

<研究課題> 三次元間葉系幹細胞集塊を応用した骨再生細胞製剤の  
開発

代表研究者 広島大学大学院 歯周病態学研究室 助教 加治屋幹人  
共同研究者 京都大学 iPS細胞研究所 准教授 池谷 真

[まとめ]

高齢者の骨粗鬆症や転倒を原因とした骨折のような骨破壊疾患に対して、事前に備蓄された間葉系幹細胞を迅速に供給する体制が望まれている。これまでに、三次元間葉系幹細胞集塊(C-MSCs)は、効率的に骨再生を達成すること、他家移植可能であることが報告されている。本研究では、C-MSCsが凍結保存後もその立体的構造を損なわず、骨再生能を失わないことを見出した。この事実はC-MSCsが骨再生細胞製剤となりうることを示唆した。

1.研究の目的

高齢化が進行中の日本において、骨粗鬆症や転倒を原因とした骨折のような骨破壊疾患が急増している。従来、の整復固定による治療法では患者の治癒力が不足することから、近年、間葉系幹細胞(MSC)を用いた再生療法の開発が期待されている。骨折の治療には、受傷時の速やかな細胞供給が必要である。しかし、現在のMSCsを用いた細胞療法は、その分離培養と、移植のための人工足場材料との複合化

の行程のため、迅速な細胞供給は困難である。

一方、研究代表者は、これまでに、MSC自身が産生する細胞外基質(ECM)を利用して人工細胞集塊 Clumps of MSC/ECM complex (C-MSC)を作成した。これは細胞集塊の状態で培養可能であり、人工の足場材料を必要とせずに欠損組織に直接移植可能なものである(Kittaka M, Kajiya M, et al., *Cytotherapy*, 2015)。さらに、2014年度三井住友海上福祉財団研究助成金の支援を得て、IFN $\gamma$ 刺激されたC-MSCが高い免疫制御能を発揮することで他家移植における移植拒絶を抑制できる可能性を示した(Takeshita et al., *Stem Cell Res Ther*, 2017)。

そこで、本研究では、患者の必要時に、確実にC-MSCsを供給する体制の樹立を目指し、C-MSCsの凍結保存法の開発に取り組んだ。さらに、枯渇することのない細胞ソースの確保のために、iPS細胞からゼノフリー(XF)条件でMSCsを誘導し、細胞集塊化することを試みた。

## 2. 研究方法と経過

### 2-1 細胞

ラット骨髄から間葉系幹細胞 (MSCs) を分離し、供試した。

### 2-2 C-MSCs の作成

MSCs を、24well プレートに播種し、50 µg/ml のアスコルビン酸含有の増殖培地にて4日間培養する。これをマイクロピペットチップにてこそぎ、細胞シートの状態で剥離させ、この浮遊した MSCs/ECM 複合体を ultra-low binding 培養皿に写し、増殖培地にて浮遊培養することによって、細胞集塊 C-MSCs を得た。

### 2-3 C-MSCs の立体構造および細胞生存活性に対する凍結保存の影響

作成された C-MSCs を各種凍結保存剤 (DMEM+20%FBS+10%DMSO, CELLBANKER®, BAMBANKER®, STEM-CELLBANKER®, STEM-CELLBANKER (DMSOfree)®) もしくは PBS に浸漬し、液体窒素下にて凍結保存した。凍結2日後に、急速解凍し、その立体的構造の変化の有無を HE 染色にて観察し、細胞生存活性について、TUNEL 染色及び LIVE/DEAD staining kit を用いて評価した。

### 2-3 C-MSCs の幹細胞マーカー発現および骨分化能に対する凍結保存の影響

作成された C-MSCs を (DMEM+20%FBS+10%DMSO から成

る凍結保存剤に浸漬し、液体窒素下に凍結保存した。凍結2日後に、急速解凍し、凍結前後の C-MSCs における幹細胞マーカー発現の変化の有無を FACS にて解析した。また、それらを骨分化誘導培地で培養し、骨分化能を ALP 活性、カルシウム content、Alizarin Red 染色にて解析した。

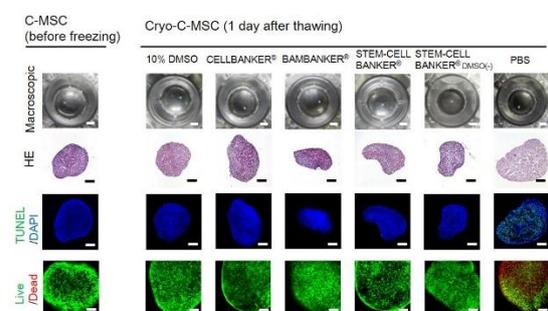
### 2-4. 凍結保存を経た C-MSCs による骨再生効果の検討

8週齢のオス F344 ラット頭蓋冠に直径 1.6mm の骨欠損を作成。ここに、C-MSCs、もしくは6ヶ月間の凍結保存をへた C-MSCs (cryo-C-MSCs) を移植し、4週間の経過観察後に屠殺。マイクロ CT および HE 染色にて骨再生量を評価した。

## 3. 研究の成果

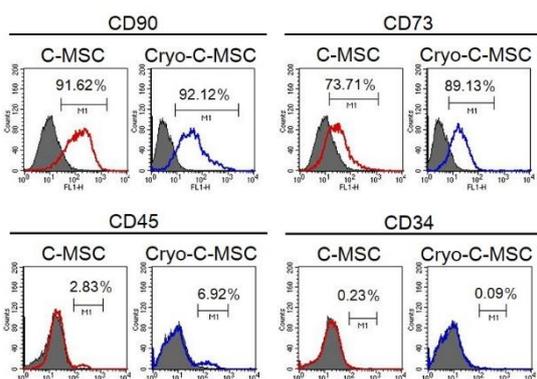
### 3-1 実験結果

C-MSCs を PBS に浸漬して凍結保存をすると、明らかな細胞死が誘導された (図1)。一方、各種凍結保存剤を用いた場合、C-MSCs はその立体構造を崩すことなく、死細胞の増加も認められなかった



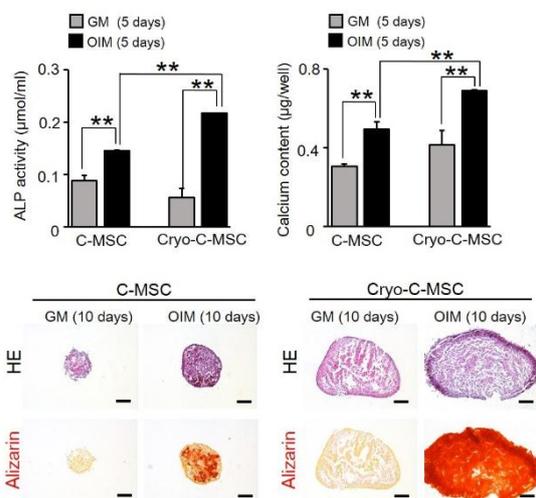
(図1)

また、凍結保存後も、C-MSCs 内の細胞の間葉系幹細胞陽性マーカーである CD90、CD73 の発現が減少することではなく、反対に、陰性マーカーである CD45、CD34 の発現が上昇することもなかった (図 2)。



(図 2)

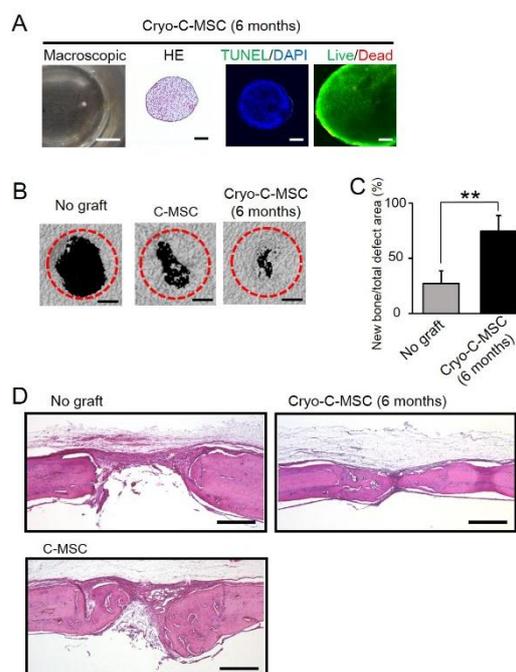
さらに、凍結保存を経た C-MSCs は骨分化誘導培地で培養されると、ALP 活性が上昇し、ミネラルの沈着が増加することが確認された。(図 3)



(図 3)

6 ヶ月間の凍結保存を経た cryo-C-MSCs もその立体構造を崩さずに、死細胞が増加することにはなかった。

また、ラット頭蓋冠欠損に大して、6 ヶ月の凍結保存を経た cryo-C-MSCs 移植は、凍結保存を経ていない C-MSCs 移植と同等の骨再生効果を発揮した。(図 4)。



(図 4)

### 3-2 結論

上記の結果から、C-MSCs は凍結保存後もその立体的な構造を失わず、十分な骨再生能を保有していることが示された。この凍結保存が可能であったメカニズムは、C-MSCs を形作る豊富な ECM が、凍結保存にともなう氷晶からのダメージに対して保護的に働くためであることも見出している (data 示さず：論文発表済み)。

以上のことから、C-MSCs は移植体のかたちとして凍結保存可能であるため、事前に十分な数を備蓄しておき、

患者の必要時に迅速に供給可能な、新規の細胞製剤として利用可能であることが示された。

#### 4 今後の課題

これまでの研究成果から、C-MSCs は人工足場材料を用いることなく骨再生を達成でき、IFN $\gamma$  前処理によって免疫調節能の高いC-MSC $\gamma$  が得られるため、他家移植も可能である。さらに、本研究の成果から、C-MSCs は凍結保存後もその細胞機能を失わないことが示された。すなわち、ドナーから提供された MSCs を C-MSCs の状態で備蓄し、患者の必要時に供給する骨再生細胞製剤として応用できる可能性が高まった。

今後、C-MSCs を骨再生細胞製剤として実現させるためには、枯渇することの無い細胞ソースが必要となる。そこで、本研究資金と他財団による支援を併用して、研究代表者は、iPS 細胞からゼノフリー(XF)条件で MSCs を誘導し、細胞集塊化することを試みた。その結果、XF-C-iMSCs の作成に成功し、十分な骨再生能を有していることを見出した。さらに、それらを凍結保存可能であることも見出している。今後、その免疫原性と免疫抑制能の制御方法を明らかにすることで、これまでの一連の研究成果から、細胞集塊培養技術を利用した骨再生細胞製剤を確立できるようになると期待できる。

さらに、浮遊培養される立体的な細胞集塊 C-MSCs が従来の二次元培養の状態とは異なった細胞性質を発揮す

る可能性があった。そこで、別資金を併用しながら、その細胞性質を分子生物学的に探索し、C-MSCs に特有の、YAP/TAZ を介したメカノトランスダクション経路が生じていることも見出している。これらの成果も骨再生医療に有効な発見であったといえる。

#### 5 研究成果の公表方法

本研究で得られた凍結保存に関する成果を Stem Cell Research & Therapy に論文発表した(Motoike et al., Stem Cell Res Ther, 2018)。

また、XF-C-iMSCs の成果は、2018 年度国際細胞治療学会(シドニー)にて学会発表し、C-MSCs におけるメカノトランスダクション経路の発見の成果を Stem Cell Research & Therapy に論文発表した(Komatsu et al., Stem Cell Res Ther, 2018)