

東海大学大学院令和 3 年度博士論文

ヒト間葉系幹細胞から髓核細胞様細胞へと
相乗的分化誘導を可能とする成長因子に
関するスクリーニングの検討

指導 渡辺 雅彦 教授

東海大学大学院医学研究科

先端医科学専攻

森田 浩介

- ・この学位申請論文は、applied sciences に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

- ・applied sciences に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ [電子書庫システム] で公開することの承諾を得ている。

1. 総括

【背景】 近年、間葉性幹細胞（MSC）から椎間板髄核（NP）細胞様細胞への分化を誘導する成長因子が検討されている。本研究では、MSC の NP 細胞様細胞への相乗的分化を誘導する成長因子の組み合わせについてスクリーニングを行った。

【方法】 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、GDF5、GDF6、Wnt3a、Wnt5a、Wnt11、および Shh を用いた 86 通りの組み合わせを調製し、ヒト MSC を刺激した。ヒト MSC の分化能は、アルシアンブルーアッセイおよび NP 細胞マーカー発現（COL2A1、CD24 など）によって評価した。アルシアンブルーアッセイ評価による上位 4 つの組み合わせ、および GDF5/TGF- β 1 の分化誘導能を、3D ペレット培養を用いて評価した。

【結果】 アルシアンブルーアッセイより、86通りの成長因子の組み合わせのほぼすべてがグリコサミノグリカン産生を増強することが示された。qPCR解析から、TGF- β 2/Wnt3a、TGF- β 1/Wnt3a、TGF β 1/Wnt3a/GDF6、および Wnt3a/GDF6 が最も強力な組み合わせであることが明らかになった。3D ペレット培養において、これらの組み合わせは、NP マーカーの発現を誘導したものの、元来の NP 細胞種の基質産生能は示さなかった。一方、GDF5/TGF- β 1 を培養に添加した場合のみ、グリコサミノグリカン含有量の大幅な増加を示す軟骨性ペレットが形成された。

【結論】 GDF5/TGF- β 1 は、MSC から NP への分化に最適な成長因子の組み合わせであることが示されたが、3D ペレット培養および *in vivo* でのさらなる評価が必要である。Wnt3a は、単層ベースの NP 細胞分化に有望であることが示されたが、さらなる検討が必要である。

2. 研究の背景

腰痛、頸部痛は整形外科において最も一般的な愁訴である。しかしながら、これらの症状に対する有効な治療法は確立されていない。近年、これらの症状に対する治療法として、椎間板変性に対する再生医学的アプローチが検討されている。椎間板変性は、椎間板を構成する NP 細胞の不可逆的な変化が原因であり、細胞外基質の減少をもたらす進行性の病態である。はじめに、グリコサミノグリカンが豊富な II 型コラーゲンを主とする NP 細胞外基質が徐々に I 型コラーゲンに置き換わり線維性組織へと変化し、椎間板の生体力学的特性が損なわれる。椎間板変性により椎間板高は減少し、他の脊椎構成要素により代償され、それによって椎間関節炎や脊椎すべり症などのさまざまな脊椎変性疾患を引き起こす。また、外側の線維軟骨である線維輪（AF）も同様に変性を起こし、それによって椎間板の膨化や AF の破綻の結果、椎間板ヘルニアを引き起こす。また、これらの退行性変化に対する反応として椎間板細胞が炎症性因子を分泌し、通常は無血管で神経支配されていない椎間板への神経の侵入、血管新生、免疫細胞の流入や、近傍の神経構造へ影響を及ぼす。つ

まり、これらの変化は侵害受容を引き起こす可能性があり、重症の場合には患者に動くことが困難な程の痛みをもたらす可能性がある。椎間板変性のこれらの変化を治療することは非常に困難である。保存的治療として、一般的には鎮痛剤や筋弛緩薬が投与され、変性の後期段階での外科的介入としては椎間板組織の除去（顕微鏡下椎間板摘出術など）または完全な椎間板の置換、固定術（関節固定術や関節形成術など）がある。椎間板変性の最終段階の介入は高額かつ侵襲的であり、隣接する椎間板疾患や感染症などのさまざまな合併症を伴う。さらに、鎮痛薬に効果がなく、まだ手術の適応がないような軽度から中等度の腰痛に関連する椎間板変性症の患者に対しては治療法がない。

生物学的治療法の開発において、椎間板を修復ないし再生する細胞をサポートするさまざまな治療戦略が検討されている。たとえば、遺伝子治療、成長因子注入、生体材料注入、組織工学などがある。近年、臨床応用されつつあるのが細胞治療であり、これは *de novo* での細胞を椎間板に直接導入する再生戦略である。細胞治療では、

移植細胞は椎間板内に生着し、適切な細胞外基質産生に寄与するか、あるいは炎症反応を抑え変性細胞を調節することが可能である。いくつもの動物実験から、細胞治療が、椎間板変性を抑え、細胞外基質の合成および炎症の抑制、再生を誘導することが示唆されている。過去 10 年間の多数の臨床試験から、細胞治療の安全性が確認され、痛みや障害を軽減する能力が示唆されており、今後、大規模なプラセボ対照試験の結果が非常に期待されている。

椎間板再生の細胞源として最も研究されているもののひとつが MSC である。MSC は、その細胞誘導の多様性、拡張性、および免疫反応が少ないことが示唆されており、他の細胞源よりも有用である。このことは、培養中に効力を失い、細胞数が少なく、細胞ソースが限られているような変性している NP 組織から得る細胞、または他の軟骨形成細胞とは対照的である。さらに、MSC は免疫調節機能と多分化能を備えているため、椎間板変性に対する効果も期待できる。しかしながら、低酸素および酸性である椎間板の環境は MSC にとって異質であり、そのような厳しい環境で生存し、増殖・分化する能力につ

いては疑問が残る。メソブラスト社による第 II/III 相臨床試験に関する最近の報告では、MSC ベースの製品が痛みを軽減できることが示されたが、MRI では再生様変化は観察されていない。そのため、さまざまな研究において、環境条件、ハイドロゲルシステムの使用、遺伝子操作などが検討され、MSC の NP 細胞様細胞表現型への分化が試みられている。NP 細胞様細胞表現型への分化は、グリコサミノグリカン産生の向上、またはアグリカン、II 型コラーゲン、ブラキュリ、CD24 などの NP 細胞マーカー発現レベルの向上によって示される。NP 細胞様細胞への分化をサポートするための成長および分化因子としては、Wnt3a、Wnt5a 、TGF- β 1、TGF- β 3、GDF5、GDF6 などが示されているが、それぞれの効力を比較した研究はほとんどない。Clarke らの研究では、GDF5、GDF6、または TGF- β 1 添加培地が検討され、GDF6 添加培地が MSC から NP 細胞への分化に最適であることが示された。さらに Hodgkinson らは、脂肪由来幹細胞を NP 細胞様細胞に分化させる GDF6 の潜在能力を明らかにし、また、SMAD1/5/8 経路の必要性を示している。一方、Colombier らは、TGF- β 1 と GDF5 を組み

合わせて使用することで、MSC から完全な軟骨性ペレットが形成され、ACAN、COL2A1、CD24、PAX1、OVOS2 などの NP 細胞マーカーの発現が増加することを示し、NP 細胞への分化が相乗的に増強されることを明らかにした。また、有力な軟骨形成因子として Wnt3a または Wnt3a と Wnt5a の組み合わせを示す研究もあり、特に Wnt3a を他の軟骨形成因子と組み合わせることは潜在能力を保持すると推測されている。Wnt3a は 7 回膜貫通型受容体タンパク質である Frizzled 受容体に結合し、Wnt/ β カテニンシグナル伝達を活性化する。Wnt5a は Wnt3a の Frizzled 受容体への結合を競合的に阻害し、Wnt/ β カテニンシグナル伝達を抑制、また細胞表面受容体である受容体型チロシンキナーゼ (ROR2) と結合し、Wnt/ Ca^{2+} pathway を活性化することが明らかになった。興味深いことに、Wnt3a と Wnt5a はともに有力な軟骨形成因子として提唱されているが、シグナル伝達においてはまったく異なる作用を持つ。また、ROR2 を発現する MSC ペレットはより大きく、COL2A1 の発現と GAG の産生を増強する傾向がある。つまり ROR2 を介

した Wnt/Ca²⁺ pathway の作用が MSC を軟骨形成へより誘導しうることを示唆されている。

MSC から NP への細胞分化を可能にするために、さまざまな要因が提案されている。しかしながら、どの因子、またはどの因子の組み合わせが最も有効であるかを結論付ける大規模な評価やスクリーニングは報告されていない。そこで、本研究では、MSC から NP 細胞様細胞への分化の指標としてグリコサミノグリカン産生および NP 細胞関連発現レベルを用い、さまざまな成長因子の組み合わせをスクリーニングし、最も有力な組み合わせを検討した。

5. 考察と展望

この研究では、MSC から NP 細胞様細胞への分化を促進するのに最も高い効力を示す成長因子またはその組み合わせを特定することを目的とした。単層培養とアルシアンブルー染色を用い、86 通りの成長因子の組み合わせについて、グリコサミノグリカン産生刺激能力をスクリーニングした。組み合わせに用いた因子は一般的な軟骨形

成能を有するため、すべての組み合わせがグリコサミノグリカン産生刺激能力を示した。興味深いことに、高い効力を持つ組み合わせの大部分が Wnt3a を含んでいた。10 通りの最も強力な成長因子の組み合わせ、および GDF5/TGF- β 1 に対して NP 細胞マーカーの発現を誘導する能力についてさらに分析した。TGF- β 2/Wnt3a、TGF- β 1/Wnt3a、GDF6/TGF- β 1/Wnt3a、および GDF6/Wnt3a が NP マーカーとされる CD24 および SOX9 の発現を増強する能力を示した。ほとんどの組み合わせが、COL2A1 と T の発現は増強した。Colombier らの報告に反して、我々の単層培養でのスクリーニングからは、GDF5/TGF- β 1 の組み合わせは、強力な軟骨形成因子として示されなかった。

しかしながら、MSC は、単層培養において比較的早期にその特性を変化させ、多分化能を失う傾向があることが知られている。また、マトリックスタンパク質を介した化学的指示、機械的シグナル伝達、およびアンカーポイントを与える、および成長因子を捕捉するなどによって特定の細胞の動きを促進、支持することが可能である。そ

のため、分化の誘導には、細胞外のみクロおよびマクロの環境が重要である。これらを考慮し、単層培養で観察された結果を、一般的なペレット培養法を用いて 3D 環境でさらに検証した。ペレット培養では、Wnt3a を含むいずれの組み合わせもグリコサミノグリカンの産生率を有意に高めることができず、単層培養の結果を支持しなかった。いくつかの NP マーカー、すなわち CD24、SOX9 および COL2A1 の発現レベルの増加は見られたが、ACAN 発現レベルの増加は見られなかった。これは、サフラニン-O 染色からグリコサミノグリカン産生率の有意な増加と、ペレット内の大きなグリコサミノグリカン陽性域が観察された GDF5/TGF- β 1 で処理されたペレット培養とは対照的であった。さらに、GDF5/TGF- β 1 は、3D ペレット培養において NP 細胞マーカーの発現を増強するのに最も強力であることが示された。他の 4 つの成長因子の組み合わせは、グリコサミノグリカン含有量の相対的に有意な増加をもたらさなかったが、DMMB アッセイと組織学的観察の両方でグリコサミノグリカン産生増加の傾向が見られた。Negative control のサフラニン-O 染色切片にはピンク/赤の染色は

観察されず、成長因子で刺激したペレットの染色切片には淡いピンクの染色が観察され、グリコサミノグリカンの存在が示唆された。

興味深いことに、GDF6/TGF- β 1/Wnt3a の組み合わせは、グリコサミノグリカン産生/DNA 比は 2 番目に高かったが、サフラニン-O 陽性領域は強くはなかった。GDF6/TGF- β 1/Wnt3a で刺激した培養の DNA 含有量は低く、細胞増殖、あるいは細胞生存率が低かった可能性を示している。

最初のスクリーニングでは、軟骨形成および NP 細胞表現型の強力な誘導因子として GDF5/TGF- β 1 を立証できなかったが、3D 環境内でのその後の評価により、Colombier らと同様に GDF5/TGF- β 1 の相乗効果により期待通りの分化誘導が可能であった。さらに、GDF5/TGF- β 1 は、十分な軟骨形成ペレットをもたらすことができる唯一の組み合わせであった。2D と 3D の培養結果の不一致は驚くべきことではない。細胞の挙動は、そのような細胞外の環境によって大きく変化する。さらに、TGF- β 1 は、心筋細胞、骨細胞、脂肪細胞などの他の細胞系統への MSC 分化を誘導することが示されており、軟

骨形成に特有の因子ではない。したがって、TGF- β 1 が軟骨形成 NP 細胞様表現型を促進する能力は、状況に依存する可能性がある。この仮説は、MSC の完全な NP 様分化のためのデキサメタゾン補給の必要性を示した Colombier ら独自の研究によって支持されている。とはいえ、Colombier らの結果とは異なり、本研究での細胞はヒト NP 細胞と一致する発現型またはマトリックス組成を実現することができなかった。これは、我々が採用した培養期間が短かったことが一因かもしれない。Colombier らはペレット培養を最大 4 週間維持したが、我々は 2 週間または 3 週間のみペレット培養を行った。さらに、Colombier らは脂肪生成由来の MSC を適用したが、我々は骨髄由来の MSC を適用した。MSC の供給源により分化能が異なることはよく報告されている現象である。

Wnt シグナル伝達は、一般的な関節の発達、恒常性において重要であり、また、椎間板変性における役割を有すると考えられている。しかしながら、軟骨形成における Wnt3a の役割は明確ではない。Wnt3a は、2D 単層培養内で MSC 増殖率と BMP2 を介した軟骨形成を増強する

ことが示されている。他の研究では、3D 条件での軟骨形成分化の増強のために MSC に Wnt3a を適用した場合、さまざまな結果が示されている。本研究の単層培養を用いたスクリーニングでも、最もよい成長因子の組み合わせの多くに Wnt3a が含まれていた。しかし、これらの増強効果は 3D 培養では観察されなかった。これは、Volleman らによって示唆されているように、Wnt3a の潜在的な役割と、より未分化な状態の維持に部分的に起因している可能性がある。2D 培養が長期間の培養で細胞の能力を失う可能性がある場合、Wnt3a はこの能力の喪失を軽減する役割を果たす可能性があり、それが、さらに追加された成長因子の軟骨形成能力を支持する可能性がある。

ROR2 は細胞密度の上昇に伴い発現率も上昇することが知られている。TGF- β 2/Wnt3a の組み合わせでは ROR2 の発現は惹起できなかったが、Wnt3a に加えて TGF- β 1 もしくは GDF6 を追加することにより ROR2 の発現を惹起したことから、軟骨形成能が支持された可能性が示された。これには、Wnt3a の、MSC を未分化な状態に維持したまま増殖率を増加させるという効力に依存している可能性も考えられる。

また、別の研究において、ROR2 陽性の MSC には損傷軟骨へ移植することで軟骨再生を促す能力があることが報告されており、本研究においても ROR2 の発現が確認されたことから、より軟骨形成能力が增強されていた可能性が示唆された。しかしながらこの有益な役割は 3D 培養では観察されなかった。Wnt3a のこの潜在的な能力を評価するために、MSC を Wnt3a 添加培地で拡張してその効力を維持し、その後 Wnt3a 以外の軟骨形成因子を添加した 3D ペレット培養で分化させるペレット培養システムを用いたが、組織学的結果からは、Wnt3a はマトリックス中のグリコサミノグリカンの沈着率を向上せず、この仮説立証できなかった。

我々の研究のもう一つの側面は、成長因子の組み合わせの直接比較である。たとえば、アルシアンブルーアッセイから、GDF5 を添加した場合、GDF5 を添加しない、または GDF6 を添加した場合と比較して、アルシアンブルー染色率が低下することがわかった。Wnt11、Wnt5a、または Shh のいずれかと、GDF5 または GDF6 の組み合わせも、グリコサミノグリカン産生の強化を示さなかった。我々のスクリー

ニングアッセイでは、特定の組み合わせや単一の成長因子添加の利点なども調査可能である。たとえば、GDF6/Wnt3a に TGF- β 1 または TGF- β 2 を添加すると、同様のアルシアンブルーの産生率が得られ、NP マーカーの発現は増強されないことがわかった。これは、TGF- β 1 または TGF- β 2 が GDF6/Wnt3a の組み合わせに付加価値を持たないことを示唆する。しかしながら、その後のペレット培養において、TGF- β 1 を添加した GDF6/Wnt3a が有意に高い CD24 および COL2A1 発現レベルをもたらし、ACAN および SOX9 発現レベルが増強される傾向を示すことがわかった。これらの結果は、細胞培養の状況依存性と、それぞれの細胞に対する成長因子の影響をさらに強調するものである。

しかしながら、これらの結果を解釈する前にいくつかの検討が必要である。本研究の限界のひとつは、特に最初のスクリーニングアッセイに適用されるドナーサンプルの数が限られていることである。適用される成長因子のコストが高く培養期間が比較的長いため、86 通りの異なる組み合わせの初期スクリーニングを、単一ソースの MSC

で評価した。さらに、アルシアンブルースクリーニングは、細胞数または DNA 含有量を補正せずに行った。理論上、細胞含有量の違いによって差異が引き起こされる可能性もあるが、培養期間が長い（3 週間）ため、すべての条件で培養はコンフルエントとなり、評価時の差異はごくわずかであった。考慮すべきもう 1 つの研究の限界は、単層およびペレット培養の結果を経時的に評価しなかったことである。異なる分化培養期間を適用することでより詳細な結果を得ることが期待できるため、さらなる検討が必要である。

椎間板変性を治療するための新しい治療戦略の必要性は高い。現在、細胞治療と成長因子注入が注目されているが、さまざまな生物学的治療のさらなる検証と最適化が必要になるであろう。誘導細胞の能力を増強するための 1 つの潜在的なアプローチは、移植前に細胞をプライミングして最適な同化状態を促進することである。これにより、移植された細胞は椎間板マトリックスの再編成に寄与する、または、局所細胞を誘導する最大限の潜在能力を持つことが期待される。成長因子は、このプライミングにおいて有力なツールとなる

可能性があるが、同時に注意も必要である。成長因子はしばしば状況依存的に機能するため、異なるドナーから得られた MSC の全てが同様に反応するわけではない。また、臨床応用する細胞製品にとって、品質管理は鍵である。さらに、成長因子は非常に高価であり、培養期間が長い、または生産規模が大きい場合に問題となる。これは、細胞治療の生産価格の上昇となり、商業化の妨げとなる可能性がある。繰り返しになるが、成長因子刺激の利点が細胞製品の費用を上回るように注意する必要がある。MSC から NP 細胞への分化のための 86 通りの異なる成長因子の組み合わせのスクリーニングから、効果が発揮されるメカニズムと必要な条件についてはさらなる調査が必要であるものの、Wnt3a が 2D 単層において潜在的に影響力のある因子であることが示された。分析されたすべての組み合わせの中で、GDF5 と TGF- β 1 の組み合わせのみが 3D 培養において完全な軟骨形成ペレットをもたらし、MSC から NP 細胞への分化にとって最も有力な組み合わせであった。

6. 結論

Wnt3a は、単層培養ベースの NP 細胞分化に有望であり、また GDF5/TGF- β 1 は、MSC から NP への分化誘導に最適な成長因子の組み合わせであることが示された。3D および *in vivo* でのさらなる評価が必要である。