

AMCoR

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

旭川医科大学研究フォーラム (2017) 第17巻:60-62.

平成27年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題16)骨髄(BMSC)及び脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC)を用いた低侵襲治療に関する研究

柴山 尚大

16) 骨髄 (BMSC) 及び脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC)
を用いた低侵襲治療に関する研究

研究代表者 柴山 尚大

【目的】

間葉系幹細胞 (MSC) は、幹細胞を用いた組織再生治療において高い効果が期待されている。特に骨組織再生医療の分野では、再生培養骨を用いた骨再生が盛んに研究されている。

幹細胞源としては、骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) は *in vitro* で分化能および増殖能を示し、骨組織の再生医療だけでなく、様々な分野で臨床試験が進められている。しかし BMSC は骨髄中の有核細胞の 0.01 ~ 0.001% と少なく、幹細胞治療のため十分な細胞数を得るためには多量の骨髄を採取する必要があり、かつその操作は侵襲的である。一方、骨髄組織以外にも多分化能を持った組織幹細胞が存在することが明らかになり、幹細胞の供給源として注目されている。なかでも体重の平均約 20% を占めるといわれる脂肪組織から得られる脂肪組織由来幹細胞 (ADSC) は、比較的非侵襲的かつ簡便に採取でき、多岐にわたる分化能と高い増殖能を備えているといわれている¹⁾。しかし、問題点として、BMSC と ADSC は採取量、採取による生体への侵襲程度が異なり、骨再生医療に利用する上で、細胞数を増殖させるために継代を行う必要がある。その際の BMSC と ADSC の増殖能、骨芽細胞への分化能、さらに癌化など細胞特性の違いについては十分に明らかにされておらず、細胞特性に統一された見解がない^{2),3)}。これらの再生医療に使用する細胞の品質を理解することは、再生医療を容易に、そして効率的に行う上で重要なことと考えられる。今回代表者は BMSC と ADSC の細胞特性を比較検討し低侵襲の骨再生医療の可能性について検討した。

【方法】

骨髄由来及び脂肪由来間葉系幹細胞の採取と培養

F344 ラット (8 週齢・オス) より骨髄および脂肪を採取した。骨髄は大腿骨より両骨端を切除し、培養液を用いて髓腔内の骨髄を洗い出して採取、脂肪組織

は鼠径部より採取し、酵素処理を行った。骨髄及び溶解した脂肪組織を培養し (37°C、5%CO₂)、間葉系幹細胞を増殖させ、コンフルエントとなった後、各細胞を Trypsin/EDTA にて回収し、BMSC-P1、ADSC-P1 を得る。これら細胞を継代培養し、BMSC-P0、P2、P8 及び ADSC-P0、P2、P8 を得た。骨芽細胞への分化はデキサメタゾン、β-グリセロリン酸、アスコルビン酸含有の培養液で14日間培養しアルカリフォスファターゼ染色により陽性を確認した。

細胞の特性に関しては幹細胞のマーカーである CD34 の発現を免疫組織化学により検討した。細胞増殖能の検討は PI 染色により FCM を用いて細胞周期解析と増殖能の評価を行った。骨芽細胞への分化能の検討は runx2、osterix の mRNA 発現を Real-Time PCR を用いて解析した。P16 癌抑制遺伝子発現は mRNA 発現を Real-Time PCR を用いて解析した。

【結果】

1. 細胞特性の比較

幹細胞のマーカーの CD34 陽性細胞は P2、P8 の ADSC で見られた (写真1)。

2. 増殖能の比較

FCM を用いて細胞周期解析と増殖能の比較では、P2 と P8 の両方で BMSC は ADSC より S 期細胞比率が高かった (p < 0.05)。

3. Runx2, osterix 発現量の比較

Runx, osterix 共に同じ継代数では BMSC は ADSC に比較して時間経過により発現量が多かった。

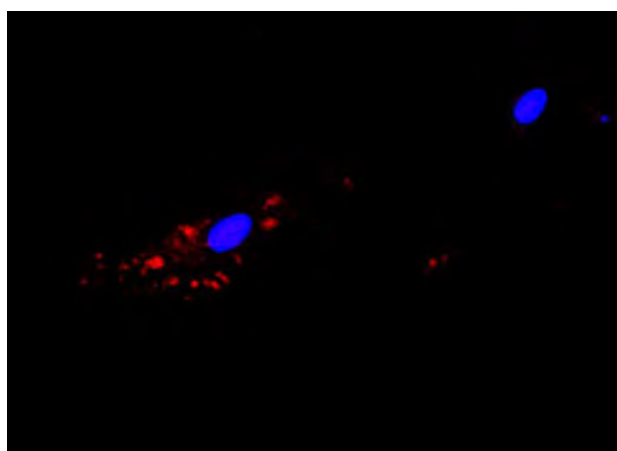


写真1 CD34 免疫染色

ADSCs には CD34 陽性細胞と陰性細胞が見られる。

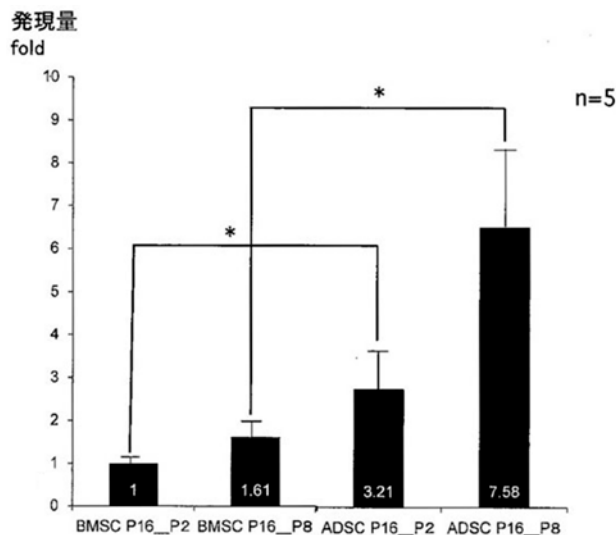


図1 BMSC、ADSCs、P2P8 の p16 発現量の分析

4. P16 遺伝子発現量の比較

同じ継代数では ADSC は BMSC に比較して p16 遺伝子の発現量が高く、癌抑制遺伝子の観点から ADSC の方が癌化のリスクが少ないことが示された (図1)。

【考察】

BMSC と ADSC の増殖能の関しては、同じ継代数では BMSC の増殖能が高かった。これに対して第3継代では ADSC の方が高いとの報告がある。CD34 陽性細胞の結果からも BMSC と ADSC は純粋な細胞集団ではなく、多様な前駆細胞によって構成されていることが他の報告と異なる要因と考えられた。今後 FCM を用いた幹細胞マーカーによる分取等により比較を行う事が、再生医療に使用する細胞の品質の均一化の上で必要と考えられた。

BMSC と ADSC の骨芽細胞への分化能に関しては、BMSC は ADSC に比較して骨芽細胞への分化能が高いことが示された。ADSC は BMSC に比較して大量に採取することが出来る事から比較的少ない継代数で目的の細胞数を確保できる長所を有している。また ADSC はデキサメタゾンにより脂肪に分化しやすいことが知られており、骨芽細胞に分化させる上でその濃度を検討することも必要と考えられた⁴⁾。

癌抑制遺伝子 p16 に関して ADSC の方が癌化のリスクが少ないことが示された。このことから ADSCs は継代を繰り返すことにより細胞数を確保する際には有

用であると考えられた。

【文 献】

- 1) Zuk PA, Zhu M, et al.: Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7 (2), 211-228 (2001).
- 2) Horwitz EM, Le Blanc K, et al.; International Society for Cellular Therapy.: Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7 (5), 393-395 (2005).
- 3) Roura S, Farré J, et al.: Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105+ mesenchymal stem cells. *Eur J Heart Fail* Oct 8 (6), 555-563 (2006).
- 4) 柴山尚大、竹川政範、他: 間様系幹細胞から骨芽細胞への分化段階に応じた分化能、増殖能、癌化についての *in vitro* における検討. *北海道医学雑誌* 91 (1), 31-36 (2016).