

<研究課題> 三次元間葉系幹細胞集塊からの骨オルガノイド創生とそれを用いた革新的骨再生療法開発

代表研究者 広島大学大学院医系科学研究科 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】

高齢者骨折のような骨破壊疾患に対し、事前に備蓄された骨再生材料を迅速に供給する体制が望まれる。

そこで本研究では、自身が樹立した三次元間葉系幹細胞集塊(C-MSCs)から骨形成能が高く、凍結保存が可能で、移植拒絶を逃れる組織の作製を目指した。

その結果、C-MSCs から作製する軟骨様組織が低い免疫原性と確実な骨再生効果を有することを見出した。これを基盤技術とした骨再生細胞製剤が樹立される可能性がある。

1. 研究の目的

超高齢化が進展中の本邦において、骨粗鬆症や転倒による高齢者骨折が増加している。高齢者骨折は「ねたきり」ひいては「フレイル」の原因となるため、機能回復をはかる骨再生療法が求められている。理想的な骨再生療法は、骨細胞・骨芽細胞・骨基質を供給可能な自家骨移植であるが、患者侵襲の観点から高齢者には適応出来ない。そこで高齢者骨折に対して、自家骨に相当する骨様組織を事前に産生・備蓄し、患者必要時に迅速な提供が可能な骨再生医療の体制構築が求められている。

一方、研究代表者は間葉系幹細胞(MSCs)と MSCs 自身が産生する細胞外基質(ECM)からなる三次元的細胞集塊 Clumps of MSC/ECM complexes(C-MSCs)を作製した。この直径 1mm ほどの細胞集塊は、人工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り (Kittaka M, Kajiya M, et al., *Cytherapy*, 2015)、事前の培養条件に

よってさまざまに細胞性質を制御できる。特に、2014 年度・2017 年度三井住友海上福祉財団研究助成金の支援を得て、1) IFN γ 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こと (Takeshita et al., *Stem Cell Res Ther*, 2017)、2) C-MSCs は凍結保存を経てもその三次元的構造と細胞基本性質を損なわないことを見出していた (Motoike et al., *Stem Cell Res Ther*, 2018)。また、C-MSCs に場の硬さを感じさせるゲル包埋培養によって、YAP/TAZ メカノシグナルを制御し、骨細胞・骨芽細胞・骨基質からなる骨オルガノイドを誘導を創生できる可能性を見出していた。

しかし、この C-MSCs から誘導する骨オルガノイドをドナー由来細胞から作製・備蓄し供給する他家移植可能性を予備的に検討したところ、C-MSCs と比較して骨オルガノイドは HLA 抗原の発現が増加し、移植拒絶を受けてしまうことが示された。そこでこの解決策として、1) HLA 抗原の発現が低く、軟骨内骨化の様式によって骨形成を達成できる肥大軟骨様組織を C-MSCs から作製すること、2) HLA ホモ・HLA 遺伝子編集が可能な iPS 細胞から MSCs に誘導し(iMSCs)、細胞集塊 C-iMSCs を経て骨オルガノイドを作製することの二つの開発研究に取り組んだ。

2. 研究方法と経過

2-1 細胞

LONZA 社からヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)を購入した。

2-2 C-MSCs および軟骨様 C-MSCs の作

製

本研究では、将来的な臨床応用を想定し、全培養過程を血清不含・異種動物タンパク不含の Serum-free/Xeno-free(以下 XF)条件で統一した。すなわち、MSCs を 100,000cells/well の密度で 48well プレートに播種し、Prime-XV MSC expansion XFSM(Irvine 社)を増殖培地(以下 XF-GM)として培養した。4 日後に培養皿外周をマイクロピペットチップにてこそぎ、細胞シート状態で剥離させ、この浮遊した MSCs/ECM 複合体を ultra-low binding 培養皿に移し、XF-GM もしくは軟骨誘導培地 MSCgo Chondrogenic XF medium (Biological Industries 社)(以下 XF-CIM)にて浮遊培養することで、細胞集塊 XF-C-MSCs もしくは軟骨誘導 XF-CIM-C-MSCs を得た。

2-3 XF-C-MSCs および XF-CIM-C-MSCs の細胞性質の評価

作成された各種細胞塊の薄切切片を作成し、HE 染色および軟骨基質を評価する Safranin O 染色を行い、組織学的観察を行った。また、軟骨マーカー遺伝子発現について qPCR によって評価した。

2-4 XF-C-MSCs および XF-CIM-C-MSCs の骨再生効果の検証

8 週齢のオス SCID マウス頭蓋冠に直径 1.6mm の骨欠損を作成。ここに、XF-C-MSCs、もしくは XF-CIM-C-MSCs を直接移植し、4、8、12 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。

2-5 XF-CIM-C-MSCs の骨再生機序の検証

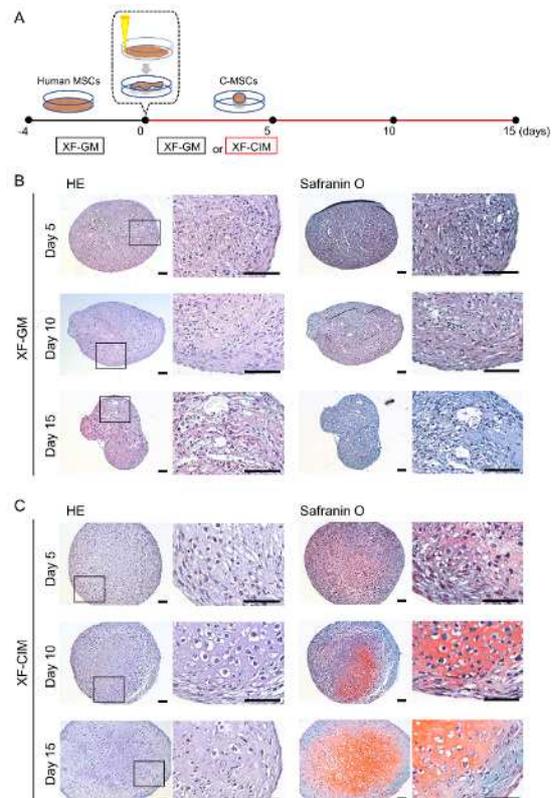
2-4 の実験から、XF-CIM で 10 日間培養することで作製した XF-CIM-CMSCs が高い骨再生効果を示したことから、それによる骨再生機序を組織学的に検討することとした。特に、軟骨内骨化の様式が生じているかを調べるために組織学的観察を行った。すなわち、8 週齢のオス SCID マウス頭蓋冠の直径 1.6mm 骨欠損に XF-CIM-CMSCs を直接移植し、移

植 3、7、14 日後に屠殺。頭蓋骨を回収後、凍結切片を作成し、HE 染色、Azan 染色、Safranin O 染色およびヒト Vimentin 特異抗体を用いた免疫染色を行い、経時的な組織学的観察を行った。

3. 研究の成果

3-1 軟骨誘導 C-MSCs の実験結果

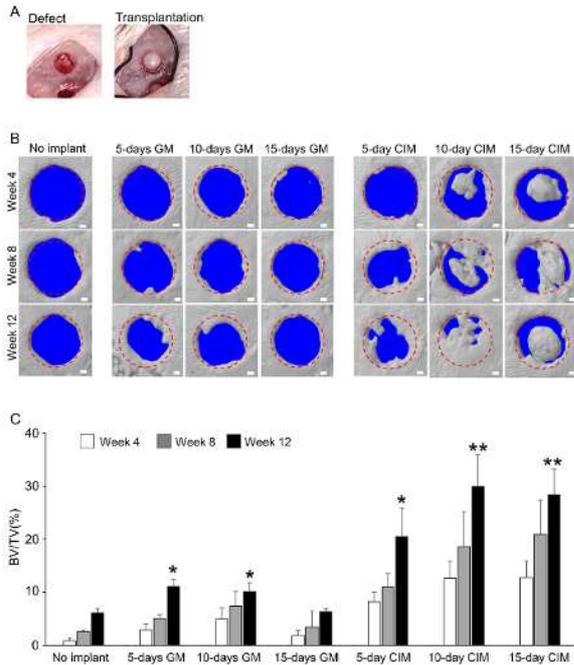
XF-C-MSCs はその作製過程において、経時的に収縮した。一方、XF-CIM-C-MSCs はそのサイズを保ちながら、培養 10 日以降から Safranin O に濃染する軟骨基質の形成が観察された(図 1)。さらに、XF-CIM-C-MSCs は経時的に軟骨マーカーの発現が増加したが、HLA 抗原の遺伝子発現は増加しなかった(データ示さず)。



(図 1)

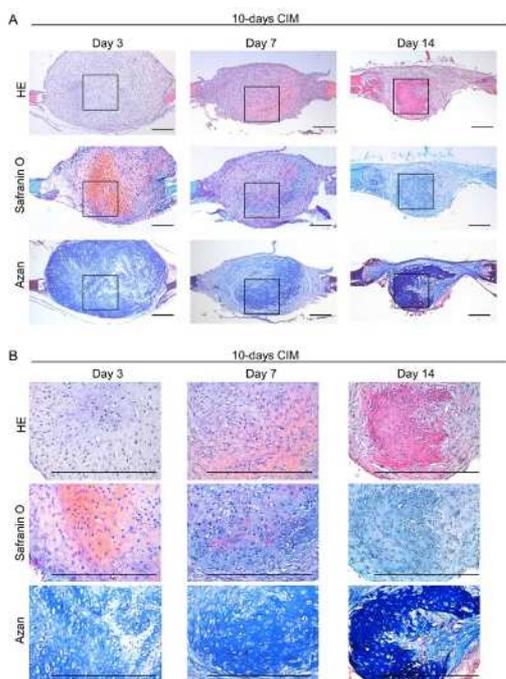
また、SCID マウス頭蓋冠欠損モデルに対する移植実験において、XF-C-MSCs の移植は、欠損周囲からの骨再生を誘導するのみであった。しかし、十分な軟骨組織形成が認められた XF-CIM-C-MSCs(作製培養 10日)もしくは 15 日)の移植群では、手術後 4 週間後から欠損中央部に新生骨の形成が認められ、これが経時的に欠損断端とつながっていく

ことが観察された。移植 12 週間後には欠損部を十分に満たす骨の形成が認められた(図 2)。



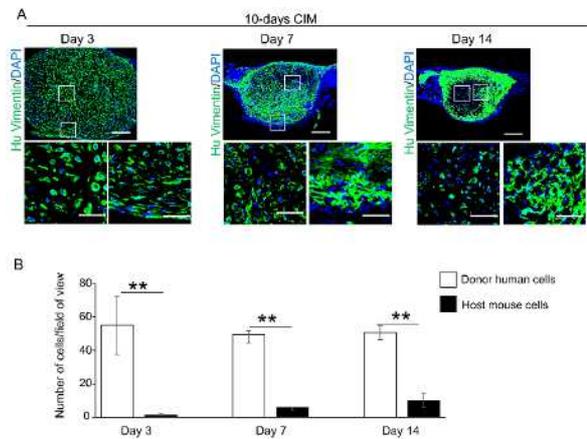
(図 2)

そこで、この XF-CIM-C-MSCs による骨再生機序を確認するために、移植早期について組織学的観察を行った。移植 3 日後には、移植された細胞塊の中央部に Safranin O に染色される軟骨基質が観察されたが、経時的にその軟骨期歯質が吸収されていた。一方、その軟骨基質相当部に AZAN に濃染する骨基質の沈着が観察された(図 3)。



(図 3)

さらに、ヒト Vimentin 特異抗体を用いた免疫染色によって、移植されたヒト細胞と、宿主のマウス細胞の局在を観察した。移植 3 日後の軟骨基質相当部の細胞の大部分はヒト細胞からなっていた。しかし、移植後経時的に、移植された細胞集塊内部には、宿主のマウス細胞が侵入し、新生骨様組織内部まで構築していた。(図 4)以上のことから、移植された軟骨様組織である XF-CIM-CMSCs 移植は、宿主による軟骨内骨化を誘導することで骨形成を行う可能性が示唆された。



(図 4)

3-2 XF-C-iMSCs の実験結果

これまでの研究成果として、XF 条件で樹立されたヒト iPS 細胞(1231A)株から神経堤細胞を経て、MSCs に誘導し、それらを集塊化(C-iMSCs)させることに成功していた。更に C-iMSCs が骨再生能を有していることを SCID マウス頭蓋冠欠損モデルへの移植実験によって示し、現在論文改訂中である。

この C-iMSCs に、ゲル包埋培養による骨オルガノイド作製法を応用し、現在、全体の 20%ほどが骨基質からなる細胞塊を得ることに成功している(データ示さず)。

また、3-1 で示した軟骨誘導によって、XF-CIM-C-iMSCs を作製できることも確認済みで、現在、その骨再生効果を SCID マウス頭蓋冠欠損モデルに移植することで検討中である。

3-3 結論

間葉系幹細胞集塊 C-MSCs から作製

する軟骨様組織は、低い免疫原性と軟骨内骨化による高い骨再生効果を発揮した。

枯渇することのない細胞ソースであり、HLA ホモ・HLA 遺伝子編集 iPS 細胞から細胞集塊を作成し、骨芽細胞・骨細胞・骨基質を内包する骨オルガノイド、もしくは軟骨様組織を作製・備蓄することで、高齢者など自身の細胞を用いることが困難な患者にも迅速かつ確実な骨再生医療を提供可能になると考えられる。

4. 今後の課題

これまでの C-MSCs を用いた基礎研究の成果から以下のことが示されている。

- 1)人工材料を用いない細胞移植が可能
- 2) IFN γ 前処理によって免疫調節能を向上させることが可能(拒絶免疫を抑制する)
- 3)凍結保存が可能
- 4)骨様組織が作製可能(自家骨移植に相当する高い骨再生効果)
- 5)軟骨様組織が作製可能(低い免疫原性と高い骨再生効果)
- 6)XF 条件で作製可能
- 7)iPS 細胞から誘導した MSCs でも同様の細胞集塊を作製可能

今後は、上記の技術を組み合わせることで安全かつ確実な他家移植の体制確立が実現できると予想される。たとえば、HLA 抗原遺伝子編集 iPS 細胞から細胞集塊を経て作製される骨様組織は他家移植可能かつ高い骨再生能を示すと考えられる。ただし、どれほど自己抗原の問題を回避したとしても、マイナー抗原の存在などから、移植拒絶は不可避であるという報告もある。

そのような場合は、IFN γ 前処理によって免疫調節能を向上させた細胞集塊と、軟骨様組織を組み合わせることで、より確実に移植拒絶を逃れながら骨再生を誘導する方法を模索する必要がある。

また、凍結保存後も C-MSCs の基本性質は損なわれないことを確認済みであるが、それが C-MSCs から作製される骨様組織・軟骨様組織にも当てはまるのかは

不明である。ただし、代表者らはすでに、IFN γ 前処理によって向上する C-MSCs の免疫制御能は、凍結保存後も維持されることを見出している(データ示さず)。したがって、骨様組織・軟骨様組織も凍結保存後にその基本性質を維持すると期待している。事前に備蓄できることが、迅速かつ確実な骨再生細胞製剤の体制確立に必須な要素といえるため、凍結保存の影響を検証する基礎研究は今後も不可欠であるといえる。

5. 研究成果の公表方法

本研究で得られた軟骨様組織に関する成果を Biomedicines に論文発表した(Horikoshi et al., Biomedicines, 2021)。