

14) 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】

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、脂肪組織は骨髄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。しかし、骨再生医療に ADSCs を応用する上で重要な移植に効果的な骨形成細胞への分化程度、担体との接着、適切な細胞移植方法に関しては知られていない。今年度は、ADSC の骨形成細胞への分化と老化、骨再生に有効な細胞投与方法、静脈内投与した ADSC の骨形成における機能を検討することを目的とした。

【研究方法】

F344 ラットの骨髄から骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC)、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と老化および多分化能の変化の検討

ADSC および BMSC を骨芽細胞分化誘導培地において 0、7、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を評価するために、組織化学的にアルカリフォスファターゼ染色 (以下 ALP)、およびフォンコッサ染色を行った。細胞機能を評価するため PDGF-A、TGF β の発現を免疫組織染色により評価した。

細胞の骨芽細胞への分化能と老化に関しては、BMSC-P2 (継代数 2)、P8 (継代数 8) および ADSC-P2、-P8 の増殖能、骨分化能を評価した。骨分化能は骨分化マーカー Runx2、Osterix の発現量を Real-time PCR 法を用いて測定した。各細胞の増殖能は PI 染色を行い FACS 分析により細胞周期の解析を行った。

2. 骨再生に有効な細胞投与方法の検討

骨芽細胞分化誘導培地で 14 日間培養した ADSC を細胞として使用した。コラーゲンスポンジに 3×10^5 個の細胞を播種してラット皮下に移植した群、 3×10^5 個の ADSC を含有したコラーゲンゲルを作製してラット皮下に注入した群に関して検討を行った。評価は細胞移植後 28 日目に行った。

3. 静脈内投与した細胞の局在の検討

静脈内投与を行った ADSC の骨創への分布を検討するために、ADSC を BrdU で標識した細胞を静脈内投与する研究を行った。ラット頭頂骨に骨欠損を形成した後に、コラーゲンスポンジを埋入、埋入 3 日後にラット尾静脈から 3×10^5 個の BrdU で標識した細胞を注入した。細胞は未分化 ADSC および骨芽細胞分化誘導培地で 14 日間培養して使用した。評価は静脈内投与後 3 日目、7 日目とした。

【結果】

ADSC の骨芽細胞への分化過程の検討

ADSC 分化培養過程における ALP 染色では、陽性細胞が分化 14 日目の細胞にみられたがすべての細胞が陽性ではなかった。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。免疫組織学的検索では、未分化の ADSC では PDGF-A 陽性細胞が見られ、分化 7 日、14 日目でも同様に観察された。TGF β 陽性細胞は未分化 ADSC では発現が少ないが、分化 14 日目では増加していた。

細胞機能発現と老化の検討 Runx2 発現量は BMSC-P2、P8 とともに上昇傾向を認めた。ADSC の Runx2 発現量は P8 に比較して P2 で高く、上昇率は P2 が高かった。ADSC、BMSC 共に、Osterix 発現量は時間経過によって上昇を認めた。BMSC の Runx2 発現量は ADSC と比較して P2 では 3.08 倍で P8 では 2.84 倍と高く、Osterix は P2 では 3.7 倍、P8 で 1.67 倍の発現量を認めた (図 1)。細胞増殖能に関しては ADSC-P2、P8 の G0 / G1 間には、6.15% の差を認め、BMSC の P2、P8 の G0 / G1 間には 3.85% の差を認めた。このことは、BMSC -P8 に比べ ADSC の方が G0 / G1 期つまりは細胞周期を逸脱した細胞と細胞周期での DNA 合成を行っていない細胞は約 2.3% 多いことを示している。

骨再生に有効な細胞移植方法の検討

コラーゲンスポンジ細胞移植群では X 線学的に皮

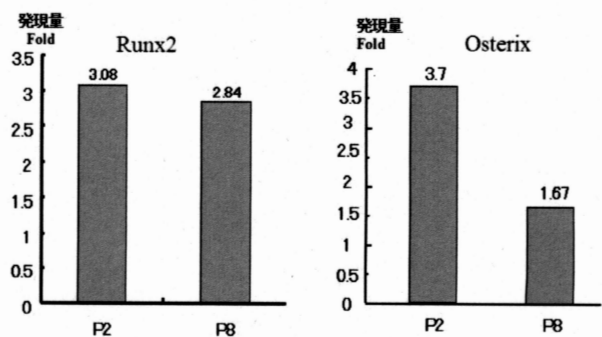


図 1 ADSC の発現量に対する BMSC の骨分化マーカー発現量 (BMSC/ADSC)

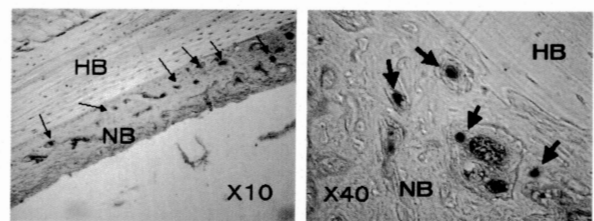


写真 1 BrdU 標識未分化 ADSC 静脈内注入後 7 日目抗 BrdU 抗体による免疫組織染色

下に石灰化物を認めたが、コラーゲンゲル注入群では石灰化物の形成は見られなかった。

静脈内投与した細胞の局在の検討

未分化 ADSC を静脈投与した例では注入後 7 日目には BrdU 陽性細胞は骨形成部位に集合していた (写真 1)。その分布は新生骨内外側の血管周囲と、新生骨内部では骨細胞様に見られた。それに対して、骨芽分化細胞誘導培地で 2 週間培養した ADSC を静脈注入した結果、BrdU 陽性細胞は骨形成部位にはほとんど見られなかった。

【考 察】

本研究の結果から、ADSC は BMSC とに比べて複数回の継代を行うと骨分化能および増殖能が低下することが示唆された。このことから、ADSC を骨形成細胞に分化させて使用する際には、多数の継代をせずに使用すべきであると考ええる。コラーゲンゲルを利用した細胞皮下投与では、投与部位に石灰化物の形成が見られなかった。骨形成を目的とした局所細胞注入に関しては、細胞移植に利用する担体等に関してさらなる検討が必要と考える。未分化 ADSC の静脈投与は骨欠損部位での骨形成に関与する細胞に分化して骨形成を促進すること、および骨形成に関与する血管形成に関与していることが今回の研究結果で示された。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。