

論 文 内 容 要 旨

Clumps of MSCs/ECM complexes
generated with chondro-induction medium
induces bone regeneration

(軟骨誘導を施した間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSC/ECM
complexes は骨再生を促進する)

主指導教員：河口 浩之教授
(広島大学病院 歯科医学教育学)

副指導教員：柴 秀樹教授
(医系科学研究科 歯髄生物学)

副指導教員：武知 正晃准教授
(医系科学研究科 口腔外科学)

堀越 励

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】

歯周炎は、歯周病原細菌の感染と宿主の免疫応答の結果生じる、組織破壊を伴う炎症性疾患である。歯周炎による歯槽骨の吸収は歯牙喪失の最も大きな要因となるため、破壊された骨を回復させることが歯周病治療における課題であると考えられる。現在 GTR やリグロスといった歯周組織再生療法が行われているが、Ⅲ級根分岐部病変や水平性骨欠損のような大規模骨欠損に対する効果的な治療法は確立されていない。重篤な骨欠損の再生には、患部に不足している機能的な細胞を、外部から補充する細胞治療法の開発が必要である。

私達の研究室では、自己複製能を有し、歯周組織構成細胞に分化可能な間葉系幹細胞(MSCs)に着目して研究を行ってきた。その結果、MSCs と自身が産生する細胞外基質(ECM)によって構成される細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complexes(C-MSCs)を樹立した。C-MSCs は直径約 1mm の立体構造を持ち、人工足場材料を用いることなく様々な組織欠損形態に適合した細胞移植が可能である。さらに、C-MSCs は移植前の細胞の機能調節を行うことが可能であり、骨分化誘導を施した C-MSCs が自身の膜性骨化を介して骨再生を促進することを既に報告している[1]。

一方、発生における骨の形成には膜性骨化と軟骨内骨化がある。軟骨内骨化の過程において MSC は軟骨細胞へと分化し、その後肥大軟骨細胞まで成熟することで骨形成の起点となる。この軟骨細胞は、低栄養・低酸素条件下においても生存可能な特性を持つため、細胞移植時に血液供給の乏しくなる大規模欠損に対しても、細胞機能を損なうことなく軟骨内骨化によって骨再生を達成できる可能性がある。実際に、MSC とサイトカイン投与によって、軟骨内骨化を経た骨再生療法の報告もある[2]。そこで本研究では、新規骨再生細胞療法の開発を目指し、軟骨誘導を施した C-MSCs の骨再生効果を検討した。

【方法】

ヒト骨髄由来 MSCs を 48 well plate に 1.0×10^5 cells/well の高密度で播種し、4 日間 Xeno-free 増殖培地にて培養することで十分な ECM を産生させた。得られた細胞シートを well の底から鈍的に剥離し、Xeno-free の軟骨誘導培地にて 5・10・15 日間浮遊培養を行うことで分化程度の異なる軟骨誘導 C-MSCs(CIM-C-MSCs)を作製した。軟骨誘導培地による C-MSCs 内の細胞の変化を観察するため、HE・Safranin O 染色および real-time PCR を行った。また、CIM-C-MSCs の骨再生効果を調べるために SCID マウスの頭蓋冠 1.6mm 骨欠損モデルへと移植した。移植 4・8・12 週後に回収し、micro CT および組織学的解析を行い、移植した細胞の分布をヒト Vimentin の蛍光免疫染色によって観察した。

【結果】

軟骨誘導を施した C-MSC において、軟骨分化マーカー Sox9・Aggrecan・Col II・Col X mRNA の経時的な発現増加を認めた。組織学的解析の結果、HE 染色にて小腔の中に核が存在する軟骨細胞様の細胞を認めた。また、軟骨誘導 5 日の C-MSCs では Safranin O で染色されなかったが、誘導 10・15 日では Safranin O に濃染される軟骨基質の産生を認めた。

移植実験の結果、培養 5 日の CIM-C-MSCs 移植群では micro CT にて欠損周囲からの石灰化物の伸長が見られたが、欠損中央部での硬組織形成は得られなかった。その欠損部を組織学的に観察すると、ヒト Vimentin 陽性の細胞が主に構成する線維性結合組織であった。

培養 10 日の CIM-C-MSCs 移植群では、移植 4 週目には欠損中央部に石灰化物が認められ、移植 12 週目にその石灰化物は周囲骨と癒合していた。その移植 4 週目に認められた石灰化物は、エオジンに染まる骨基質のみでなく、Safranin O に染まる軟骨基質が観察された。移植 8 週間後には Safranin O 染色部位は消失し、12 週後に欠損両端の骨と癒合する骨様組織形成が観察された。ヒト Vimentin 抗体を用いた免疫染色の結果、移植 4 週の Safranin O に染まる組織中には移植されたヒト細胞が主であるが、ヒト Vimentin 陰性の宿主マウス細胞の侵入が観察され、その後の新生骨では宿主細胞が主に構成していた。

軟骨誘導 15 日の CIM-C-MSCs 移植群においても、microCT 解析の結果、培養 10 日のものと類似した硬組織形成が認められた。しかし、組織学的に観察すると、Safranin O に濃染する面積が広く、新生幼若骨には Safranin O に染まる軟骨基質が残存していた。

【結論】

適度な軟骨誘導を施した C-MSCs 移植は、宿主細胞と連携した軟骨内骨化によって、骨再生を促進する可能性が示唆された。

参考文献

[1] Motoike S et al., Int J Mol Sci, 2019; 20(16): 3970

[2] Phuong N. Dang et al., Stem Cells Transl Med, 2017; 6: 1644-1659