

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2014.02) 14巻1号:73～75.

平成23.24年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題
22)脂肪組織由来幹細胞の静脈内投与による骨再生の研究

研究代表者 竹川 政範

22) 脂肪組織由来幹細胞の静脈内投与による骨再生の研究

研究代表者 竹川 政範

【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) が骨形成細胞、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 の静脈内投与は骨創治癒を促進することを明らかにした。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。今回われわれは、静脈内投与した ADSCs の骨創部での局在を明らかにし、さらに ADSCs が骨創部に集簇する機構について検討することを研究目的とした。

【方法】

1. ADSCs 静脈内投与後における骨再生部での局在に関する検討

ラット頭頂骨に骨欠損を形成し、BrdU で標識した F344 ラット由来 ADSCs の静脈内投与を骨欠損形成 3 日目に行った。静脈内投与後の細胞の全身への分布を肺、肝、骨髄等の組織での分布を組織学的に評価した。さらに、静脈内投与後の骨創部での局在を免疫組織化学的に評価した。

2. 静脈内注入前の ADSCs の機能発現に関する検討

in vitro の研究：骨芽細胞分化誘導培地で ADSCs を培養後、ADSCs の骨形成に関する遺伝子発現を Runk2、Osterix、オステオカルシンにより検討した。

3. 静脈内投与を行った ADSCs が骨創治癒部に集簇する機構の検討

in vitro の研究では、ADSCs の PDGF- α および CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) の発現を免疫組織科学的に検討した。In vivo の研究では、骨創部における High mobility group protein 1(HMGB-1) および Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) の発現を免疫組織化学的に検討した。

【結果】

ラット頭頂骨に骨欠損を形成し、BrdU で標識した F344 ラット由来 ADSCs を静脈内投与した後の、肺、肝、骨髄等の組織での ADSCs の分布を免疫組織学的に評価したが、投与後 1 週目には明らかな BrdU 陽性細胞はみられなかった。ADSCs を静脈内投与した後の骨創部での局在を免疫組織化学的に評価したところ、投与後 1 週目には新生骨形成部の骨形成細胞、血管、骨細胞に BrdU 陽性細胞がみられた。ADSCs 静脈内投与後 2 および 4 週目には、BrdU 陽性細胞は新生骨形成部の骨膜細胞および骨細胞にみられたが 1 週目と比較して減少していた。

培養 ADSCs の骨形成に関する遺伝子発現を Runk2、Osterix、オステオカルシンにより検討したところ、骨芽細胞分化誘導培地で培養後早期に Runk2 および Osterix の遺伝子発現の上昇がみられたが、48 時間後でもオステオカルシンの発現はみられなかった。

培養細胞の免疫染色の結果、ADSCs は PDGF- α 陽性、CXCR4 陽性であることが確認された (写真 1a、1b)。

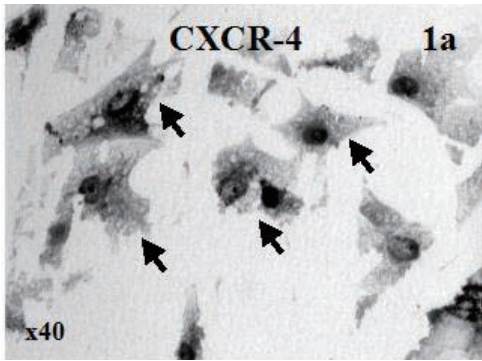


写真 1a 矢印は CXCR4 陽性の ADSCs を示す

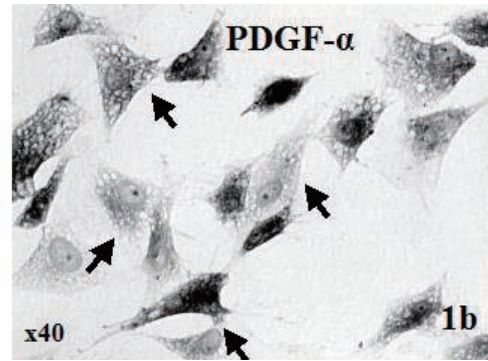


写真 1b 矢印は PDGF- α 陽性の ADSCs を示す

写真 1 ADSCs の免疫組織化学染色

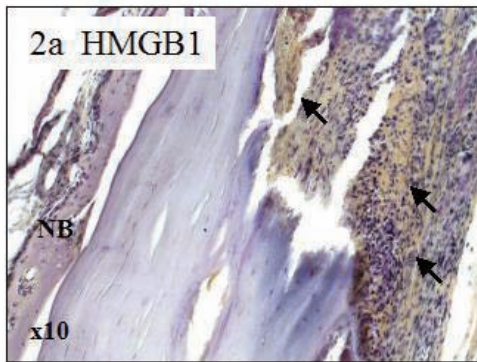


写真 2a 矢印は HMGB1 陽性部をしめす。骨および骨膜には陽性部はみられなかった。NB : 新生骨

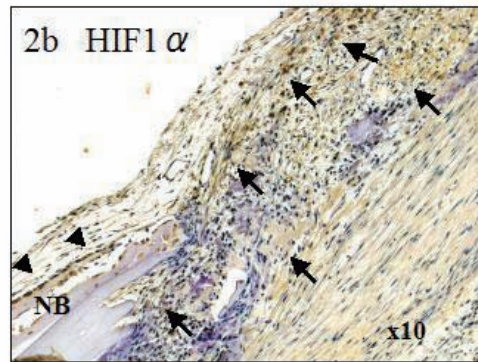


写真 2B 新生骨形成部の骨芽細胞 (矢頭) および骨欠損部 (矢印) に HIF1 α 陽性部がみられた。NB : 新生骨

写真 2 手術後 1 週目 (ADSCs 静脈内投与後 4 日目) の免疫組織化学染色

手術後骨欠損部組織の免疫組織学的観察

手術後 1 週目では、HMGB1 陽性部は骨欠損部にみられた。HIF1 は新生骨形成部の骨芽細胞および骨欠損部に陽性部がみられた (写真 2a、2b)。手術後 2 週目には、HMGB1 は骨欠損部および新生骨周囲骨膜にみられたが、HIF-1 の陽性部はみられなかった。手術後 4 週目には、HMGB1 の陽性部分は新生骨形成部の一部にのみみられた。HIF-1 の陽性部は認めなかった。

[考 察]

本研究の結果から、ADSCs は骨形成細胞に分化する能力を有していること、および静脈内投与を行った ADSCs は骨創部に集まることが明らかとなった。しかし、静脈内投与を行った ADSCs が骨創治癒部に集積する機構については未知な部分が多く、これらが骨創治癒部に集まる機構について明らかにする必要と考

えた。われわれは、静脈内投与を行った ADSCs が骨創治癒部に集まる機構は、創傷治癒部への骨髓由来幹細胞が遊走する機構が関与しているのではないかと仮説を立て、High mobility group protein 1(HMGB-1) と PDGF- α 陽性培養細胞の関連性、および Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) の関与した SDF-1/CXCR4 陽性細胞の関連性について検討を行った。

HMGB1 は多彩な作用を有するタンパク質である。最近、HMGB1 は組織修復において炎症を抑制し、骨髓から組織再生に必要な幹細胞の動員に関与していることが知られている。HMGB1 は組織損傷が生じると局所から分泌され、骨髓から PDGF- α 陽性細胞を動員し損傷部に遊走させる作用に関与していることが報告されている。本研究結果では ADSCs は PDGF- α 陽性培養細胞であること、骨創において HMGB1 が発現していたことから骨創治癒部に ADSCs を集合させる

メカニズムに関与していると考えられた。

低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor、HIF) は細胞に対する酸素供給が不足状態に陥った際に誘導されてくるタンパク質であり、転写因子として機能することが知られている。皮膚および骨などの損傷部位で HIF-1 の発現増強が Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) の発現に関与している事が知られている。また、BMP ゲルを皮下に埋入した骨誘導実験では、埋入後 7 日目のゲルの周囲組織に SDF-1 の遺伝子発現が増強することで骨形成、血管形成を促進させると報告されている。これは、CXCR4 のリガンドである SDF-1 の発現により、CXCR4 陽性細胞が SDF-1 発現部に集積誘導を生じる可能性を示唆したものである。今回の結果から、手術による骨損傷によって HIF-1 の発現が増強し、SDF-1 が局所で発現することで、静脈内投与によって循環している SDF-1 のレセプターを有する CXCR4 陽性の ADSCs が骨創に集まり創傷治癒に関与したと考えられた。以上から、静脈内投与を行った CXCR4 陽性の ADSC は、SDF-1 の発現によって骨損傷部位に遊走した後に骨形成細胞および血管形成細胞へと分化したと考えられた。今回の研究では、静脈内投与を行った ADSCs が骨創部に集まるメカニズムに関して検討を行いその一部を解明する手がかりを得ることができた。しかし、ADSCs の骨形成細胞および血管形成細胞へ分化する直接的作用について研究を進めることはできなかったが、遊走した ADSCs の骨欠損部でのパラクライン作用に関しては明らかではない。今後、静脈内投与により骨創部に集合した ADSCs のパラクライン作用について検討を行う予定である。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。

[文 献]

- 1) 金田安史：体内細胞動員による再生治療 . Drug delivery system. 27, 246-256 (2012)
- 2) Otsuru S, Tamai K et al. Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by CXCR4/SDF1 pathway. Stem Cells. 26, 223-234 (2008)