

19) 脂肪組織由来幹細胞を使用した骨再生に関する研究

研究代表者 竹川 政範

【研究目的】

組織工学的方法を用いた細胞治療は、骨再建・再生を低侵襲で効率良く行うために有用であると考えられる。近年、脂肪組織に含まれる体性幹細胞 Adipose derived stem cells (ADSC) が多分化能を有することが報告され、脂肪組織は骨髓に比較して低侵襲で採取が可能な組織なため再生医学に応用する幹細胞として有望視されている。われわれは、これまで ADSC は骨髓由来間葉系幹細胞 (MSC) に比較して vitro では骨芽細胞への分化が悪いが、vivo では同様の骨形成をすることを報告してきた。これは、ADSC と MSC では骨芽細胞への分化過程と多分化能に違いがあるためと我々は考えている。本研究は、ADSC の骨芽細胞への分化過程と適切な移植時期の関係を明らかにすること、手術に変わる方法として静脈注射など低侵襲の移植方法を開発することを目標とした。

【研究方法】

F344 ラットの脂肪組織から ADSC を分離した。ADSC および BMSC は FCS 添加 DMEM により培養した。培地にデキサメタゾン、 β グリセロリン酸、ビタミン C を添加し骨芽細胞分化誘導培地とした。

1. ADSC の骨芽細胞への分化過程の研究

ADSC および MSC を骨芽細胞分化誘導培地において 0 日、3 日、5 日、7 日、14 日間培養し研究に使用した。細胞の骨形成細胞への分化程度の評価のために、組織化学的にアルカリフォスファターゼ染色 (以

下 ALP)、石灰化物の形成を評価するためにフォンコッサ染色を行った。骨分化マーカーであるオステオカルシン (OC)、オステオポンチン (OP)、オステオネクチン (ON) の発現を免疫組織染色により評価した。

2. 細胞移植時期の検討

ラット頭頂骨に 4x4mm の円形の骨欠損を形成した後に、移植材料を埋入した。コラーゲンスポンジに MSC および ADSC を 3×10^5 個播種し骨芽細胞への分化誘導培地で 0 日、7 日、14 日間培養後移植を行った。コラーゲンスポンジのみを埋入した群を対照とした。移植後 28 日目に試料採取を行った。X 線による骨形成の評価はソフテックスを用い、母骨および移植床の超微細構造学的観察は走査型電子顕微鏡を用いた。組織学的な観察を光学顕微鏡で行った。

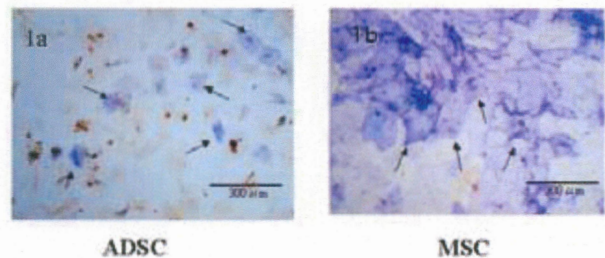
3. 静脈注射による低侵襲細胞移植方法の検討

研究 2 で行った方法と同様に骨欠損を形成し、細胞を播種しないコラーゲンスポンジを埋入した。埋入 3 日後、ラット尾静脈から 3×10^5 個の MSC および ADSC を注射した。評価は研究 2 と同様に行った。

【結果】

ADSC の骨芽細胞への分化過程の研究

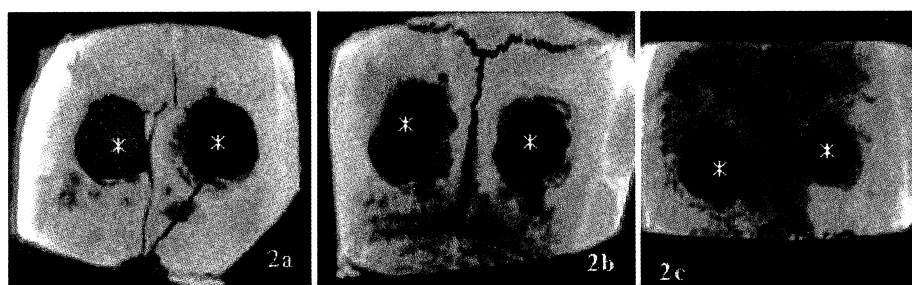
ALP は MSC では分化 14 日目に多数の細胞に発現していたが、ADSC での発現は少なかった (写真



アルカリフォスファターゼ陽性細胞(↑)はMSCに比較してADSCでは少ない

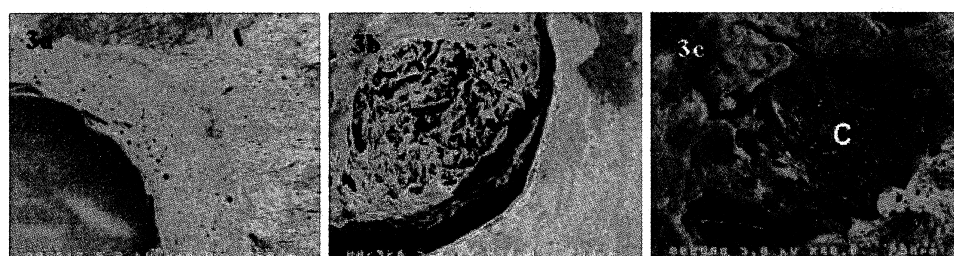
写真1 分化2週目アルカリフォスファターゼ染色

1a,1b)。フォンコッサ染色では、分化培養日数が 7 日目では石灰化物は不明瞭だが、14 日目になると明らかとなった。MSC に比較して ADSC は石灰化物の形成量が少なかった。免疫組織学的検索では、MSC の OC、OP、ON の発現が 3 日、5 日、7 日と増加したのに比較して ADSC は各時期における骨分化マーカーの発現が弱く 14 日目でも発現しない例も見られた。



コントロール 分化2週ADSC移植 未分化ADSC静注
未分化ADSC静注例および分化2週ADSC移植例ではコントロールと比較して骨欠損部(*)の縮小が見られる。

写真2 移植後4週目 X線像



コントロール 未分化ADSC移植 未分化ADSC静注
コントロールに比較して未分化のADSCを静脈注射した例では母骨から旺盛な新生骨(N)形成がコラーゲンスポンジ(C)上に見られる

写真3 移植後4週目 SEM像

細胞移植時期および低侵襲細胞移植方法の検討

X線学的所見 (写真 2a,2b,2c)

細胞移植群

未分化 ADSC 移植および 14 日分化移植例ではコントロールと比較して明らかな骨欠損部の縮小を認めた。MSC 移植群ではコントロールと比較して骨欠損部の縮小は見られなかった。

静脈注射群

未分化 ADSC および MSC 静脈注射例では骨欠損部の明らかな縮小が見られた。ADSC 分化 14 日静脈注射例ではコントロールと比較して良好な骨欠損の縮小が見られた。

SEM 所見 (写真 3a,3b,3c)

細胞移植群

ADSC 移植群では、移植物の脱落は見られなかった。ADSC 分化 14 日例の移植物表面の石灰化物は MSC 例と比較して多かった。

静脈注射群

MSC および ADSC の静脈注射例では移植物の脱落例はなかった。未分化 ADSC 静脈注射例では他の群と比較して移植物表面に旺盛な新生骨形成が見られた。

光学顕微鏡所見

細胞移植群

未分化 MSC 移植例ではコラーゲンスポンジ内部に類骨様の組織が見られた。ADSC および MSC ともに分化 7 日が分化 14 日移植に比較して新生骨の形成が不良であった。ADSC および MSC 分化 14 日移植例の移植床内部はコントロールと比較して血管および紡錘形の細胞を多く含んだ緻密な線維性の組織で充満されていた。

静脈注射群

未分化 MSC 静脈注射例では、移植床内部には担体のコラーゲンスポンジが見られた。ADSC 分化静脈

注射7日、14日例では分化14日移植例に比較して新生骨形成は劣っていた。

【考 察】

本研究の結果から、ADSCはMSCに比較して*in-vitro*での骨形成細胞への分化は悪いが、*in-vivo*ではADSCはMSCと比較して骨欠損部位では良好な骨形成を生じる事が明らかとなった。これは、我々の細胞の皮下組織への移植実験結果と同様であった。従来からADSCは多分化能を有する細胞を含むことが知られている。本研究結果のADSCを14日間分化して移植を行った例で、移植床内部において未分化間葉系細胞および血管が多数認められることから、ADSCは血管形成など創傷治癒に関与している細胞を多数含んでいる可能性が示唆された。今後ADSCの創傷治癒に関与する細胞への分化に関する研究も必要と考えられた。

ADSCの細胞移植時期の検討では、分化7日よりも14日に良好な骨形成が得られた。骨欠損部に細胞を移植する場合、ALP発現以後に分化させて移植することが必要である。

低侵襲細胞移植方法の検討では、未分化ADSCの静脈投与は骨欠損部位の骨膜性骨形成を促進することが示唆された。細胞治療による骨再生には移植細胞の生着、増殖、分化、機能発現が必須である。未分化ADSCは障害部位に生着し創傷治癒、骨形成に有利な細胞であると考えられた。細胞が目的の部位に生着し機能するかに関しては、GFP陽性細胞の利用などさらなる検討が必要である。未分化ADSC静脈注射が骨創の治癒に有用であれば、骨形成細胞への分化誘導時間が短縮でき、血清、成長因子などの他の生物由来因子を排除できる可能性があるため臨床応用がより現実的になると考えられる。以上から、脂肪由来体性幹細胞による骨再生研究を進めることで、骨欠損の修復・再建に新たな治療法の開発が期待できる。