

# AMCoR

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

旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15,1:80-81.

平成24・25年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 20) 脂肪組織由来幹細胞の静脈内投与による骨再生の研究

吉田 将亜

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。歯科口腔外科学講座では、低侵襲骨再生を目指した細胞移植方法を開発するために、ADSCsの静脈投与が骨創治癒に与える影響についての検討を行っており、これまでADSCsを静脈内投与すると骨欠損部の新生骨形成が旺盛になることを明らかにした。またADSCsの静脈内投与による細胞の骨創局所への分布を検討したところ、新生骨形成部においてADSCsの局在が確認され新生骨形成に直接的に関与していることを明らかにした。さらに投与した細胞は直接的に骨形成や血管形成に関与し骨創治癒を促進していることを示唆する結果を得ている。しかし、静脈内投与したADSCsが骨の障害部位に集簇するメカニズムは依然不明のままである。そのため、静脈内投与したADSCsが骨の障害部位に遊走し集積するメカニズムを解明し、その機能分化を検討することは細胞投与の条件を決定する根拠となると考えられる。そのため、本研究はADSCsを骨再生部へ遊走させる因子を検索し、その関連性を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法】

**研究1**：骨欠損形成部位への幹細胞動員因子の検討  
ラット頭頂骨に骨欠損を形成し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。評価は静脈内投与後1週および2週目に行った。ラット頭頂部に形成した骨欠損部でのHMGB1、SDF-1、HIF-1、PDGFR- $\alpha$ の局在を経時的に免疫組織学的に検討した。コントロールはADSCsの静脈内投与を行わないものとした。

**研究2**：ADSCsの幹細胞動員因子発現に関する検討

培養ADSCsおよび骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)のPDGFR- $\alpha$ 、CXCR4およびSDF-1の免疫組織染色を行った。さらに、培養ADSCsおよびBMSCのCXCR4、SDF-1(CXCL12)の遺伝子発現をRT-PCR法により検討した。

#### 20) 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 吉田 将亜

#### 【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、

#### 【結果】

組織学的検討ではADSCs静脈投与群は対照群と比較して骨欠損形成1週目、2週目において新生骨形成は旺盛であった。骨欠損形成部位への幹細胞動員因子の検討では、HMGB-1は手術後1週目にはADSCs

静脈投与群および対照群とも皮下および骨欠損形成部に陽性部を認めたが両者に差は見られなかった。2週目にはADSCs静脈投与群では陽性部が見られなかったが、対照群では骨欠損部に陽性部が見られた。PDGFR- $\alpha$ 陽性細胞は手術後1週目および2週目にはADSCs静脈投与群および対照群ともに新生骨形成部、骨欠損形成部および皮下に多数見られた。HIF-1に関しては、手術後1週ではADSCs静脈投与群は対照群に比較して骨欠損部の広い範囲で陽性細胞がみられた。手術後2週目には骨欠損部のHIF-1陽性細胞は1週目に比較して多く認められ、ADSCs静脈投与群および対照群に明らかな差はみられなかった。SDF-1に関しては手術後1週目では新生骨形成部および骨欠損形成部の血管周囲に多数の陽性細胞が見られた。2週目ではSDF1陽性細胞は両群ともに骨欠損形成部の血管周囲に認められたが1週目と比較して陽性細胞数は減少していた。CXCR4に関しては手術後1週目には陽性細胞が骨形成部および骨欠損形成部に見られたが対照群はADSCs静脈投与群に比較して陽性細胞数が多数見られた。2週目にはこの傾向はさらに顕著であった。

培養細胞の幹細胞動員因子発現に関する検討では、免疫組織化学ではPDGFR- $\alpha$ およびSDF-1に関してADSCsはBMSCと同様に強陽性に染色されたが、CXCR4ではADSCsはBMSCに比較して弱陽性であった。RT-PCR法ではSDF-1はADSCs、BMSCs同様に発現がみられたが、CXCR4の発現はBMSCsのみにみられた(写真1)。以上の結果からSDF-1はADSCs、BMSCs同様に発現がみられるが、CXCR4の発現は両者で差があることが示された。



写真1 RT-PCRの結果。

Lane 1-4: CXCR4 (99bp). Lane 5-8: SDF-1 (99bp).

Lane 9-12: GAPDH (116bp).

CXCR4の発現はBMSCsのみにみられ(矢印)、SDF-1はADSCs、BMSCs同様に発現がみられた。レーン1, 5, 9はネガティブコントロール。レーンMはDNAマーカーを示す。

## 【考 察】

High mobility group box 1 (HMGB1)は、強いPDGFR- $\alpha$ 陽性骨髄間葉系幹細胞遊走活性を有することが知られている。HMGB1は障害部位や炎症部位で放出されることが知られており損傷組織再生に関与していることが示唆されている。今回の免疫組織化学の結果から、骨創へのADSCsの集簇する機構は、骨創部におけるHMGB1の発現がPDGFR- $\alpha$ 陽性細胞であるADSCsを遊走させたことが示唆された。また、CXCR4のリガンドであるSDF-1は骨折部位での遺伝子発現が高いことが知られており、異所性骨化部位、骨折部や骨再生部位に骨形成前駆細胞(OPC)を集積させ骨芽細胞を供給していることが示唆されている。このOPCは骨髄由来のCXCR4陽性細胞であることが知られている。このことから、ADSCsの静脈内投与においても同様の機構が作用しているのではないかと仮説に基づき研究を行った。しかし、免疫組織化学および遺伝子発現の検討から、静脈内投与を行ったADSCsが骨欠損部に集簇する機序においてCXCR4/SDF-1の関与には疑問が生じる結果となった。SDF-1の受容体であるCXCR4はおもに骨髄に存在する造血幹細胞や末梢血中の白血球において発現が認められることから、今回はBMSCsにその成分が多く含まれていることが影響した可能性が考えられる。

SDF-1/CXCR4システムは血管傷害後の新生内膜形成、血管新生に寄与していることや、CXCR4の発現が亢進された場合に、より効果的に血管新生が誘導されることが明らかになっている。今後は本研究で検討した遺伝子の発現量の検討、CXCR4発現を誘導する因子、また、HIF-1との関連性やPDGF- $\alpha$ 、HMGB-1等について、さらに検討していく必要があると考えられた。

## 【文 献】

- 1) 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)