

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659940

研究課題名(和文) 立体培養脂肪細胞による骨再生へのチャレンジ

研究課題名(英文) Feasibility of osteogenesis with adipose-derived cells in 3-D culture

研究代表者

黒田 真司 (Shinji, Kuroda)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50323689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：マウス皮下脂肪由来幹細胞(ASC)を細胞表面抗原CD90/105による分取し、骨芽細胞への分化能と細胞特性を比較検討した。DNA マイクロアレイの結果から、特にCD90(+)/105(+)群は高い細胞増殖能・骨芽細胞分化能を示した。次にbmp2をコードしたアデノウイルスを感染させると、CD90(+)/105(+)群において早期の石灰化noduleを確認した。また、培養後にはCD105発現の減少がみられた。以上から、分取したASCには骨芽細胞分化能に違いがあることが明らかとなった。また、CD90およびCD105の発現量が細胞増殖および骨芽細胞分化において重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our study was to exhibit distinct populations of adipose-derived stem cells, termed ASCs, with differing characteristics for osteogenic differentiation. The primary cells from murine subcutaneous adipose tissue were sorted for CD90 and CD105. Each cell population sorted for CD90 and CD105 was analyzed for osteogenic potency after cell culture. The osteogenic potency of ASCs was similar to BMSCs according to microarray analysis. In addition, ASCs stimulated comparable mineralized nodule formation as BMSCs. Furthermore, the results suggest that ASCs exhibit distinct populations with differing characteristics for osteogenic differentiation: CD90(+)/105(+) ASCs were particularly osteogenic. Viral transduction for BMP2 stimulated the formation of mineralized nodules especially in CD90(+)/105(+) ASCs; however, all populations exhibited rapid decrease in CD105 expression. Importance of CD90/105 for cell proliferation and osteoblast differentiation was suggested.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔顎顔面再建外科学 脂肪由来幹細胞 骨芽細胞分化

1. 研究開始当初の背景

整形外科、歯科領域では、先天性あるいは後天性の骨欠損に対して人工関節や骨補填材を用いた置換・移植手術で修復することで機能・審美を回復しているが、自己の細胞を用いた再生技術は研究段階である。元来、生物を構成する種々の細胞に分化し得る分化万能性は、胚盤胞期の胚の一部である内部細胞塊や、そこから培養された ES 細胞、及び ES 細胞と体細胞の融合細胞、一部の生殖細胞由来の培養細胞のみに見られる特殊能力であったが、iPS 細胞樹立法の開発により、体細胞から万能細胞を単離培養することが可能となった。本研究費応募者の黒田真司は、骨形成・骨再生を目的とした研究を行っており、H13-14 年度奨励研究(A)では、骨髓細胞の立体培養と遺伝子導入を組み合わせることによって、ラット皮下における異所性の骨形成を得た。また、H17-19 年度若手研究(A)では、ヒト歯槽骨骨膜より分離培養した骨膜細胞を、遺伝子導入によって骨芽細胞に分化させ、立体培養後のラット皮下への移植において異所性の骨形成の可能性が示唆された。これらの結果から、骨周囲組織由来の細胞が骨芽細胞へ分化することが明らかとなった。ところで、これまでに成熟脂肪細胞を脱分化することによって、骨芽細胞への分化能を持つことが報告され、また、脂肪組織に含まれる幹細胞の骨芽細胞への分化も報告されている。皮下脂肪は技術的に採取が容易であり、患者への外科的侵襲が極めて小さい。脂肪由来幹細胞、脂肪細胞の平面天井培養による脱分化、さらに遺伝子導入を応用した、立体スキャフォールドによる骨再生のコンストラクトを開発することで、移植までの工程を短く簡便にできる。また、培養脂肪細胞と共存する幹細胞も同時に立体培養され、骨芽細胞への効率のよい分化誘導と骨再生が期待できる。

2. 研究の目的

【全体構想】

幹細胞に関する研究の躍進は甚だしく、特に体細胞から初期化によって得られる iPS 細胞は、任意の細胞へと分化誘導されることから、組織再生医学あるいは再生医療においても非常に画期的である。ところでそれぞれの組織にはその前駆体や未分化な細胞が含まれており、それらを特定の細胞へ分化誘導する場合、必ずしも初期化を必要としない。そこで採取が容易な組織・細胞を利用する任意の細胞および組織再生の可能性を研究する。

【目的】

脂肪組織から骨芽細胞を分化誘導し、骨欠損に対する骨再生を試みる。

3. 研究の方法

本研究は東京医科歯科大学実験動物委員会の承認(承認番号 0130286A)および遺伝子組換え生物等実験の承認(承認番号 2013-050A)を得て行われた。

ASC と BMSC の単離

ASC は 8 週齢 ICR メスマウスの皮下脂肪組織をコラゲナーゼ処理後、遠心分離で得たペレットとして単離し、BMSC は同じマウスの大腿骨からフラッシュアウトにより獲得した。10%FBS、1% 抗生剤を含む DMEM にて、それぞれ培養を行った。

フローサイトメトリー

Passage2 (P2) まで培養した ASC を回収後、抗 CD90 抗体および抗 CD105 抗体を用いて、FACS Aria Cell Sorter にて CD90(-)/CD105(-)、CD90(+)/CD105(-)、CD90(-)/CD105(+)、CD90(+)/CD105(+)) に分類した。

DNA マイクロアレイ

分取した ASC のそれぞれの細胞集団と、分取していない ASC および BMSC から、TRIZOL を用いて RNA を抽出し、DNA マイクロアレイで 34102 遺伝子の発現を解析・比較した。マイクロアレイデータから骨芽細胞や破骨細胞の形成、細胞接着、細胞増殖などに関する遺伝子群と、Tgf-、Wnt、Hedgehog などのシグナリングに含まれる合計 1456 遺伝子を抽出してヒートマップを作製し、クラスタリング解析を行った。

アデノウイルス作製

Adeno-X Adenoviral System 3 を使用して human bmp2 cDNA を、CAG プロモーターを搭載したアデノウイルスベクターに導入し、bmp2 を発現するアデノウイルス AdenoX-bmp2 を作製した。

細胞培養と骨芽細胞分化能の解析

分取した ASC のそれぞれの細胞集団と、分取していない ASC に AdenoX-bmp2 を感染させて骨芽細胞誘導培地にて培養し、ウイルスを感染させていないそれぞれの細胞集団と、骨芽細胞分化能を比較した。培養 1 週間目で ALP 染色、ALP 活性測定、総蛋白質量測定を行った。培養 2 週間目では Alizarin red 染色を行い、骨芽細胞のマーカー遺伝子(オステオカルシン、コラーゲン typeI)の発現を PCR にて解析した。

細胞表面抗原の発現パターンの解析

AdenoX-bmp2 +/- の条件下で 2 週間培養したそれぞれの分取 ASC の細胞表面抗原の表現型の変化をフローサイトメトリーにて確認し、比較した。

4. 研究成果

【結果】

細胞増殖

ASCは脂肪組織から単離して10cmディッシュに播種後72hでコンフルエントに達した。一方、BMSCは同様に10cmディッシュに播種後、コンフルエントに達するのに10日を要し、BMSCに比較してASCの増殖能が高いことが分かった。分取ASCではCD90(-)/CD105(+)¹の増殖速度が最も早く、CD90(-)/CD105(-)²は最も増殖速度が遅かった。またBMSCはどのASC集団よりも増殖速度が遅かった。

DNAマイクロアレイ

BMSCとASCおよび分取ASCにおける34,102遺伝子の発現を比較した結果、骨芽細胞分化に關与する遺伝子群の発現量は、CD90(+)/CD105(-)¹およびCD90(+)/CD105(+)²で高く、細胞接着に關与する遺伝子発現は、CD90(+)/CD105(-)¹、CD90(+)/CD105(+)²、BMSCで高く、CD90(-)/CD105(-)²で低かった。Wntファミリーや細胞増殖に關与する遺伝子群の発現は、CD90(+)/CD105(+)²で最も高く、CD90(+)/CD105(-)¹やBMSCでは低かった。幹細胞マーカーであるNanogとSox2の発現はCD90(+)/CD105(+)²で顕著に認められた。

ALP活性

CD90を発現するASCとBMSCではBMP2の導入の有無にかかわらず、培養1週間で高いALP活性を呈した。

Alizarin Red染色

2週間の培養後、CD90(+)/CD105(+)²ではBMP2導入による顕著な石灰化亢進が見られたが、分取していないASCではBMP2によって変化は生じず、CD90(-)/CD105(-)²において石灰化は見られなかった。また、BMSCにおいてはBMP2の導入により、nodule形成が阻害された。

フローサイトメトリー

全ての分取ASC細胞集団において、増殖培地で2週間培養した場合、CD90、CD105共に発現が増強され、逆に骨芽細胞分化培地とBMP2の導入では、CD90の発現に変化は生じず、CD105の発現が阻害された。

RT-PCR

オステオカルシンの発現はBMP2を導入したCD90(+)/CD105(-)¹、CD90(-)/CD105(+)²、CD90(+)/CD105(+)²で見られ、コラーゲンtypeIの発現は、BMP2を導入したCD90(-)/CD105(+)²、CD90(+)/CD105(+)²で見られた。

【考察】

今回の結果より、CD90(+)/CD105(-)¹およびCD90(+)/CD105(+)²は強い骨芽細胞分化能を持ち、培養により石灰化noduleを形成したが、CD90(-)/CD105(+)²は増殖が優位であった。そして、CD90(-)/CD105(-)²では増殖も低く、骨芽細胞分化能も低いため、石灰化noduleの形成は見られなかった。すなわち、CD90、CD105はともにMSCのマーカーとして認識されているが、CD90は骨芽細胞への分化に關与

し、CD105は増殖に關与することが示唆された。この結果はマイクロアレイによる遺伝子発現の解析からも裏付けられ、CD90を表面抗原として持つものがより高い骨芽細胞分化能を持つと考えられた。

CD90(+)/CD105(+)²では、培養前の遺伝子発現において、増殖・骨芽細胞分化に關与する遺伝子の発現がどちらも高く、初期の細胞増殖が活発であるため、分化誘導によって分化が優位になっても細胞数に影響せず、石灰化noduleの形成量が多かったと考えられた。

また、フローサイトメトリーの結果より、培地の組成や遺伝子導入によって細胞の性質が変化することで表面抗原のプロファイルが変化することが明らかとなり、増殖培地で培養を行うとCD105の発現が増加し、反対に骨芽細胞分化誘導培地で培養すると、CD105の発現が低下し、CD90の発現が増加することがわかった。このことから、CD90(+)/CD105(+)²の細胞集団として分取したものを骨芽細胞誘導培地で培養し、BMP2のシグナリングを与えることで、CD105を持つ細胞の強い増殖能により初期に増加した細胞の免疫表現型が分化誘導によって変化し、CD90を持つようになり、一斉に骨芽細胞分化に向かったものと考えられた。

BMSCは骨芽細胞への分化誘導が確立された幹細胞であるが、今回の結果から、ASCに比較して増殖能が低く、遺伝子発現においても、細胞増殖に關与する遺伝子発現や幹細胞マーカー遺伝子の発現はASCに比較して低い傾向にあった。またCD90(+)²のASCとBMSCの、骨芽細胞分化関連遺伝子群の発現を比較してみると、ほぼ同等であった。このことから、骨再生におけるASCの有用性が示唆された。さらに今回のフローサイトメトリーの結果から、ASCは、CD90(-)/CD105(-)²が殆どを占めることが示され、分化目的に応じた表面抗原による細胞分取の重要性が明らかとなった。

また、本研究計画の一つであった立体細胞培養については、異なる細胞を用いた別の研究においてすでに論文発表しているものの、今回の研究においては、研究期間内に結果を集積することが出来なかった。

【結論】

ASCの骨芽細胞分化能は、石灰化noduleの形成および遺伝子発現において、BMSCと同等であることが示された。ASCの細胞集団のうち、骨芽細胞分化能が最も高いのはCD90(+)/CD105(-)¹であると考えられた。CD90(+)/CD105(+)²ではBMP2のシグナルによる分化誘導によってCD105の発現が阻害され、CD90発現が増加したことで、強い石灰化noduleの形成が起こったと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. 黒田真司, 中田秀美. 骨再生と幹細胞.
Journal of Biointegration. 2(1):
165-170, 2012

〔学会発表〕(計 8 件)

1. H Nakata, M Yamamoto, Y Kim, M Miyasaka, T Nagayama, S Kasugai, S Kuroda. A trial of three-dimensional bone regeneration by adipose-derived spheroids, in vitro. The Annual Meeting of the Academy of Osseointegration. Seattle, WA, USA. 3/06-08, 2014
2. Kuroda S, Nakata H, Hao J, Kasugai S. Interference of PPAR γ and acceleration of Osterix for osteoblast induction in adipocyte. The Annual Meeting of the Academy of Osseointegration. Seattle, WA, USA. 3/06-08, 2014
3. 中田秀美, 山本麻衣子, 永山友子, 春日井昇平, 黒田真司. 脂肪由来スフェロイドの三次元的分化誘導による骨再生の試み. 日本口腔インプラント学会第 43 回年次学術大会. 博多 9/13-15, 2013
4. 山本麻衣子, 中田秀美, 春日井昇平, 黒田真司. CD90, CD105 陽性脂肪組織由来幹細胞の骨芽細胞分化への可能性. 日本口腔インプラント学会第 43 回年次学術大会. 博多 9/13-15, 2013
5. 黒田真司, 中田秀美, 山本麻衣子, 春日井昇平. PPAR 制御および Osterix 強制発現による, 未分化ラット白色脂肪細胞の骨芽細胞分化誘導の可能性. 日本口腔インプラント学会第 43 回年次学術大会. 博多 9/13-15, 2013
6. 山本麻衣子, 中田秀美, 則武加奈子, 春日井昇平, 黒田真司. CD90 陽性脂肪組織由来幹細胞の骨芽細胞分化の可能性. 日本歯科骨粗鬆症研究会 第 11 回学術大会・総会. 東京 3/02/2013.
7. 山本麻衣子, 中田秀美, 則武加奈子, 春日井昇平, 黒田真司. CD90 陽性脂肪組織由来幹細胞の骨芽細胞分化の可能性. 日本炎症・再生医学会 第 33 回学術大会. 北九州 7/05-06/2012.
8. Nakata H, Hao J, Yamamoto M, Noritake K, Takafuji K, Kasugai S, Kuroda S. Modification of culture into osteogenic differentiation from subcutaneous adipose-derived stem cells in vitro. . EAO Annual Meeting, Athens, Greece. October 12-15, 2011.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 真司 (Shinji Kuroda)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号: 50323689

(2) 研究分担者

中田 秀美 (Nakata Hidemi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・非常勤講師
研究者番号: 30451967

春日井 昇平 (Shohei Kasugai)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号: 70161049

(3) 連携研究者

()

研究者番号: