

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23012

研究課題名(和文) 高い骨再生能を持つ間葉系幹細胞スフェロイドの骨修復・再生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of bone regenerative mechanism after mesenchymal stem cell spheroid transplantation

研究代表者

水上 優哉 (Mizukami, Yuya)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20881163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高い骨再生能を持つことが報告される間葉系幹細胞スフェロイドの骨修復・再生メカニズムの解明を目的に研究を行った。脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSCs)をスフェロイド化し、健康マウスおよびストレプトゾトシン誘発性糖尿病モデルマウスの大腿骨欠損部に移植した。しかし、ADSCsのスフェロイド化による有意な骨修復・再生効果はみられなかった。また、足場素材、移植細胞数、スフェロイドサイズの変更によっても、骨修復・再生効果に改善はみられなかった。以上の結果より、ADSCsスフェロイドでは予想された骨修復・再生の促進効果がみられなかったため、骨修復・再生促進メカニズムの解明に至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康寿命の延伸を目的とした、加齢や糖尿病、ステロイド治療により骨が脆弱化した患者の骨折治療や骨再生治療法の開発が求められている。間葉系幹細胞は骨再生を促進することから、間葉系幹細胞移植の骨再生治療への応用研究がこれまでも進められてきた。近年、スフェロイド化した間葉系幹細胞の移植が効率的な骨再生を誘導することが報告され、臨床への応用が期待されている。しかし本研究では、脂肪組織由来の間葉系幹細胞スフェロイドは、骨再生に対して有意な促進効果を示さなかった。本研究は間葉系幹細胞スフェロイド移植による効果的な骨再生治療法の確立に対して、移植細胞、移植方法に関する新たな課題を提示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, I challenged to elucidate the bone regeneration mechanism of mesenchymal stem cell spheroids, which have been reported to show high bone regeneration capacity. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) spheroids were fabricated and transplanted into femoral bone defects of healthy mice and streptozotocin-induced diabetic model mice. However, ADSCs spheroids showed no significant bone regeneration effect. In addition, the bone regeneration effect of ADSCs spheroids was not improved by changing the scaffold material, the number of transplanted cells, or the spheroid size. Therefore, ADSCs spheroids did not show the expected bone regeneration effect, and so the mechanism of bone regeneration promotion of ADSCs spheroids could not be elucidated.

研究分野：骨代謝、DDS、組織工学

キーワード：骨再生 間葉系幹細胞 スフェロイド

## 1. 研究開始当初の背景

世界的な高齢化の進行に伴い、健康寿命を延伸することは重要な課題とされている。健康寿命の延伸には運動機能の維持が重要であり、加齢や糖尿病、ステロイド等の薬物治療により骨が脆弱化した患者の骨折の治癒や骨の修復・再生を促進する治療法が求められている。

間葉系幹細胞 (MSC) は、骨芽細胞や軟骨細胞に分化可能な体性幹細胞であり、組織修復因子の産生や、免疫調節効果を示すことから、骨再生治療への応用研究が進んできた。しかし、MSC の移植治療では、*in vitro* での培養により MSC の分化能が低下すること、移植後の生着率が低いことから、顕著な治療効果を得るには大量の細胞が必要であった。また、こうした背景から MSC が骨再生に有効なメカニズムとしては、移植初期に MSC が分泌するサイトカインや Extracellular Vesicles (EVs) が中心であると考えられていた。一方で近年、MSC を、細胞が三次元構造を保持したままに配置可能な、細胞凝集塊であるスフェロイドに加工することで、MSC の骨芽細胞への分化能が向上すること、その結果として、骨再生が改善する可能性が示唆されてきている (Ho SS, et al., Stem cells. 2018; Imamura A, et al., Biochem Biophys Res Commun. 2020)。また、スフェロイド化は移植細胞の移植後生存率を改善することが報告されている (Kusamori, et al., J Control Release. 2014)。そのため、分化能を維持し、移植後生存率を改善した MSC スフェロイドでは、従来の MSC 移植治療とは異なる機序で骨再生効果を示すことが考えられる。しかし、スフェロイド化を介した MSC 中の分化刺激による細胞内シグナル、および分泌因子の変化、またこれに伴う周辺細胞への影響についてなどの骨修復・再生促進作用のメカニズムについては不明である。

以上の背景から申請者は、骨再生を目的とした MSC の移植治療において、高い分化能を持った MSC スフェロイドに着目して、MSC の骨再生効果を解析することにより、新たな骨再生のメカニズムと方法を明らかにできるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*in vivo*、*in vitro* の両者のアプローチから MSC スフェロイドの骨修復・再生能と、その機序について明らかにし、MSC スフェロイドによる効果的な骨修復・再生治療の発展につなげることである。具体的には、*in vivo* の骨修復遅延マウスを用いた骨欠損モデルにおける骨修復・再生促進効果の評価と、MSC スフェロイド移植の有無による炎症期・骨修復期・リモデリング期の骨再生関連因子の発現評価をもとに、*in vitro* における MSC スフェロイドの分化能、および液性因子や EVs を介した骨周辺細胞への影響を評価することで、MSC スフェロイドの骨再生メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) MSC スフェロイドの作製

MSC として、マウス皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞 (ADSCs)、もしくはマウス骨髄由来間質細胞株 (ST-2) を用いた。8 週齢の雄性マウスの皮下より脂肪組織を摘出後、コラゲナーゼによる消化を行い、遠心後に沈殿した細胞群のうち培養プレートに接着した細胞を ADSCs として使用した。スフェロイドの作製には、3D Petridish (Microtissues inc., Providence RI, US) もしくは Poly-HEMA コーティングした Elplasia プレート (Kuraray Co., LTD, US) を使用した。

### (2) MSC スフェロイドの骨芽細胞分化評価

スフェロイド化した ST-2 細胞を 200 ng/ml BMP-2 含有培地中で培養することにより、骨芽細胞分化を誘導した。誘導後の細胞の骨芽細胞マーカーの遺伝子発現レベルを RT-PCR 法によって評価した。

### (3) MSC スフェロイドの骨修復・再生能の評価

8 週齢の雌性マウスに 200mg/kg のストレプトゾトシンを腹腔内投与し、4 週間後の血糖値が 300 mg/dL 以上のマウスを糖尿病モデルマウスとして用いた。12 週齢の雌性マウスの大腿骨に直径 0.8 mm の骨欠損を作製した。Vehicle、懸濁状態の ADSCs、スフェロイド化した ADSCs を搭載したゼラチンハイドロゲルもしくは Fibrin glue により骨欠損を被覆した。経時的にマイクロ CT によって再生骨量を定量することで骨再生効果を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) MSC スフェロイドの作製

ADSCs および ST-2 細胞を 3DPetridish または Poly-HEMA コーティングした Elplasia プレート上で培養することでスフェロイドが形成された。また、播種細胞数を制御することでサイズの異なるスフェロイドの作製に成功した。

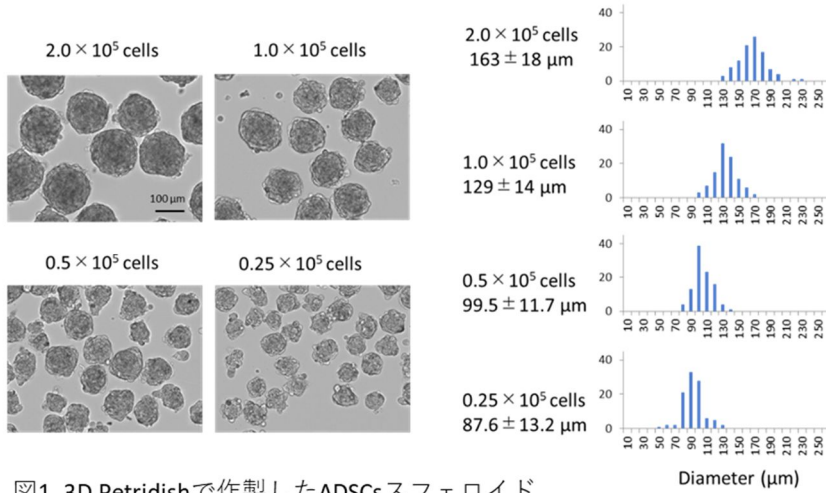


図1. 3D Petridishで作製したADSCsスフェロイド

### (2) MSC スフェロイドの骨芽細胞分化評価

スフェロイド化した ST-2 細胞では、単層培養した ST-2 細胞と比較して骨芽細胞マーカである ALP および OSX の発現レベルが有意に低下した。一方で BMP2 添加により骨・軟骨分化を誘導した結果、スフェロイド化した ST-2 細胞では BMP2 刺激による ALP および OSX 発現の応答性が有意に増加した。

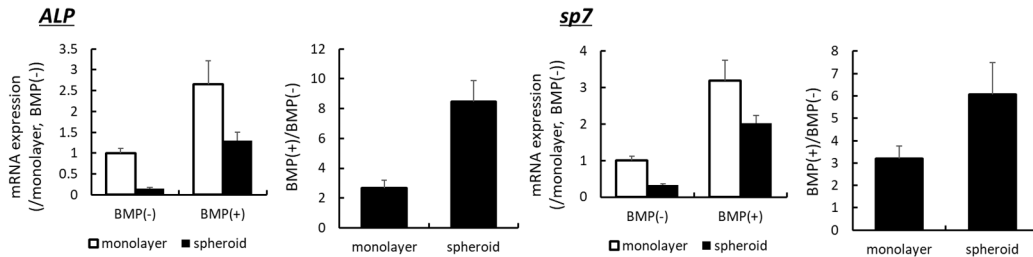


図2. ST-2スフェロイドの骨芽細胞マーカの変化

### (3) MSC スフェロイドの骨修復・再生能の評価

健康マウスと糖尿病モデルマウスのいずれにおいても、移植細胞数、スフェロイドサイズ、足場素材（ゼラチンハイドロゲルおよび Fibrin glue）によらず、懸濁状態の ADSCs 移植と比較してスフェロイド化した ADSCs 移植による骨修復の促進効果はみられなかった。本結果より、ADSCs スフェロイドでは、先行文献にて報告されている間葉系幹細胞のスフェロイド化による骨修復の増強効果が得られないことが示唆された。

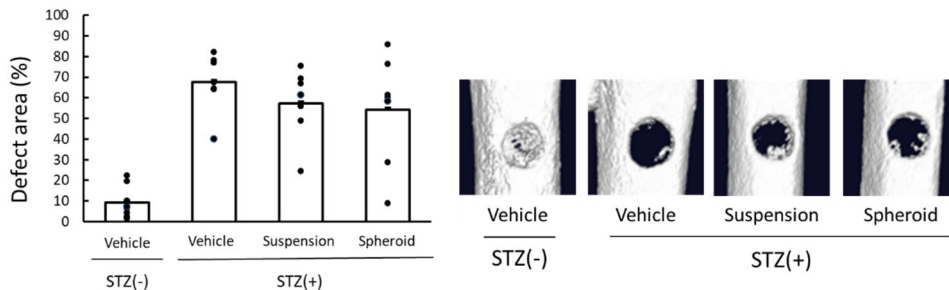


図3. 移植10日後の大腿骨欠損部の骨修復

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kawaguchi Miku, Kawao Naoyuki, Muratani Masafumi, Takafuji Yoshimasa, Ishida Masayoshi, Kinoshita Yuko, Takada Yuto, Mizukami Yuya, Ohira Takashi, Kaji Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of peripheral myelin protein 22 in chronic exercise induced interactions of muscle and bone in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.30706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawao Naoyuki, Kawaguchi Miku, Ohira Takashi, Ehara Hiroki, Mizukami Yuya, Takafuji Yoshimasa, Kaji Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Renal failure suppresses muscle irisin expression, and irisin blunts cortical bone loss in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 758 ~ 771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcsm.12892	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mizukami Yuya, Takahashi Yuki, Shimizu Kazunori, Konishi Satoshi, Takakura Yoshinobu, Nishikawa Makiya	4. 巻 44
2. 論文標題 Calcium Peroxide-Containing Polydimethylsiloxane-Based Microwells for Inhibiting Cell Death in Spheroids through Improved Oxygen Supply	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1458 ~ 1464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ehara Hiroki, Takafuji Yoshimasa, Tatsumi Kohei, Okada Kiyotaka, Mizukami Yuya, Kawao Naoyuki, Matsuo Osamu, Kaji Hiroshi	4. 巻 68
2. 論文標題 Role of plasminogen activator inhibitor-1 in muscle wasting induced by a diabetic state in female mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1421 ~ 1428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ21-0142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Masayoshi, Kawao Naoyuki, Mizukami Yuya, Takafuji Yoshimasa, Kaji Hiroshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Serpinb1a suppresses osteoclast formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101004 ~ 101004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Masayoshi, Kawao Naoyuki, Mizukami Yuya, Takafuji Yoshimasa, Kaji Hiroshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Influence of Angptl1 on osteoclast formation and osteoblastic phenotype in mouse cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-021-04278-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawao Naoyuki, Iemura Shunki, Kawaguchi Miku, Mizukami Yuya, Takafuji Yoshimasa, Kaji Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Role of irisin in effects of chronic exercise on muscle and bone in ovariectomized mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 547 ~ 557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01201-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高藤義正、河尾直之、奥本 勝美、大平宇志、水上優哉、城潤一郎、田畑泰彦、梶博史.
2. 発表標題 筋細胞由来細胞外小胞は糖尿病マウスの 骨修復・再生遅延を改善する.
3. 学会等名 第21回 日本再生医療学会総会 2022.3.17-19
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawaguchi M, Kawao N, Muratani M, Takafuji Y, Ishida I, Mizukami Y, Ohira T, Kaji H.
2. 発表標題 Roles of PMP22 in the alterations of muscle and bone induced by exercise in mice.
3. 学会等名 The 99th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan Joint Meeting. 2022.3.16-18. Sendai
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河尾直之、川口美紅、水上優哉、高藤義正、大平宇志、梶博史.
2. 発表標題 マウス慢性腎不全による骨量減少におけるアイリシンの役割.
3. 学会等名 第8回日本サルコペニア・フレイル学会大会. 2021. 11.6-7
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takafuji Y, Kawao N, Mizukami Y, Okada, K, Jo J, Tabata Y, Kaji H.
2. 発表標題 Transplantation of combined muscle cell-derived extracellular vesicles and gelatin hydrogel improves bone repair delayed in diabetic mice.
3. 学会等名 The International Society for Stem Cell Research 2021 Tokyo Symposium. 2021.10.28
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高藤義正、辰巳公平、水上優哉、河尾直之、岡田清孝、村谷匡史、梶博史.
2. 発表標題 筋・骨連関に関わる細胞外小胞とmiRNAの解析
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会学術集会. 2021.10.19
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高藤義正、辰巳公平、水上優哉、河尾直之、岡田清孝、村谷匡史、梶博史
2. 発表標題 筋・骨連関に関するエクソソームのmiRNA解析
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会. 2021.10.8-10
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河尾直之、川口美紅、水上優哉、高藤義正、梶博史.
2. 発表標題 マウス慢性腎不全が筋と骨に及ぼす影響におけるアイリシンの役割.
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会. 2021.10.8-10
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawao N, Shimoide T, Morita H, Mizukami Y, Takafuji Y, Ishida M, Kaji H.
2. 発表標題 Roles of olfactomedin 1 in the alterations of muscle and bone induced by hypergravity in mice.
3. 学会等名 The 126th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists & The 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan Joint Meeting. 2021.3.28-30. Nagoya
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------