

研究代表者 竹川 政範

【研究目的】

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。近年、脂肪組織に含まれる体性幹細胞 Adipose derived stem cells (ADSCs) は骨形成細胞、軟骨形成細胞、脂肪細胞に分化することが報告されている。われわれは、これまで ADSCs が in vitro で骨形成細胞に分化すること、in-vivo では骨欠損部の骨形成を旺盛にすることを明らかにした。さらに、ADSCs の静脈内投与は骨創治癒を促進することを明らかにしてきた。しかし、ADSCs の静脈内投与による創傷治癒および骨再生メカニズムは解明されていない。ADSCs の骨再生部での機能を明らかにするためには、投与した細胞の骨再生部での局在を知ることが重要である。今年度は、静脈内投与した ADSCs の骨創部での局在を知り、その機能を明らかにすることを研究目的とした。

【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 ADSCs を分離した。ADSCs 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 ADSCs 静脈内投与後の投与細胞の局在に関する検討

静脈内投与を行った ADSCs の骨創への分布を検討するために、ADSCs を BrdU で標識し、静脈内投与に使用した。ラット頭頂骨に骨欠損を形成し手術後 3 日目にラット尾静脈から 3×10^5 個の BrdU で標識した

細胞を投与した。対照は頭頂骨に骨欠損のみを形成し、細胞の静脈内投与を行っていないラットとした。評価は手術後2および7日目とした。手術後2および7日目に10%ホルマリンを用いて灌流固定し試料を採取した。静脈内投与を行った細胞の全身臓器への分布を評価するために、肺、肝、小腸、脾臓を摘出し組織標本を作製して免疫組織化学的染色を行い抗 BrdU 抗体陽性細胞の観察を行った。静脈内投与した細胞の骨創治癒部での局在を知るために、頭頂骨を摘出し10%EDTA液で脱灰後、組織標本を作製した。免疫組織化学的染色の後、骨創治癒部位での抗 BrdU 抗体陽性細胞の局在を観察した。

②静脈内注入前および静脈内注入後の ADSCs の機能発現に関する検討

in-vitro においては、培養 ADSCs の骨形成細胞への分化および老化に関する遺伝子発現の検討を行った。細胞の骨芽細胞への分化能に関しては、BMSC-P2 (継代数2), P8 (継代数8) および ADSCs-P2, -P8 を評価した。骨分化能は骨分化マーカー Runx2, オステオカルシンの発現量を Real-time PCR 法を用いて測定した。各細胞の老化に関しては P16 遺伝子の発現量を解析した。

In-vivo においては、ラット頭頂部に形成した骨欠損部での血管および骨形成に関するタンパク発現を免疫組織学的染色を行い検討した。

【結果】

静脈内投与細胞の肺、肝、骨髄等の組織での分布

小腸にわずかであるが BrdU 陽性細胞を認めたが、肺、肝臓、脾臓には陽性細胞はみられなかった。

静脈内投与後の骨創部での局在の免疫組織化学的評価

静脈内投与後2日目では、骨創周囲には BrdU 陽性細胞はみられなかった。静脈内投与後7日目では、新生骨形成部内部に多数の BrdU 陽性細胞がみられた。陽性細胞は新生骨新生骨内部で骨細胞様および血管腔に局在して血管内皮様であった。新生骨の脳硬膜側表面には骨芽細胞様に陽性細胞が配列する例が見られた。骨欠損部内部には明らかな陽性細胞はみられなかった(写真1,2)。

静脈内注入前および静脈内注入後の ADSCs の機能発現

培養 ADSCs の骨形成細胞への分化および老化に関する遺伝子発現の検討

Runx2 遺伝子の発現では、ADSCs は BMSC と比較して継代を続けても発現量の低下が少ないことが示された。オステオカルシンに関しては骨芽細胞分化誘導培地での培養48時間以内の発現はみられなかった。P16 遺伝子の発現に関しては同じ継代数では BMSC に比較して ADSCs は発現量が多かった。同じ培養条件および継代数では、ADSCs に比較して BMSC は細胞老化しにくいことが示唆された。

骨欠損部での血管および骨形成に関するタンパク発現の検討

ADSCs 静脈内投与1週間後 免疫染色写真

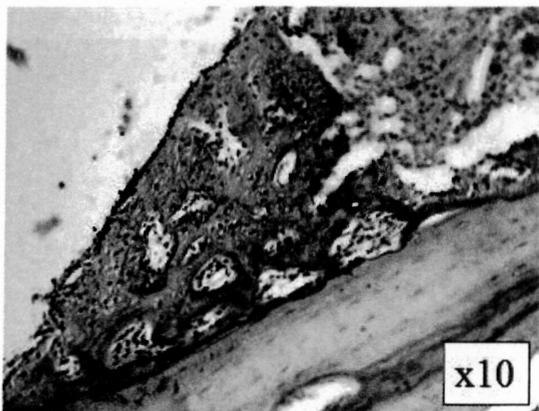


写真1 新生骨形成部のみ多数の抗 BrdU 抗体陽性細胞がみられる。

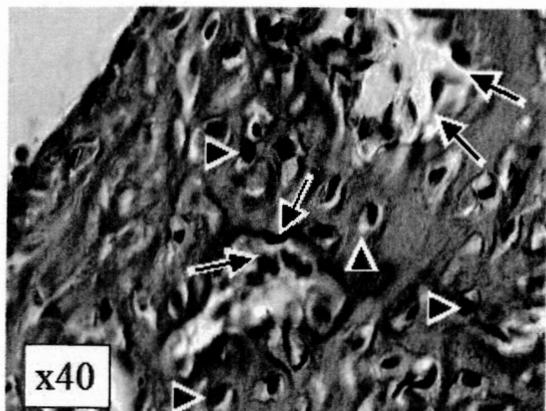


写真2 (拡大像) 矢印は血管壁の陽性細胞を示す。矢頭は新生骨内の陽性細胞を示す。

オステオカルシン、TGF β および PDGF は対照と実験群に差はみられなかった。

【考 察】

今年度は、静脈内投与した ADSCs の骨創部での局在を知り、その機能を明らかにすることを目的に本研究を行った。

ADSCs の静脈内注入が骨創の治癒を促進する機序の一つとして、注入した細胞が骨創に集簇した後、骨形成細胞に分化して機能する可能性があると考えられた。さらに集簇した ADSCs は骨形成の場において、骨形成細胞分化だけでなく血管形成に関与する細胞へも分化することが示唆された。以上から、静脈内投与した ADSCs は骨創部において骨形成のみならず骨創の治癒に関与するあらゆる細胞に分化するなど直接的に作用していると考えられた。近年、移植した細胞によるパラクライン作用に関して報告がなされている。今回の研究では、骨創治癒部でのパラクライン作用に関しては明らかにはできなかった。

今後、本研究の継続により ADSCs を利用した骨再生治療を低侵襲手術および新たな治療法開発に発展させたいと考えている。