

令和元年6月24日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20547

研究課題名(和文) 無血清培地で分化・誘導したヒト臍帯組織由来幹細胞を用いた骨再生療法の開発

研究課題名(英文) Study of bone regeneration therapy using Human Umbilical Cord PeriVascular cells differentiated and induced in serum-free medium

研究代表者

梶山 創太郎 (Kajiyama, Sohtaro)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：00760414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：BM-CMを増殖期、コンフルエント期、石灰化期の3つの期間にわけてHUCPVCsに添加した。タイムポイントは1・2・3週としてALP染色、Alizarin Red染色、遺伝子発現(Runx2、Osteocalcin、型コラーゲン)、Ca量の測定を評価方法とした。BM-CMの3つの期間の検討では、コンフルエント期は他の時期よりもALP染色、Alizarin Red染色での陽性染色反応が明らかであり、また遺伝子発現にて Runx2 や Osteocalcinもより強く発現していた。コンフルエント期のBM-CMを用いることにより、HUCPVCsをより効果的に石灰化誘導され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

ヒト臍帯動・静脈周囲に存在する間葉系幹細胞Human Umbilical Cord PeriVascular cellsは医療廃棄物となった臍帯より採取するためドナーに新たな侵襲を加えることなく十分な細胞を確保できるメリットがある。また、免疫寛容性を有することから今後他家移植への臨床応用細胞ソースとして期待されている。本研究では臨床応用を見据えて無血清培地を用いて、ヒト臍帯組織間葉系幹細胞をより効果的に骨系へと分化させるために、最適なBM-CM採取期間について検討した。新たな幹細胞ソースの生体移植細胞としての有用性について探り、新規の骨再生療法を開発することを目的とした。

研究成果の概要(英文)：We focused on Human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs) as a new cellular source. The objective of this study is to investigate bone differentiation induction of HUCPVCs based on the collection term of bone marrow cell's condition medium. BM-CM was divided into three according to the collection time. (Proliferate, Confluent, Calcification) HUCPVCs were cultured with each period of BM-CM, and the state of differentiation was evaluated in RT-PCR, ALP staining and Alizarin staining. Confluent and Calcification groups for 2 weeks showed more expression of Runx 2 than other group. HUCPVCs which were cultured with Confluent BM-CM for 2 weeks showed positive staining with ALP staining and Alizarin staining than other groups. In the conventional method, HUCPVCs is required to culture for 3 weeks before calcification. The results suggested that HUCPVCs which are cultured using confluent BM - CM show calcification tendency in 2 weeks.

研究分野：口腔再生医学

キーワード：臍帯組織由来幹細胞 骨髄細胞培養上清

1. 研究開始当初の背景

再生医療には細胞(幹細胞)、足場(スキャホールド)、増殖因子(サイトカイン)という3要素による組織再生が必要である。幹細胞を用いた再生療法は、細胞と足場を組み合わせることにより自在に生体組織や臓器を再生させることができるため、ドナー不足や免疫拒絶という問題を抱える臓器移植にかわる医療として注目されている。現在臨床応用されている細胞ソースとして最も一般的なものに骨髄由来間葉系幹細胞(BMMSCs)がある。BMMSCsは全骨髄細胞の約0.125%からなり、骨細胞、軟骨細胞そして脂肪細胞へと分化することが出来る。骨髄幹細胞を用いた骨をはじめとする組織再生に関する研究は数多く存在し、その有効性が示されている。しかしながら、BMMSCsは採取できる幹細胞の量が少なく、分離の手順においてドナーや患者への侵襲が生じるなどの問題点をかかえている。そこで研究代表者は新たな細胞ソースとしてヒト臍帯動・静脈周囲に存在する間葉系幹細胞 Human Umbilical Cord PeriVascular cells (以下 HUCPVCs) に注目した。

HUCPVCsは医療廃棄物となった臍帯より採取するためドナーに新たな侵襲を加えることなく十分な細胞を確保できるメリットがある。採取された HUCPVCs は骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞に分化するだけでなく、皮膚、血管内皮、神経系、肝細胞に分化することが知られている。また、主要組織適合遺伝子複合体(MHC) class のみられない細胞が存在すると報告されている。このことから今後他家移植への臨床応用細胞ソースとして期待されている。

これまで研究代表者は IGF-1、HGF、VEGF、TGF- β 1 などの因子を含むとされる骨髄幹細胞の培養上清(以下 BM-CM)を用いて HUCPVCs を培養することで、より効果的に HUCPVCs を骨芽細胞へと分化することを *in vitro* において確認し、分化させた HUCPVCs が *in vivo* において免疫不全ラット頭蓋骨欠損モデルで骨形成を引き起こすことを確認した。おそらくは BMMSCs から放出されるパラクライン因子が HUCPVCs に働きかけ、骨芽細胞へと分化させていると考えられる。また、注目すべき結果として、HE染色による組織学的観察において母床骨由来ではない骨形成が観察された。

このことから、BM-CMを用いて培養した HUCPVCs は骨誘導能をもつのではないかと考えている。新たな幹細胞ソースの生体移植細胞としての有用性について探り、新規の骨再生療法を開発することを目的とした。

2. 研究の目的

これまで研究代表者は HUCPVCs を BM-CM で培養することで骨形成が増加したと報告した。BM-CMには様々な種類の生物活性因子が存在するといわれている。本研究では臨床応用を見据えて無血清培地を用いて、ヒト臍帯組織間葉系幹細胞をより効果的に骨系へと分化させるために、最適な BM-CM 採取期間について検討した。

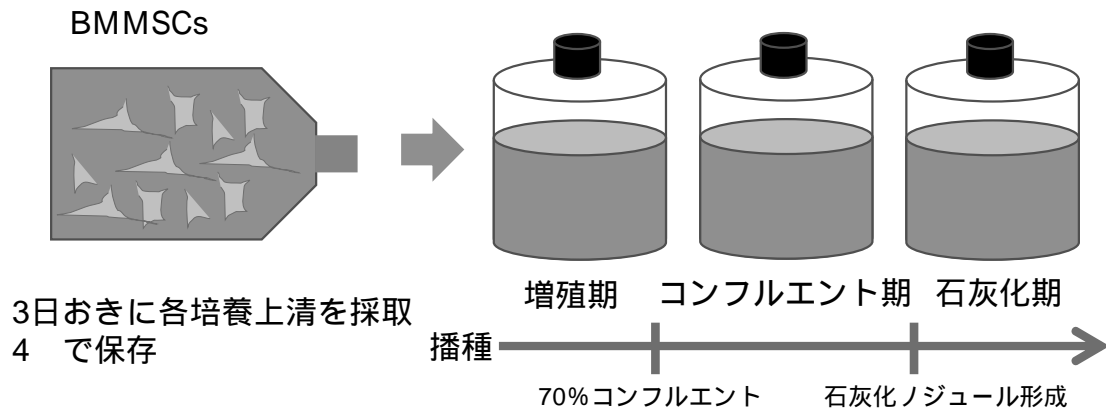
3. 研究の方法

HUCPVCs は、J.E. Davies 教授(トロント大学)によって提供された。BMMSC は LONZA から購入した。すべての実験は、3 継代の HUCPVC および BMMSC を用いて行った。

BM-CM は採取時期によって3分割した。BMMSC を培養し、70%コンフルエントまでを増殖期、70%コンフルエントから石灰化ノジュール形成までをコンフルエント期、石灰化ノジュール形成以降を石灰化期とした。この3つの期間の培養上清の成分を Eliza により VEGF、TGF- β 1、FGF、IGF- β 、BMP-2 について分析を行った。

これまでの骨形成を確認した際に用いた BM-CM では、同時培養した BMMSCs (BM(+))の培養上清を用いている。今回の研究ではあらかじめ採取した BM-CM を3つの時期に分けた群を含む、以下の6群での実験群で実験を行った。

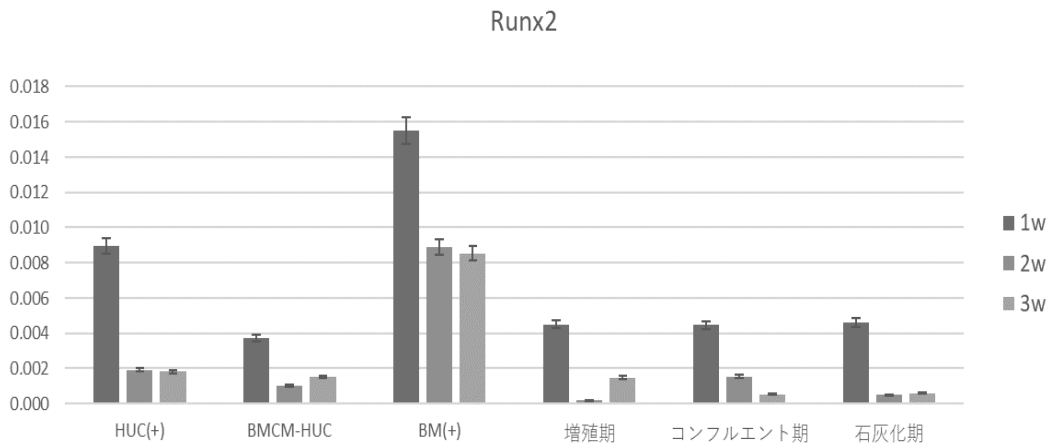
- (1) HUC(+): HUCPVCs を石灰化誘導培地で培養
 - (2) BMCM-HUC: Osugi らの方法により作製した BM-CM で HUCPVCs を培養(従来の方法)
 - (3) BM(+): BMMSCs を石灰化誘導培地で培養
 - (4) 増殖期 BMCM-HUC: 増殖期に採取した BM-CM で HUCPVCs を培養
 - (5) コンフルエント期 BMCM-HUC: コンフルエント期に採取した BM-CM で HUCPVCs を培養
 - (6) 石灰化期 BMCM-HUC: 石灰化期に採取した BM-CM で HUCPVCs を培養
- 各実験群を1・2・3週間培養し、ALP染色、Alizarin Red染色、遺伝子発現(Runx2、Osteocalcin、型コラーゲン)、Ca量の測定を評価方法とした。



4. 研究成果

(1) リアルタイム PCR

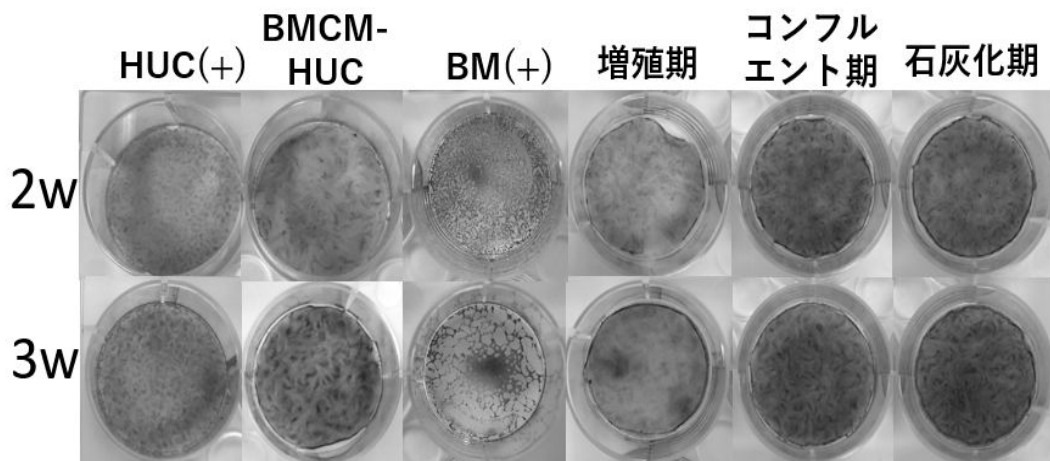
1週目の全ての群において2、3週よりも Runx2 の発現が多く認められた。



(2) ALP 染色

2週目のコンフルエント期と石灰化期の BM-CM で培養した HUCPVCs は、他の群より ALP 染色で陽性染色を示した。3週以降では差は認められなかった。

ALP染色

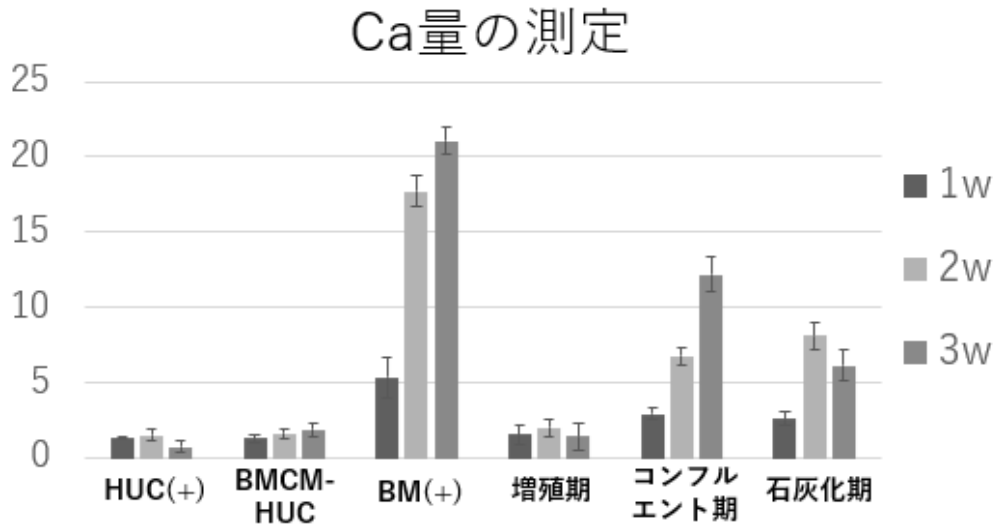


(3) Alizarin 染色

ALP 染色同様、2 週のコンプルエント期と石灰化期の BM-CM で培養した HUCPVCs は、他の群より Alizarin 染色で陽性染色を示した。3 週以降では差は認められなかった。

(4) Ca 量の測定

3 週のコンプルエント期の BM-CM で培養した HUCPVCs は、他の群より Ca 量が多く認められた。



従来の方法では HUCPVCs の石灰化までに 3 週間培養が必要であったが、コンプルエント期の BM-CM を用いて培養することで 2 週間での石灰化傾向を示すことが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Sohtaro Kajiyama, Yuri Nagashima, Taichiro Funatsu, Takatoshi Nagano, Kazuhiro Gomi .
Bone Differentiation Induction of HUCPVCs by Collection Term of BM-CM. 96th General Session & Exhibition of the IADR (International Association for Dental Research) LONDON, ENGLAND. 2018.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。