欠損や機能不全に陥った組織に移植する再生医療への期待が益々高まってきている。しかし、現在、臨床で使用されている軟骨再生医療は、採取した患者由来細胞を培養して増殖させるものの、in vitro での基質産生や組織化を促すものではない。過去には、培養自家軟骨細胞を鼻背に注入し鼻の隆鼻術を行った報告がある [Yanaga et al Aesthetic Plast Surg. 2009]。しかし、実際には、未熟・未分化のまま直接患部に移植し、生体内に元来備わっている修復力・再生力が働いて再生組織を成熟させて、本来目的とした組織再生に至るものである。現在最も多く臨床に用いられているものの 1 つである軟骨再生医療も、その多くは、こうしたメカニズムを利用したものである。従って、移植時には形や機能を維持することができないため、適応できるのは局所的な欠損に限られる。

これに対し、申請者らは PLLA 足場素材を導入し、移植前の段階で既に力学強度や 3 次元形態を獲得している再生軟骨を開発した (図 1)。現在、この 3 次元再生軟骨を口唇口蓋裂の鼻変形の治療に活用している [Hoshi et al Oral Sci Int 2013]。しかし、この 3 次元再生軟骨も移植時の力学強度は足場素材の力学強度に依存するものであり、移植する軟骨細胞に関しては基質産生を行っていない未熟・未分化な細胞を移植している。移植後、

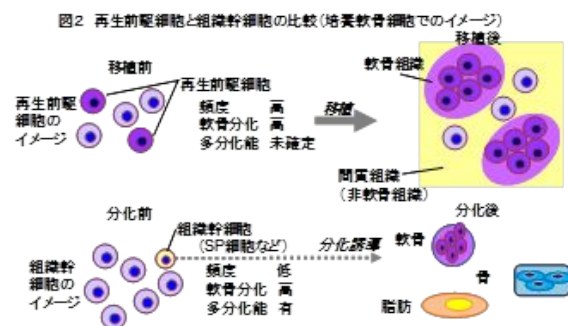
力学強度を維持していた PLLA 足場素材が徐々に生体内で吸収され消失し、それに同期して、移植した未熟・未分化な細胞が基質産生を獲得し、基質産生を始め、徐々にこの基質が蓄積することによって恒久的な力学強度と 3 次元形態を獲得するに至る。したがって、PLLA 足場素材の吸収と移植細胞による基質産生という異なる現象が同時にかつ円滑に起こらないと、移植後の形態維持や力学強度の保持が困難になる可能性は否定できない。

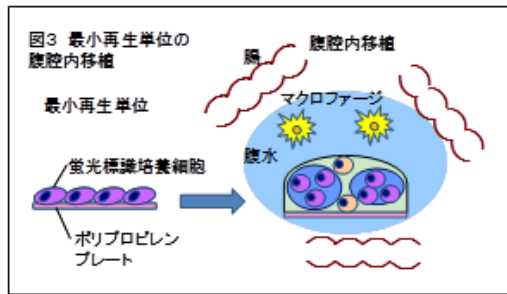


2. 研究の目的

再生前駆細胞の分取と成熟促進因子の同定により、従来法では実現しえなかった再生軟骨組織の強力な in vitro 成熟を実現することである。そのため、研究期間内 (平成 26 - 28 年、3 年間) に以下の項目を実施する (図 2、3)。

1. 移植後に生体内で再生組織を形成する細胞ポピュレーションの推計
2. 再生前駆細胞の濃縮
3. 再生前駆細胞による軟骨再生の検証
4. 移植母床からの成熟促進の確認
5. 成熟促進因子の同定
6. 再生前駆細胞ならびに成熟促進因子を活用したヒト細胞由来再生軟骨組織の検証
7. ビーグルを用いた軟骨再生モデルでの実証

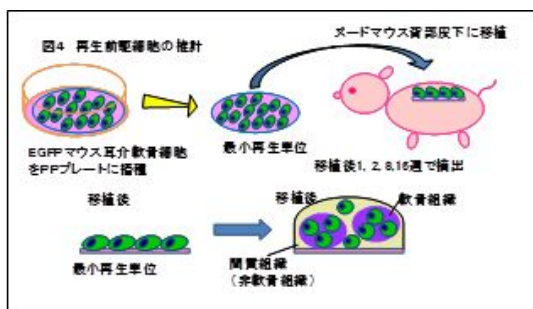




3. 研究の方法

(1) 移植後に生体内で再生組織を形成する細胞ポピュレーションの推計

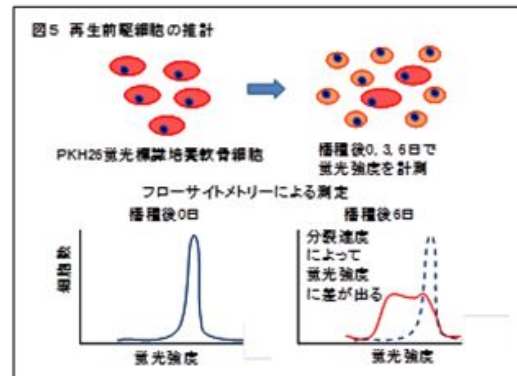
生体内に移植した培養軟骨細胞を経時的に観察し、軟骨再生を担う細胞ポピュレーションの存在確率を推計する。EGFP 遺伝子導入グリーンマウス(EGFP-C57BL/6J、6 週齢)より耳介軟骨を採取し、コラゲナーゼ処理により軟骨細胞を単離する。10%FBS 含有培養液で細胞を培養し第 2 継代の細胞(P2)を実験に使用する。P2 細胞をそれぞれポリプロピレン(PP)プレート(1.3 mm)上に播種し(10 万細胞)、培養 5 日後 PP プレートをとりだし最小再生単位として、ヌードマウス(6 週齢雄)の背部皮下に移植する。移植後 PP プレートを摘出する。PP プレート表面に接着している再生組織(最小再生単位)を切片にし、蛍光観察して移植細胞由来の領域を確認するとともに、HE 染色ならびにトルイジンブルー染色を実施し、再生組織の面積ならびに領域数を形態計測学的に評価する(図 4)。申請者らの先行研究では、再生組織は移植初期には島状を呈し、クローナルに細胞が増殖しているため単一細胞に由来することが示唆されている。移植細胞数と島状再生領域数を計測することにより生体内で再生組織を形成する細胞(再生前駆細胞)の存在確率を推計する。



(2) 再生前駆細胞の濃縮

このような再生前駆細胞は幹細胞特性が強いと考えられるため、invitro では急速に分裂する性質があると予想される。そのため再生前駆細胞を、培養軟骨細胞から分裂速度の速い細胞として分取する(図 5)。培養マウス

軟骨細胞(P2)を蛍光標識(PKH26)し、分裂速度の速い細胞は蛍光が早期に希釈されるという原理を活用し FACS で分裂速度の速い細胞を分取する。分取の割合に関しては(1)項の推計値を参考にする。細胞播種後 0, 3, 6 日に、蛍光標識した細胞群の波形をコントロール群(マイトマイシン C 処理で増殖を止めた群)の波形と比較する。標識細胞群で波形が徐々に幅広になり、分裂速度の速い細胞群と遅い細胞群とが存在することを確認した上で、分裂速度の違いで 2 群を分取する。



(3) 再生前駆細胞による軟骨再生の検証

分裂速度の速い細胞群として分取した細胞については軟骨への分化能を評価する。比較には分裂速度の遅い細胞群を用いる。まず invitro においては、細胞(10 万)をアテロコラーゲン(10 μ L)に混和してペレットを作製し、10%FBS 含有培養液で 3 週間培養する。RT-PCR で I 型コラーゲン、II 型コラーゲン、X 型コラーゲン、アグリカン、Runx2 などの遺伝子発現を評価するほか、トルイジンブルー染色、I 型コラーゲン免疫染色などを用いて評価する。

(4) 移植母床からの成熟促進の確認

成熟促進因子の評価を行うために、生体からの液性成分や細胞成分の採取が容易な腹腔内移植を検討する。培養マウス軟骨細胞を播種した PP プレートをヌードマウス(6 週齢雄)の腹腔内に移植する。移植後 PP プレートを摘出し、軟骨再生を前項の方法を用いて確認する。さらに PP プレートの回収とともに、ヌードマウス腹腔から腹水を回収し、腹水上清と腹水細胞を遠心分離する。腹水上清ならびに腹水細胞をヒト軟骨細胞と共培養し、一週間培養後、軟骨細胞の遺伝子発現を RT-PCR で評価する(図 6)。I 型コラーゲン、II 型コラーゲン、X 型コラーゲン、アグリカン、Runx2 などを評価し、成熟促進因子の発現、分泌を確認する。

(5)成熟促進因子の同定

(4)項で採取した腹水細胞の mRNA において発現変化を検索し、対照群(PP プレートのみを移植)の腹水細胞と比較して、軟骨の成熟を強力に誘導する遺伝子を同定する。また腹水上清中のタンパク質について解析を実施し、同様に対照群の腹水上清と比較して、軟骨の成熟を強力に促進する因子を同定する(図6)。

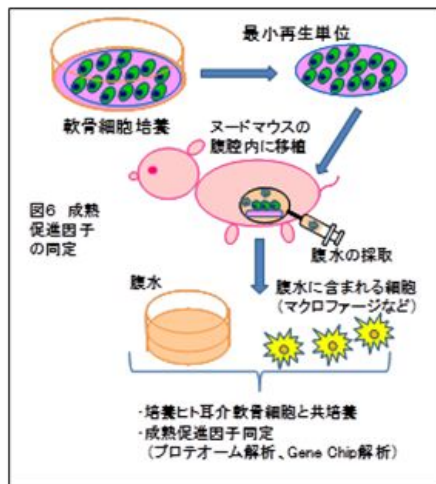


図6 成熟促進因子の同定

(6)再生前駆細胞ならびに成熟促進因子を活用したヒト細胞由来再生軟骨組織の検証

ヒト軟骨細胞は手術時に従来は破棄されていた組織を患者の同意のもと回収して単離する。軟骨細胞は、ヒト耳介より約 0.5g の軟骨を採取し、コラゲナーゼ処理で軟骨細胞を単離し培養皿に播種して、10%FBS 含有培養液で培養を行う。培養ヒト軟骨細胞を(2)項で検討した方法で分取する。それらの細胞を用いて、(3)項に準じ成熟促進因子を含有した培養液で in vitro で培養し、軟骨再生を誘導する。評価方法は(3)項に準じる。比較対照には、再生前駆細胞を用いない群や成熟促進因子を用いない培養群などを用いる。

(7)ビーグルを用いた軟骨再生モデルでの実証

ビーグル(6ヶ月齢雄)の耳介軟骨より軟骨細胞を採取し、(3)項の分取法で細胞を準備し PLLA 多孔体足場素材(20x10x3 mm) に投与し、成熟促進因子を添加した培養液で培養し、組織成熟を図る。(3)項に準じ、軟骨再生を評価するとともに、細胞を採取したビーグルで背部皮下移植モデルを作製し、移植組織を摘出する。評価は(3)項に準じる。なお、比較対照には、再生前駆細胞を用いない群や成熟促進因子を用いない培養群などを用いる。

4. 研究成果

本研究では、生体内で再生組織を構成する再生前駆細胞を同定して選別するとともに、生体内の軟骨成熟促進因子を明らかにし、両者を活用して軟骨再生組織の移植前成熟を実現し、再生組織の特性を飛躍的に向上させることを目的とした。移植母床からの成熟促進因子確認のために培養マウス軟骨細胞を播種した PP プレートをヌードマウス腹腔内に移植。移植後回収した腹水上清並びに腹水細胞をヒト軟骨細胞と共培養し、遺伝子発現を評価した。腹水細胞の mRNA において発現変化を検索し、軟骨成熟を強力に誘導する遺伝子として IGFBP-4 が候補として考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Saijo H, Sugiyama M, Kanno Y, Ohkubo K, Hoshi K, Takato T, A 2-stage reconstruction of the jaw using vascularized bone and secondary alveolar ridge augmentation with particulate cancellous bone and marrow, *Implant Dentistry*, 査読有, 25(2), 2016, 302-306. Doi: 10.1097/ID.0000000000000394.

Kanno Y, Nakatsuka T, Saijo H, Fujihara Y, Hikita A, Chung UI, Takato T, Hoshi K. Computed tomographic evaluation of novel custom-made artificial bones, "CT-bone", applied for maxillofacial reconstruction, *Regenerative Therapy*, 査読有, 5, 2016, 1-8, Doi: 10.1016/j.reth.2016.05.002.

[学会発表](計 2 件)

星 和人, 西條英人, 藤原夕子, 稲木涼子, 杉山 円, 菅野勇樹, 末永英之, 米永理一, 小笠原徹, 高戸 毅, 唇裂鼻2次修正に用いる再生軟骨 - 臨床研究と医師主導治験・企業治験の経験とその特徴, 第 61 回日本口腔外科学会総会, 2016年11月25日~27日, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

菅野勇樹, 口腔外科手術における自己フィブリン糊の使用, 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会, 2014年5月14日~17日, 新公会堂(奈良県・奈良市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 勇樹 (KANNO, Yuki)
群馬大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80451813

(2) 研究分担者

星 和人 (HOSHI, Kazuto)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30344451

森 良之 (MORI, Yoshiyuki)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：70251296