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 歯髄生物学)
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、重度の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1mm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、ラット頭蓋骨欠損モデルやラット大根分岐部産III級欠損モデルにおいて欠損形態に適したC-MSCsの移植が組織再生を効率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、高い再現性が求められるため、ロット間の組成差によって移植体の均一性、再現性を損なわない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ない摂模型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条件下よりC-MSCsを作製するため、ヒト骨髄由来MSCsを48-well plateに1.0×10⁶cells/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剝離し浮遊させ、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は骨再生効果を評価するため、SCIDマウス頭蓋冠の直径1.6mm欠損に移植し、1週、2週、4週、8週後に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ようになり、骨髄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COL1/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ライオ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