

AMCoR

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

旭川医科大学研究フォーラム (2016.3) 16:42-45.

平成25・26年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 24) 脂肪組織由来幹細胞を用いた低浸襲細胞治療に関する研究

岡 久美子

24) 脂肪組織由来幹細胞を用いた低侵襲細胞治療に関する研究

研究代表者 岡 久美子

【研究目的】

細胞治療は骨再建・再生を低侵襲・効率的に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。歯科口腔外科学講座ではこれまでに ADSCs の静脈内投与が骨創治癒を促進することを明らかにした。さらにトレーサー実験の結果、静脈内投与した ADSCs が新生骨形成部位に集簇して骨形成細胞や血管などに分化し骨創治癒を促進するという結果を得ている。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明らかにされていない。SDF-1/CXCR4 システムは血管傷害後の新生内膜形成に寄与し、血管新生や血管リモデリングにも寄与していることが報告されている。また、High Mobility Group Box1 (HMGB1) は強い PDGFR α 陽性骨髄間葉系幹細胞遊走活性を有し、障害部位や炎症部位で放出され損傷組織再生に関与していることが示唆されている。本研究ではこれらの幹細胞動員因子についてその ADSCs 静脈内投与による骨創治癒促進との関連性を明らかにすることを目的とし、①骨欠損部位への幹細胞動員因子の同定、② ADSCs の幹細胞動員因子発現の検討を行った。

【方 法】

1. 培養細胞における幹細胞動員因子の発現

In-vitro において培養 ADSCs における SDF-1/CXCR4、

PDGF α 、インテグリン α 、 β の発現を免疫組織化学および RT-PCR で検討した。

1) 細胞培養

F344 ラットの脂肪組織から ADSCs を分離し 10%FBS 添加 DMEM により培養した。80%コンフルエントで継代を行い P2 とした。

2) 免疫組織化学染色

1) で分離した ADSCs を蛍光抗体法および酵素抗体法により染色を行った。

加えて、組織障害部位でのフリーラジカルの細胞への影響を検討するため、ADSCs を H_2O_2 で 24 時間処理後、免疫染色を行った。 H_2O_2 濃度は、10mM、10 μ M とした。

3) 遺伝子発現解析

RNA 抽出

1) で分離した ADSCs から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出、RNase-Free DNase (Qiagen) を用いて DNase を分解した。High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を合成した。

RT-PCR

AmpliTaq Gold[®] 360 Master Mix (Applied Biosystems) を使用し RT-PCR を行った。PCR 産物は 2% アガロースゲルを使用し電気泳動を行った。

2. 骨欠損部位の幹細胞動員因子の発現

In vivo において、ADSCs を静脈内投与したラットの頭頂部へ形成した骨欠損部位のケモカインの局在を検討した。

1) 細胞培養

F344 ラットの脂肪組織から ADSCs を分離し 10%FBS 添加 DMEM により培養した。80%コンフルエントで継代を行い P2 とした。

2) ADSCs の投与

F344 ラット頭頂骨に骨欠損を形成し、3 日後にラット尾静脈から 5×10^5 の ADSCs を投与した。頭頂部に骨欠損を形成するが細胞の静脈内投与は行わないラットを対照とした。

3) 免疫組織化学染色

ADSCs 投与後 4 日後に 4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定し、頭部組織を摘出した。

10%EDTA 液で脱灰後、組織標本を作製、免疫組織化学的染色の手法を用いて骨創治癒部のケモカインの局在を観察した。

4) 遺伝子発現解析

RNA 抽出

ADSCs 投与後 4 日後に組織を採取し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出、1. 2) と同様に cDNA を合成した。

RT-PCR

AmpliTaq Gold[®] 360 Master Mix (Applied Biosystems) を使用し RT-PCR を行い同部位での SDF-1/CXCR4 の遺伝子発現を検討した。組織は骨欠損部位、胸腺、脾臓とした。PCR 産物は 1. 3) と同様に泳動した。

【結 果】

1. 培養細胞における幹細胞動員因子の発現

免疫組織化学的検討

ADSCs には、PDGFR α および SDF-1 が強発現していた。また、CXCR4、インテグリン $\alpha 4$ 、 $\beta 2$ の局在を検討したところ発現が見られた (写真 1)。

H_2O_2 処理後に 24 時間培養した ADSCs では CXCR4 の発現増強が見られた。10 μ M H_2O_2 での処理後に最も発現増強したが、10mM H_2O_2 では細胞死がみられた。

遺伝子発現解析

SDF-1 は異なる継代数の ADSCs において発現が見られた。CXCR4 は BMSCs では前回報告したように発現が見られたが、ADSCs では継代数を変えても発現は明らかでなかった。

2. 骨欠損部位の幹細胞動員因子の発現

免疫組織化学的検討

HMGB1 陽性部が骨欠損形成部周囲に見られ、その範囲は 3 日目に最も広く、その後減少した。HIF-1 および SDF-1 陽性細胞は術後 3 日目に骨欠損周囲の組織に多く見られ、1 週、2 週とその数は減少した。ICAM-1、VCAM-1 陽性部が血管およびその周囲組織に見られた (写真 2)。

遺伝子発現解析

ADSCs の静脈内投与を行ったラットの骨欠損部の組織、胸腺、脾臓において SDF-1、CXCR4

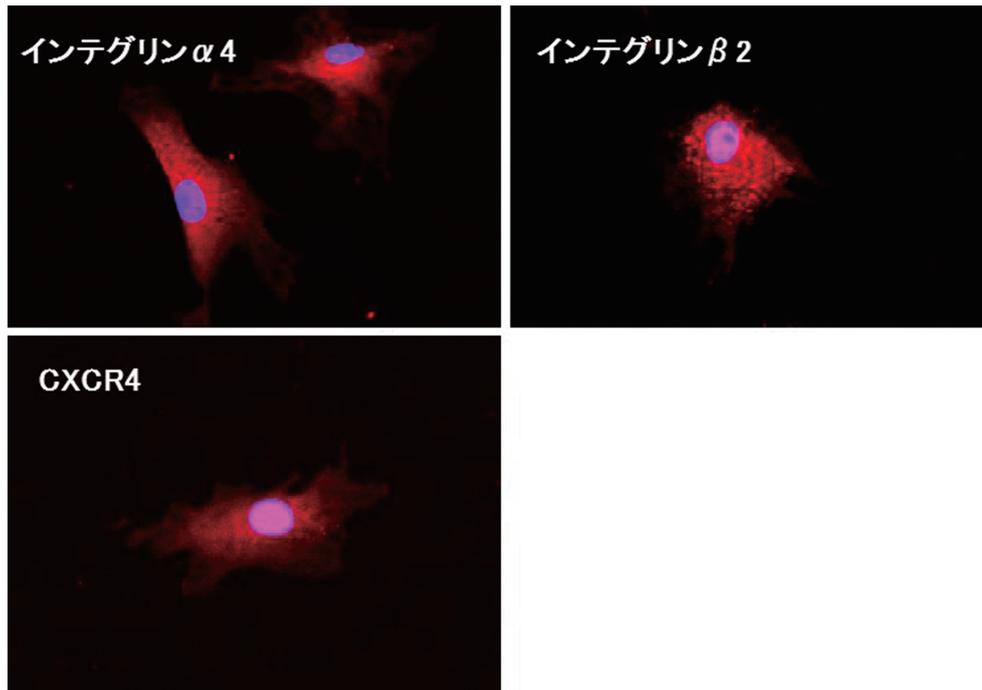


写真1 免疫組織化学

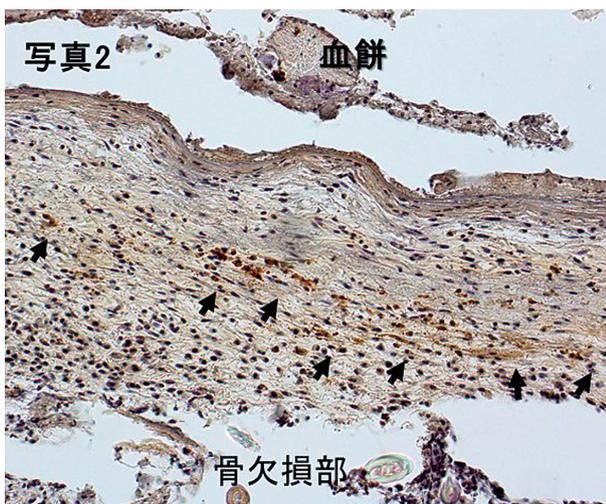


写真2 骨欠損形成後3日目 HIF-1 α の発現(矢印)

は共に発現がみられた(写真3)。

【考 察】

本研究では培養細胞(ADSCs)と、ADSCsを静脈内投与したラットの骨創治癒部における幹細胞動員因子の発現について免疫組織化学的、遺伝子解析を行い検討した。

本研究の結果から、ADSCsには接着因子としてのインテグリン α 4、 β 2が発現しており、骨欠損形成部周囲の血管にICAM-1、VCAM-1の発現が見られるこ

とから、静脈内投与を行ったADSCsがICAM-1、VCAM-1を発現した部位に接着し、血管新生に寄与する可能性も考えられた。

SDF-1、HMGB1は全ての細胞、組織において強発現していたが、CXCR4はADSCsにおいて発現は低下しており、骨創治癒部の組織において発現が見られた。手術などの組織障害を生じた際に生じる低酸素状態や酸化ストレスを模した研究として、培養細胞をH₂O₂処理する方法がある。本研究ではH₂O₂で処理後に培養したADSCsでCXCR4の発現増強が見られた。

SDF-1/CXCR4システムは血管傷害後の新生内膜形成、血管新生に寄与するとされ、CXCR4の発現が亢進された場合にはより効果的に血管新生が誘導される。低酸素下での培養やH₂O₂を用いた前処理により細胞のCXCR4の発現を増強する方法が現在までに報告されている。低酸素下での培養におけるCXCR4の発現増強については、低酸素誘導因子であるHIF-1の関与が考えられている。本研究ではH₂O₂によりCXCR4の発現増強が見られたが、高濃度のH₂O₂ではその効果が見られなかったことから、活性酸素、細胞の酸化ストレスが関与する可能性も考えられた。

今回の結果からはADSCsを静脈内投与した後、組織修復の際にCXCR4の発現が増強することが考えられたが、実際にADSCsに発現しているか、trophic効果

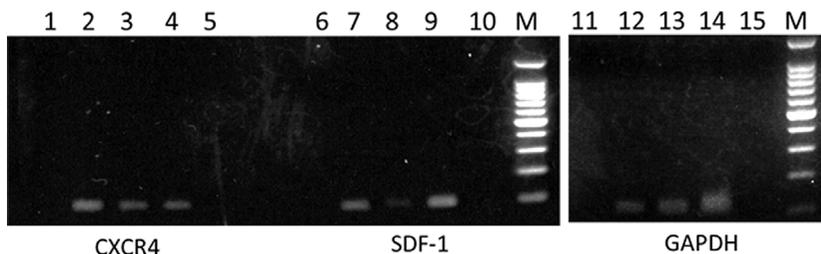


写真3 各組織における遺伝子発現
 1, 6, 11: ネガティブコントロール
 2, 7, 12: 骨欠損部
 3, 8, 13: 胸腺
 4, 9, 14: 脾臓
 5, 10, 15: 小腸

等によるものかは不明である。今後は上記の方法で CXCR4 の発現を増強させた ADSCs を静脈内投与した場合の骨創治癒についても検討したい。

【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)
- 2) 金田安史: 体内細胞動員による再生治療. *Drug delivery system*. 27, 246-256 (2012)
- 3) Tang YL, Zhu W et al.: Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression. *Circ Res*. 104, 1209-1216. (2009)
- 4) Akashi S, Miura T et al.: Superoxide stimulation enhances CXCR4 expression in heart muscle-derived stem cells via ASK1 activation. *Bull Yamaguchi Med Sch*. 60, 11-18. (2013)
- 5) Horiguchi et al.: Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in folliculostellate (FS) cells of the rat anterior pituitary gland: the CXCL12/CXCR4 axis induces interconnection of FS cells. *Endocrinology*. 153, 1717-1724 (2012)