

## 論文の内容の要旨

論文題目 臍帯由来間葉系細胞の細胞周期と骨分化能に関する研究

氏名 阿部 和治

### 【緒言】

口唇口蓋裂は、日本国内では、約500人に1人の割合で発生する比較的高頻度の先天性疾患である。頭蓋顔面先天異常疾患は、全先天異常疾患の約25%を占める。口唇口蓋裂の治療には、約18年の長期間にわたる治療が必要であり、顎裂の状態や成長に伴う歪みを生じることがあり、複数回の手術が必要となっている。現在、顎裂部へは、患児の腸骨の海綿骨が移植されている。腸骨から海綿骨を取り出した後の合併症として、骨髄炎、神経損傷、深部感染、医原性腸骨骨折、仙腸関節損傷、血種、血管損傷、出血、持続的疼痛、癍痕、骨盤骨の変形に伴う後遺症などがある。口蓋裂患児への負担をできるだけ少なくすることは喫緊の課題である。一方、臍帯由来MSCは、出生時の副産物としてドナーから非侵襲性に採取でき、増殖能が高く、MSCソースとして注目されている。私は、自家臍帯由来MSC (Mesenchymal Stromal Cell) を骨芽細胞に分化誘導し、スキャホールドと共に口蓋裂患児の顎裂部へ移植できるのではないかと考えた。

しかしながら、臍帯由来MSCは、骨髄や脂肪由来MSCと比べて増殖能が高い一方、骨分化能は劣っているとされているため、効率的かつ確実な骨分化誘導方法の確立が課題である。

### 【目的】

口蓋裂患児の顎裂部への腸骨移植の代替えを目指し、臍帯由来MSCを骨分化させて、スキャホールドと共に骨芽細胞(3D骨芽細胞)を移植するためのProof of Concept

(POC)を確立する。そのために、本研究では、臍帯由来MSCの骨分化能について、増殖と分化という観点から特に細胞周期と骨分化能の関係を検討し、その分化誘導方法を確立することを目的とする。

### 【方法】

本研究は、東京大学医科学研究所倫理委員会から承認を受けて行われた(承認番号25-28-0902及び30-51-A1018)。遺伝子導入のためのベクター等の取り扱い、東京大学第二種使用等拡散防止措置機関より承認を得た(承認番号K19-34)。母親より同意を得て採取した臍帯から、エキスプラント法にて得られたMSCをさらに培養し、P4~P5の細胞を実験に供した。培地は、10%牛胎仔血清(FBS)  $\alpha$ -MEM (FBS(+)+ $\alpha$  MEM)を用いた。

MSCの細胞表面マーカーはフローサイトメトリーで行った。軟骨芽細胞への分化は、NH Chondro Diff Medium(Miltenyi Bio)を用いて、ペレット法にて実施した。脂肪細胞への

分化は、デキサメタゾン、インスリン、インドメタシン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンを10%FBS  $\alpha$  MEM 培地のカクテルにてプレート培養にて実施した。骨芽細胞への分化能は、Stem Pro TM Osteogenesis Differentiation Kit を用いた。骨分化マーカーは、定量的 RT-PCR 法を用いて骨分化誘導後1～3週間まで経時的に定量解析した。細胞周期は、Cell-Clock Cell Assay kit (BioColor Ltd., UK) を用いて、添付マニュアルに従って細胞を染色した。また、Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) 蛍光プローブを、臍帯由来 MSC にレンチウイルスを用いて tFucci(CA)2/pCSII-CMV 遺伝子を導入 (Fucci 遺伝子導入) し、蛍光顕微鏡にて観察した。さらに、臍帯由来 MSC をアテロコラーゲンゲルに播種後、骨分化誘導培地で3週間培養した3D骨芽細胞をマウスの頭蓋部及び肋骨部に移植し、病理組織を解析した。

## 【結果】

口蓋裂患児1例と健常児4例の臍帯からエクスプラント法にてMSCを得て、P4またはP5まで培養し、MSCの性状を比較した。口蓋裂患児と健常児の臍帯由来MSC共に細胞はプラスチックディッシュに付着し、表面抗原はCD90、CD73、CD105、CD44及びHLA-ABCは陽性、CD34、CD11b、CD19及びHLA-DRは陰性であった。増殖能について、口蓋裂患児臍帯由来MSCは健常児臍帯由来MSCと比較して初期増殖に関しては、ほぼ同等に増殖を示したが、増殖限界が低かった。口蓋裂は先天性疾患に合併することも多い為、本患児の染色体検査を実施した結果、染色体異常は認められなかった。また、口蓋裂患児及び健常児臍帯由来MSCの軟骨芽細胞及び脂肪細胞への分化能は、同等であった。

骨芽細胞への分化誘導においては、臍帯由来MSCは、骨髄や脂肪由来MSCに比較して、アリザリンレッドS染色陽性を示すCa沈着は少なかった。この臍帯由来MSCの骨分化能の低下の一因として盛んな増殖能にあるのではないかと考えた。そこで、増殖を止めるために、FBSを含まない $\alpha$ -MEM培地(FBS(-)+ $\alpha$ -MEM)で洗浄後、FBS(+)+ $\alpha$  MEMとFBS(-)+ $\alpha$ -MEMに分けて1～3日培養後に、骨分化誘導培地に置換し4週間培養した。その結果、FBS(-)+ $\alpha$  MEMの状態でも骨分化誘導を行った方が、FBS(+)+ $\alpha$  MEMで培地での培養よりもアリザリンレッドS染色で染まるCa沈着が多く、骨分化能が高かった。一方で、FBS(+)+ $\alpha$  MEMで洗浄したが、すぐに骨分化誘導培地に置換した細胞、すなわち、0日では、FBS(-)+ $\alpha$ -MEMのみと同等にCa沈着が多いが、培養後1～3日培養後では、Ca沈着は非常に減少し骨分化能は劣っていた。FBS(-)+ $\alpha$ -MEMで骨分化能が高かったことから、細胞増殖を停止させること、すなわち細胞周期と関連があるのではないかと予測された。そこで、Cell-Clock染色法を用いて、臍帯由来MSCの細胞周期について検討したところ、FBS(+)+ $\alpha$  MEMでは、0日目にG1期が多くを占め、3日目にG1期までに、細胞周期が回転した。一方、FBS(-)+ $\alpha$ -MEMでは、G1期よりもS期/G2期/M期の細胞が多く観察され、3日目までS期/G2期/M期の細胞が多く観察され、凝集し

た死細胞も増加した。

次に、FBS(-)+ $\alpha$  MEM で洗浄後、洗浄後、FBS を加えて何時間が最も G1 期が多くなるか経時的に細胞周期を観察した。その結果、FBS(+)+ $\alpha$  MEM 培地置換後 1 時間が最も G1 期の細胞が集積していることが分かった。

これらの結果を基に、凍結・解凍した臍帯由来 MSC において、FBS を Off-On することによって、細胞周期をコントロールできる可能性が出た。時間軸や遠心条件を検討した結果、下記の方法を考案した。すなわち、37°C 恒温槽で解凍後の臍帯由来 MSC では様々な細胞周期の細胞が混在していたが、FBS(-)+ $\alpha$  MEM に浮遊し、1,000rpm~1,100rpm 10 分 4°C の条件で遠心後、4°C のまま 1 時間~1 時間 30 分遠心分離機内に静置したところ、ほぼ全て G1 期以外、S/G2/M 期を示した。さらに、遠心分離機から取り出し、クリーンベンチの中で、50mL チューブ内の培地を除去し FBS(+)+ $\alpha$  MEM を入れ、さらに 4°C ~ 常温で 1 時間から 1 時間 30 分静置したところ、ほぼ全ての細胞は G1 期に集束していた (G1 同期法)。

次に、本 G1 同期法も用いて、健常児臍帯由来 MSC を G1 期または G1 期以外 (S/G2/M 期) に同期させた後に骨分化誘導培地を置換し、3 週間培養後、アリザリンレッド S 染色を行った。その結果、G1 期に骨誘導培地に置換した細胞は、G1 期以外の場合に比べて、明らかにアリザリンレッド S 染色陽性の Ca 沈着が多く、骨分化能が高かった。また、口蓋裂患児と健常児臍帯由来 MSC を G1 同期法で、G1 期にした後に、3 週間まで 1 週間ごとに骨分化誘導培地を交換する方法で、骨分化誘導をおこなったところ、両者ともに、アリザリンレッド S 染色陽性の Ca 沈着が増加した。その時の骨分化関連遺伝子の発現を経時的に解析したところ、両者ともに、骨分化誘導初期には、Wnt-5 の上昇を認め後減少に転じる一方、RUNX2・ $\beta$ -Catenin 系は、1~3 週間まで徐々に上昇した。Cyclin D1 も同様に上昇した。骨髄由来 MSC では、比較的初期に一過性に上昇した。なお、SRY-related high-mobility group box 9 (SOX-9) は、いずれも骨分化誘導下では抑制されていた。Alkaline Phosphatase は、本 MSC では 3 週間まで上昇した。Osteocalcin は、骨分化誘導最終になってようやく上昇した。その発現パターンは両者ともにほぼ同じであった。

次に、ヌードマウスへの移植のため、アテロコラーゲンゲルに G1 期に同期させた健常児臍帯由来 MSC を播種し、骨分化誘導培地で培養した 3D 骨芽細胞をヌードマウスの頭蓋正中部と肋骨に移植した。3 匹中 1 匹においてアテロコラーゲンゲルとともに移植した。3 か月後、骨芽細胞部分に、新生骨及び骨髄の侵入を確認した。

## 【考察】

本研究では、不確実であった臍帯由来 MSC からの骨芽細胞への分化誘導を、特に新たな添加物や遺伝子操作なく、細胞周期の G1 期に同期後に分化誘導をかけることで、Ca 沈着を伴う骨芽細胞へ分化させることができた。特に、臍帯由来 MSC という増殖盛んな細胞

においては、増殖と分化誘導という大きな二つの方向性を考える上で、細胞周期の重要性が示唆された。その検討過程で、G1 期同期法を発明した。G1 同期法は、衛生的で、試薬無添加で、簡便で、大量に G1 期に同期できる方法であり、他の組織への分化誘導においても G1 期に同期させることで、誘導効率が上がる可能性がある。こうした試みはこれまで報告がない。今後、本方法で誘導した 3D 骨芽細胞の動物モデルでの生着率を上げて、非臨床有効性の POC を得ていきたいと考える。なお、FBS(-)+ $\alpha$ MEM での短期間培養における G1 期以外の細胞周期における高い骨分化能の機序の解明が残されている。

本研究では、1 例のみであるが、貴重な口蓋裂患児臍帯 MSC が得られ、健常児臍帯由来 MSC と比較し、同等の細胞表面抗原の発現を認め、骨分化能およびその遺伝子発現パターンにおいても同等であったことから臨床応用できるソースとなり得る可能性がある。但し、自家臍帯由来 MSC ソースとして、臍帯は出生時にしか採取できないという点、染色体異常等の負荷的異常が無いことが条件であることに留意する必要があるが、出生時に自家臍帯をストックして、口蓋裂治療のみならず、自家細胞を用いた治療への応用が期待される。本研究の G1 同期法のメカニズムは、未解明の為、私は、このメカニズムを解明していきたい。