

## 研究テーマ

ミックスサイズ幹細胞スフェロイド移植による高齢交通外傷  
患者の治癒促進

## 研究代表者

施設名 : 北里大学医学部 整形外科学

氏名 : 内田 健太郎



研究テーマ：ミックスサイズ幹細胞スフェロイド移植による高齢交通外傷患者の治癒促進

所属先：北里大学医学部整形外科学

氏名：内田 健太郎

目的と方法：

目的

令和3年中の交通事故件数は30万5,196件と年々減少傾向にあるが、80歳以上の高齢者の占める割合は増加し続けている。従って、高齢者交通外傷患者の骨折、骨欠損治療は、極めて重要である。間葉系幹/間質細胞 (MSC) は、骨芽細胞や軟骨細胞を含む多様な細胞への分化能に加えて、骨再生に不可欠な栄養因子を分泌することから骨再生に有用な細胞源である(1,2)。MSCのスフェロイド培養は、従来の二次元培養に加え、栄養因子の産生が亢進することが報告されている。(3-5)。しかし、スフェロイド単体では、骨再生を促進する効果が限定的であるとの報告もなされている(6,7)。

近年我々は、スフェロイドサイズにより栄養因子の産生が異なることを報告してきた(8)。一方、申請者は細胞外マトリックス、特にコラーゲンによる成長因子徐法の研究を行ってきた。

本研究では異なるサイズのスフェロイドを組み合わせた混合スフェロイド移植の有用性とスフェロイド周囲のマトリックスへの成長因子吸着による新規骨再生法の有用性を検討した。

方法

2細胞培養

MSCを $1.25 \times 10^5$  cells/well、 $1.25 \times 10^6$  cells /well の細胞数で細胞接着シャーレ (単層培養) および細胞非接着シャーレ (スフェロイド培養) 内で5日間培養した。5日間培養後、栄養因子 (*bFGF*, *Bmp2*, *Vegfa*) の発現を検討した。また、作製したスフェロイドは下記成長因子結合アッセイ、マウス骨折モデルに用いた。

成長因子結合アッセイ

スフェロイドへのbFGF結合を評価するためにFITC標識bFGF溶液とスフェロイドを混合し、30分間反応させた。上清を採取後、ELISAキットを用いて未結合bFGFの濃度を測定した。インキュベーション後の上清中のbFGF濃度の減少を測定することで、スフェロイドへのbFGFの結合を定量化した。

マウス骨折モデル

C57BL/6Jマウスを用いて、大腿骨骨折モデルを作成した。骨折させたマウスを次の5つのグループに分けた：骨折のみ（コントロール）、スフェロイド単独、bFGF 10  $\mu$ g 単独、bFGF 1  $\mu$ g吸着スフェロイド、bFGF 1  $\mu$ g吸着凍結スフェロイド (dSpheroids)。なお、 $1.25 \times 10^6$  cells /wellを移植すると骨折部で介在物となり、骨折治癒が遅延したため、スフェロイドは $1.25 \times 10^5$  cells/wellの条件で作製したものを移植に用いた。サンプルサイズは、G\*Power 3.1ソフトウェアを用いて、予備実験の結果（各群n=3）に基づいて計算した。コントロール群とbFGF-スフェロイド群間の骨ミネラル含有量（BMC）の平均と標準偏差を用いて、効果量を計算した。効果量（Cohen's d）は、2群の平均値の差を標準偏差で割ることで算出した。効果量（d=1.37）、有意水準（ $\alpha$ ）0.05および検出力（ $1 - \beta$ ）0.8を用いて、必要なサンプルサイズを決定した。その結果、10匹のサンプルサイズが必要であることが示された。骨折4週後のマウスから大腿骨を採取し、 $\mu$ CT撮影を行った。新生骨の骨体積（BV）および骨ミネラル含有量（BMC）は、3D画像解析ソフトウェア（Tri-3D-Bon; Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan）を使用して定量化した。

## 2.7 統計解析

統計解析には、まずShapiro-Wilk検定を使用してデータの正規性を評価した。2つの群間の比較には、データが正規分布に従うかどうかに応じて、t検定またはマン・ホイットニーU検定を適用した。2つ以上の群間の比較には、データが非正規分布であったため、クラスカル・ウォリス検定とダン検定を用いた。

## 結果

### 3.1 栄養因子の発現

スフェロイド培養MSCは単層培養MSCに比べ有意に *bFGF*, *Bmp2*, *Vegfa* の発現が有意に高かった（ $P < 0.001$ ）。

### 3.1, bFGF結合アッセイ

蛍光顕微鏡観察により、スフェロイド周辺にFITC蛍光が確認され、FITC標識bFGFがスフェロイドに結合したことが確認された。培養上清中のbFGF濃度を測定した結果、スフェロイドおよび凍結スフェロイドにそれぞれ $250.8 \pm 5.7$  ngおよび $241.9 \pm 42.3$  ngのbFGFが吸着したことが明らかになった。スフェロイドと非生存スフェロイド間で結合能に有意な差は見られなかった。これらの結果は、bFGFが生存および非生存スフェロイドの両方と効果的に結合することが示された。

### 3.4 bFGF吸着スフェロイドが骨体積および骨ミネラル含有量に与える影響

骨折後4週のCT画像および骨体積（BV）と骨ミネラル含有量（BMC）の定量結果を示している。bFGF吸着スフェロイドを用いた群では、BVおよびBMCがコントロール群

(BV:  $p = 0.012$ 、BMC:  $p = 0.015$ )、bFGF単独群 (BV:  $p = 0.012$ 、BMC:  $p = 0.008$ )、およびスフェロイド単独群 (BV:  $p < 0.001$ 、BMC:  $p < 0.001$ ) に比べて有意に高くなった。また、非生存スフェロイドにbFGFを負荷した群でも、スフェロイド単独群に比べてBVおよびBMCが有意に増加した (BV:  $p = 0.003$ 、BMC:  $p = 0.017$ )。

## 考察

スフェロイドMSCでは単層培養MSCに比べ骨形成に重要なbFGF, BMP-2, VEGFの発現が増加した。結合アッセイでは、bFGFがMSCスフェロイドに効果的に結合することが示され、MSCスフェロイドが成長因子のキャリアとして機能する可能性を示唆しました。in vivoでは、bFGFを負荷したスフェロイドは、コントロール群に比べて有意にBVおよびBMCを増加させました。特に、生存MSCスフェロイドが骨再生を促進する上で重要であり、スフェロイド単独やbFGF単独、あるいは非生存スフェロイドにbFGFを負荷した場合には、同様の効果は観察されなかった。

bFGFとコラーゲンキャリアとの相互作用は、多くの研究で広く文献に記載されており、コラーゲンがbFGFの有効なデリバリーシステムとして機能することが示されている(9,10)。コラーゲンは、その構造的性質とbFGFとの高い親和性により、標的部位での持続的な放出を可能にし、組織修復および再生を促進することが知られている。たとえば、コラーゲン足場は、骨治癒モデルにおいてbFGFをデリバリーするために使用されており、骨形成の促進が確認されている(9,10)。本研究の結果は、MSCスフェロイドがbFGFのキャリアとして機能し得ることを示唆している。MSCスフェロイドは、コラーゲンが豊富なECMを産生し、これによりbFGFが持続的に放出される。これにより、体内での迅速な拡散と短い半減期というbFGF投与の欠点を克服できる可能性がある。スフェロイドは、骨折部位での局所的bFGFの放出し、長期にわたる骨形成に関与するかもしれない。

本研究で非生存スフェロイドにbFGFを負荷した群でも骨治癒が観察されたことは、この群での骨形成促進効果はbFGF自体によるものである可能性が高い。一方で、生存MSCスフェロイドはキャリアとして機能するだけでなく、BMP-2やVEGFなどの追加因子を分泌し、骨再生を促進したものと考えられる。この違いは、bFGFとMSCスフェロイドの生物学的活性が骨再生において重要な役割を果たすと考えられる。

先行研究では、10  $\mu\text{g}$ のbFGFをマウス骨折モデルに投与すると骨形成が促進される一方で、1  $\mu\text{g}$ のbFGFでは有意な骨再生効果が観察されないことが報告されている(10)。本研究の結果もこれと一致しており、1  $\mu\text{g}$ のbFGF単独では骨形成が増加しなかった。しかし、1  $\mu\text{g}$ のbFGFをスフェロイドと組み合わせた場合には、骨形成が有意に増加した。この結果は、低用量のbFGFでもスフェロイドによるbFGFデリバリーシステムと組み合わせることで効果的に骨再生が促進される可能性を示している。これにより、bFGF治療において高用量に伴うリスク（例えば、血小板減少症、腎毒性、悪性細胞の活性化など(11,12)）を最小限に抑えながら、骨形成促進効果を発揮することが

可能となるかもしれない。

一方、大小のスフェロイドを組み合わせた混合スフェロイド移植では、大きなスフェロイドを移植した際に介在物となり、骨癒合の遅延が生じた。本研究ではマウスモデルを用いたため、マウス大腿骨に対して大きなスフェロイドを移植したことが、骨癒合阻害に働いた可能性がある。今後はラットやウサギなどの骨折モデルを用いて検討を行う必要がある。

## 結論

本研究は、bFGF吸着MSCスフェロイドが骨再生を促進に有用であることを示した。本方法は高齢者交通外傷患者の治療法に有用かもしれない。なお、結果の詳細はBioengineering 2024,11, 1041. <https://doi.org/10.3390/bioengineering11101041>に掲載されている。

## 参考文献

1. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. Biochimie 2013;95:2196-211.
2. Mijiritsky E, Ferroni L, Gardin C, et al. Porcine Bone Scaffolds Adsorb Growth Factors Secreted by MSCs and Improve Bone Tissue Repair. Materials (Basel) 2017;10.
3. Ho SS, Hung BP, Heyrani N, et al. Hypoxic Preconditioning of Mesenchymal Stem Cells with Subsequent Spheroid Formation Accelerates Repair of Segmental Bone Defects. Stem Cells 2018;36:1393-403.
4. Inglis S, Kanczler JM, Oreffo ROC. 3D human bone marrow stromal and endothelial cell spheres promote bone healing in an osteogenic niche. FASEB J 2019;33:3279-90.
5. Yamaguchi Y, Ohno J, Sato A, et al. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. BMC Biotechnol 2014;14:105.
6. Findeisen L, Bolte J, Vater C, et al. Cell spheroids are as effective as single cells suspensions in the treatment of critical-sized bone defects. BMC Musculoskelet Disord 2021;22:401.
7. Wagener N, Lehmann W, Boker KO, et al. Chondral/Desmal Osteogenesis in 3D Spheroids Sensitized by Psychostimulants. J Clin Med 2022;11.
8. Kuroda A, Mineo A, Shoji S, et al. Effect of spheroid size on gene expression profiles of a mouse mesenchymal stem cell line in spheroid culture. Biomed Mater Eng 2023;34:67-76.
9. Nakamura S, Ito T, Okamoto K, et al. Acceleration of bone regeneration of horizontal bone defect in rats using collagen-binding basic fibroblast growth factor combined with collagen scaffolds. J Periodontol 2019;90:1043-52.
10. Saito W, Uchida K, Ueno M, et al. Acceleration of bone formation during fracture healing by injectable collagen powder and human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from Clostridium histolyticum collagenase. J Biomed Mater Res A 2014;102:3049-55.

11. Epstein SE, Fuchs S, Zhou YF, et al. Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *Cardiovasc Res* 2001;49:532-42.
12. Unger EF, Goncalves L, Epstein SE, et al. Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2000;85:1414-9.