

論 文 内 容 要 旨

Clumps of Mesenchymal Stem Cell/Extracellular Matrix Complexes Generated with Xeno-Free Conditions Facilitate Bone Regeneration via Direct and Indirect Osteogenesis.

(ゼノフリー条件下に作製した間葉系幹細胞集塊 Clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes は自身の骨分化とホスト細胞の骨形成誘導を介して骨組織再生を促進する)

主指導教員：栗原 英見教授

(医系科学研究科 歯周病態学)

副指導教員：柴 秀樹教授

(医系科学研究科 歯髓生物学)

副指導教員：谷本 幸太郎教授

(医系科学研究科 歯科矯正学)

本池 総太

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】

歯周炎は、歯周病原細菌感染と宿主の免疫応答の結果生じる炎症性組織破壊疾患である。現在、小規模な歯周組織破壊に対して、GTR 法や bFGF の投与といった組織に内在する細胞を利用した歯周組織再生療法が臨床の場において行われている。しかし一方で、重度歯周炎などの大規模に破壊された組織の再生は、残存する生体内の細胞の機能をコントロールするだけでは困難と考えられている。そのため、重篤な組織破壊を示す組織の再生には、生体外から十分な量の機能的な細胞を供給する細胞移植治療法が適していると考えられ、種々の開発が進められている。その中でも特に、歯周組織を構成する複数の組織に分化可能である間葉系幹細胞 (MSCs) を利用した研究が注目を集めている。

私たちの研究室では MSCs と細胞自身が産生する I 型コラーゲンを主とした細胞外基質 (ECM) を利用して、直径約 1 mm の三次元的人工細胞集塊 Clumps of MSC/ECM complexes (C-MSCs) を考案した。C-MSCs は自己産生した I 型コラーゲンが足場として機能するため組織欠損部に直接移植できる。さらに重要なことに、1 つの C-MSCs を移植最小 unit として捉え、それを複数個組み合わせることで、いかなる形態や大きさの欠損組織に対しても正確な細胞移植が可能となる。実際、ラット頭蓋冠骨欠損モデルやビーグル犬根分岐部産 III 級欠損モデルにおいて欠損形態に適合させた C-MSCs の移植が組織再生を効果的に誘導することを報告してきた [1,2]。

しかし、C-MSCs による骨組織再生機序については未だ十分に解明されておらず、臨床応用を目指す上で移植先での C-MSCs の動態を理解することが必要である。一般的に、細胞移植治療の組織再生機序の解析には、高い再現性が要求されるため、ロット間の組成差によって移植体の均一性、再現性を損なわせる可能性のある血清の使用は好ましくない。さらに臨床応用を考えると、未知の感染源を伝播させる可能性のある異種動物由来成分を用いずに移植体を作製できることが重要である。そこで本研究では、C-MSCs を Xeno-free/Serum-free 条件下に作製し、移植後の骨再生過程における C-MSCs 構成細胞と ECM の組織内分布を評価し骨組織再生機序の解析を行うことを目的とした。

【材料と方法】

Xeno-free/Serum-free 条件下に C-MSCs を作製するため、ヒト骨髄由来 MSCs を 48-well plate に 1.0×10^5 cells/well で播種し、Xeno-free 増殖培地で 4 日間培養し十分な ECM を産生させた。さらに、得られた細胞シートを鈍的に剥離し浮遊させ、Xeno-free 骨分化誘導培地で 3 日間培養することで細胞集塊 C-MSCs を得た。C-MSCs の骨再生効果を評価するため、SCID マウス頭蓋冠の直径 1.6 mm 欠損に移植し、1 週、2 週、4 週、8 週間後に microCT 撮影と組織学的解析を行った。さらに、骨形成過程におけるドナー細胞の分布をヒト Vimentin、ドナー由来骨基質蛋白の発現をヒト Collagen I (ヒト COL I), ヒト Osteopontin (ヒト OPN), ヒト Osteocalcin (ヒト OCN) に対する特異的抗体を用いた免疫組織染色によって経時的に観察した。また、機能的な骨組織が形成されているか確認するため、新生骨内の骨細胞ネットワーク形成の有無を、F-actin の免疫組織染色によって評価した。最後に、脱細胞処理を行った

C-MSCs (Decell-C-MSCs) を同様に SCID マウス頭蓋冠骨欠損に移植し、骨再生効果を評価した。

【結果】

C-MSCs の移植 2 週間後には欠損辺縁から軽微な骨形成を認め、移植 4 週間後には欠損中央部に C-MSCs 由来と思われる骨組織形成と骨断端部と連続する周囲からの骨形成が確認された。さらに移植 8 週間後には、より成熟した骨組織を認めるようになり、骨髓様構造も観察された。骨欠損中央部に形成された骨様組織にはヒト COL I /ヒト OPN/ヒト OCN の沈着が認められ、その内部には骨細胞様の形態を示すヒト Vimentin 陽性細胞が多数観察された。一方、骨断端部から添加される新生骨内には、ヒト細胞及びヒト細胞由来骨基質蛋白は認められず、骨細胞様の形態を示す宿主のマウス細胞によって構成されていた。また、Decell-C-MSCs は移植後に経時的に代謝され、骨再生を誘導しなかったことから、C-MSCs 内の細胞からのパラクリン因子が骨組織再生に重要な役割を担っていることが示唆された。

【結論】

Xeno-free/Serum-free 条件下に作製した C-MSCs は十分な骨再生能を有していた。さらに、C-MSCs 移植による骨組織再生機序は、ドナー細胞自身の骨分化と宿主細胞の骨形成能促進によるものであることが示唆された。

参考文献

- [1] Kittaka M et al., *Cytotherapy*, 2015; 17(7): 860-873
- [2] Takewaki M et al., *J Dent Res*, 2017; 96(9): 984-991