

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790664

研究課題名(和文) 骨髄中成熟脂肪細胞を利用した骨粗鬆症・再生不良性貧血に対する細胞治療

研究課題名(英文) Bone-marrow adipocytes as a new cell source for cell therapy in osteoporosis and aplastic anemia

研究代表者

風間 智彦 (kazama, tomohiko)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：80525668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：人工関節置換術を行なう患者の骨髄液より調製したBM-DFATでは、骨関連遺伝子はBM-MSCと同程度発現し、骨誘導前よりALP活性が高く、誘導2週間後でカルシウム沈着を認めた。マウス骨折モデルにBM-DFATを移植した結果、control群の骨密度と比較して有意に高い値を示した。

再生不良性貧血患者の骨髄液より調製したBM-DFATは、BM-MSCと比較してSDF-1のmRNA量ならびに蛋白濃度は有意に高かった。ヒト臍帯血生着不全モデルマウスにBM-DFATとヒト臍帯血CD34+細胞を同時移植した結果、移植後の骨髄中にヒト血液細胞分画を検出し、BM-DFATのヒト臍帯血生着作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In BM-DFAT prepared from bone marrow fluid from patients undergoing implant arthroplasty, osteogenic-specific genes were expressed equivalently in BM-MSC prepared from same donor. Alkaline phosphatase was strongly expressed before and during osteogenic differentiation induction, and mineralized matrix aggregates were observed after 2 weeks of differentiation induction by staining for alizarin red S. In a mouse bone fracture model, bone density in BM-DFAT grafts were significantly higher compared with those in control grafts.

In BM-DFAT prepared from bone marrow fluid from patients with aplastic anemia, proteins and mRNA levels for SDF-1 were significantly higher than BM-MSC prepared from same donor. Implantation of these BM-DFAT and human umbilical cord blood (UCB) CD34+ cells into a NOD/SCID mouse model of graft failure of human UCB resulted in a detection of human blood cell fractions. These results indicated BM-DFAT possess the promoting effects of engraftment of human UCB.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、内科学一般(含心身医学)

キーワード：DFAT 脱分化 骨髄中間葉系幹細胞 骨粗鬆症 再生不良性貧血

1. 研究開始当初の背景

近年、骨髄の間質細胞より得られる間葉系幹細胞 (BM-MSC) が高い増殖能力と多分化能を有することが明らかにされ、骨、軟骨、血管、心筋などの再生を目的とする細胞治療の臨床試験が開始されている。BM-MSC を用いた再生医療は ES 細胞などと異なり、自己細胞から不全臓器を根治できる可能性を秘めていることから大きな期待がかけられている。しかしながら、BM-MSC には、(1) 骨髄に 0.1 ~ 0.01% と微量に存在する細胞を付着培養して得られる細胞集団であるため、他細胞の混入が避けられない。(2) すでに骨髄機能が低下している高齢者や骨髄が未発達の小児では、骨髄採取が困難であることや幹細胞数が極端に少ないため、必要な細胞数を調製できない。といった問題点がある (Zuk PA et al. *Tissue Eng*, 2001, Tholpady SS et al. *Clin Plast Surg*, 2006)。再生医療を万人に適用できる一般的な治療方法にするためには、簡便かつ純度の高い細胞を大量調製できることが望まれる。

我々の研究グループでは、成熟脂肪細胞を体外で脱分化して得られる脱分化脂肪細胞 (DFAT) が高い増殖能と間葉系幹細胞と同等の多分化能を有することを明らかにした (Matsumoto T et al. *J Cell Physiol*, 2008, Kazama T et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009)。また、骨髄中に存在する成熟脂肪細胞より調製した DFAT (BM-DFAT) (図 1) が BM-MSC と非常に類似した表面抗原発現パターンを示すことや (図 2) DNA マイクロアレイを用いた解析により遺伝子発現パターンが非常に類似していることを明らかにしている。DFAT は成熟脂肪細胞から高効率 (約 40%) かつ異種細胞の混入なく調製できるため、非常に少ない組織量 (約 1g) から必要細胞数を調製できる。

現在、BM-MSC は、間葉系組織に対する再生医療や、免疫制御能を利用した細胞治療、骨髄ストローマの再構築など、広い疾患分野において臨床応用が開始されている。一方で、BM-MSC を含む骨髄ストローマに退縮や変性といった問題が起こるために、BM-MSC の調製が困難となり、細胞治療が行えない病態も存在する。その代表的なものとして、高齢者などに頻発する骨粗鬆症や、再生不良性貧血といった病態がある。骨粗鬆症患者は、しばしば難治性骨折を起こし、寝たきりの大きな原因となる。自己修復能が著しく低下していることから、BM-MSC を用いた骨再生治療の適応になるが、調製が困難である上に、老化したドナー BM-MSC は何らかの理由で骨分化能が低下している可能性が指摘されている (Jinhui S et al. *Scientific Reports*, 2011)。再生不良性貧血は、薬物療法不応例では骨髄移植が行われるが、骨髄ストローマが障害をうけており、骨髄が脂肪髓化しているため、しばしば生着不全が問題となる。BM-MSC を同時移植することにより生着不全

が回避できることが報告されている (Fang B et al. *Pediatr Transplant*, 2009) が、患者自身の BM-MSC を調製・移植することは非常に困難であるため、このような臨床研究は、第三者の BM-MSC を用いて行われているのが現状である。どちらの疾患も、BM-MSC を含む骨髄ストローマ細胞の減少が生じる一方、骨髄中の脂肪細胞の増加が認められる。このような患者からは、BM-MSC の調製は難しいが、BM-DFAT の調製は容易にできることを申請者らはすでに確認している (図 3)。このように BM-DFAT は、自家 BM-MSC 細胞治療が困難な疾患に対する新しい細胞治療用細胞ソースとして期待できる。

2. 研究の目的

骨粗鬆症患者から調製した BM-DFAT における骨分化能や大腿骨骨折モデル動物に対する移植効果などを検討する。また、再生不良性貧血患者から調製した BM-DFAT における造血幹細胞に対するストローマ細胞としての機能やヒト臍帯血 CD34+細胞の生着促進作用を検討する。これらの実験を通じて、BM-DFAT における骨芽細胞や造血ニッチ細胞としての機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BM-DFAT の *in vitro* における骨関連遺伝子やタンパク質発現状況の解析

骨粗鬆症に伴う大腿骨頸部骨折に対する人工関節置換術を行なう患者から廃棄予定の骨組織の提供を受け、骨髄液から成熟脂肪細胞とストローマ細胞を分離し、それぞれ BM-DFAT と BM-MSC を調製した。各細胞を 30mm ディッシュに播種し、コンフルエントになるまで培養した。次に、骨分化誘導培地 (10% FBS, 100 nM デキサメタゾン, 10 mM β -グリセロリン酸, L-アスコルビン酸を含有した DMEM) に交換し、3 週間培養した。培養液の交換は 3 日毎に施行し、1 週間毎に骨分化能を評価した。骨関連遺伝子発現の解析遺伝子は、RUNX2、アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステリックス (Ox) そしてオステオカルシン (OC) の mRNA 発現を測定する。mRNA 発現は、SYBR Green を用いたリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR 法) にて評価した。内部標準遺伝子には Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。遺伝子発現の比較は、GAPDH に対する相対的定量解析 (comparative Ct 法) によって行なった。

骨細胞分化の指標である酵素活性である ALP 活性は、PBS で洗浄後、4% パラホルムアルデヒドにて固定を行ない、0.16% naphthol AS-TR phosphate, 0.8% Fast Blue BB 含有 0.1 M Tris buffer (pH 9.0) を用いて 37 °C、1 時間染色した。カルシウムの沈着を検出するために細胞を 4% パラホルムアルデヒドにて固定後、1% アリザリンレッド S

溶液を室温にて3分間作用させ、染色を行なった。

(2) BM-DFAT の造血幹細胞維持因子ならびにホーミング関連因子の遺伝子・タンパク質発現の解析

再生不良性貧血患者の骨髓検査時に採取される骨髓液の一部より、成熟脂肪細胞とストローマ細胞を分離し、それぞれ BM-DFAT と BM-MSC を調製した。BM-DFAT ならびに BM-MSC から Total RNA を抽出し、解析遺伝子として、造血幹細胞維持因子である Jagged-1, Ang-1 および N-カドヘリンならびにホーミング関連因子の SDF-1 の mRNA 発現を測定した。mRNA 発現は、SYBR Green を用いたリアルタイム RT-PCR 法にて評価する。内部標準遺伝子には GAPDH を用いた。遺伝子発現の比較は、GAPDH に対する相対的定量解析 (comparative Ct 法) によって行なった。

ホーミング関連因子である SDF-1 は分泌型タンパク質であるため、BM-DFAT ならびに BM-MSC 培養上清のタンパク質濃度は各細胞の培養上清を回収し、SDF-1 の蛋白濃度を ELISA 法で測定を行なった。

(3) BM-DFAT のヒト臍帯血 CD34⁺細胞との共培養システムを用いた造血幹細胞増殖・維持能の解析

ヒト臍帯血 CD34⁺細胞の共培養は Tsuji ら (Tsuji T et al. Leukemia, 1999, Kawada H et al, Exp Hematol, 1999) の方法を改変して行なった。再生不良性貧血患者より調製した BM-DFAT ならびに BM-MSC を 6well プレートに播種し、コンフルエント (1×10^5 /well) まで培養した。これらの細胞をフィーダーとして、ヒト臍帯血 CD34⁺細胞 (1×10^5 cells/ml) と 10 日間共培養を行なった。造血幹細胞を増殖維持するための培地として 20 ng/ml インターロイキン-3 と 50 ng/ml Stem Cell Factor を添加した Myelocult H5100 (12.5% HS, 12.5% FBS, 10^{-4} M 2-メルカプトエタノールを含有した MEM) を用いた。共培養後、非附着性のヒト臍帯血細胞を回収し、血球計算盤を用いて細胞数を計測し、共培養前の細胞数に対す増殖倍率を算出した。さらに共培養後のヒト臍帯血細胞の細胞表面マーカーをフローサイトメトリーを用いて解析した。

フローサイトメトリーによる解析は、回収した非附着性細胞に Phycoerythrin (PE) 標識抗ヒト CD34 モノクローナル抗体と Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト CD38 モノクローナル抗体を加え、30 分間暗所に冷置 (4) し染色を行なった。FACSCalibur フローサイトメーターを用いて細胞表面抗原の測定を行ない、陰性コントロールサンプルの蛍光シグナルと比較を行なうことで各細胞表面抗原マーカー陽性率を計測した。陰性コントロールとして、FITC 標識、PE 標識マウス IgG1 抗体を用いて同様の

処置を行なったものを用いた。ヒト臍帯血 CD34⁺細胞は、ヒト臍帯血単核球より磁気ビーズ法を用いて分離、調整した。磁気ビーズ法は CD34 MicroBeads Kit と Positive selection 用分離カラムを用い、キット付属のマニュアルに従って、CD34⁺細胞を分離、調整したものを用いた。より純度の高い CD34⁺細胞分画を回収するため、分離操作は 2 回行なうものとした。分離した CD34⁺細胞は液体窒素タンク内に保存し、実験直前に解凍して実験に使用した。ヒト臍帯血を使用するすべての実験は、日本大学医学部臨床研究審査委員会および、東京臍帯血バンク倫理委員会にて承認を受けた後、実施するものとした。

4. 研究成果

(1) 骨粗鬆症に伴う大腿骨頸部骨折に対する人工関節置換術を行なう患者の骨髓液の一部より BM-DFAT と BM-MSC を調製した。骨分化誘導培地で 3 週間培養し、骨関連遺伝子の mRNA 発現を定量化した結果、BM-MSC と BM-DFAT において骨関連遺伝子が同程度発現しており、骨分化誘導とともに発現量が増加した。骨細胞分化の指標である ALP 活性は、BM-MSC と BM-DFAT では骨分化誘導前から高く、骨分化誘導とともに活性が高まり、誘導 2 週間後においてアリザリンレッド S 染色陽性のカルシウム沈着を認めた (図 1)。マウス骨折モデルに BM-DFAT ならびに BM-MSC をペプチドハイドロゲルと混合し骨折部に移植し、MicroCT による骨構造解析を行った結果、ペプチドハイドロゲルのみを移植した control 群の骨密度と比較して、BM-DFAT 群ならびに BM-MSC 群で有意に高い値を示した。

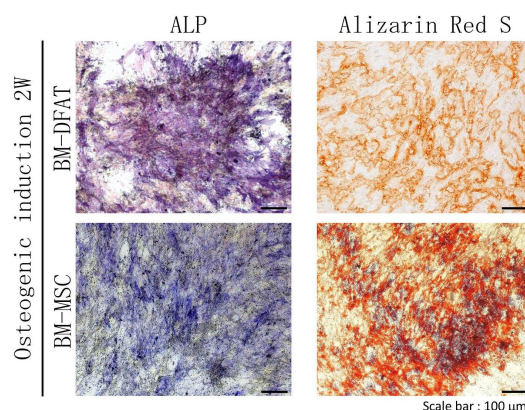


図 1 : 骨細胞分化誘導後の BM-DFAT

(2) 再生不良性貧血患者の骨髓検査時に採取される骨髓液の一部より BM-DFAT と BM-MSC を調製した。造血幹細胞維持因子やホーミング関連因子の mRNA 量ならびに培養上清中の SDF-1 蛋白濃度を定量化した結果、BM-MSC と比較して BM-DFAT において SDF-1 の mRNA 量ならびに蛋白濃度が有意に高かった (図 2)。ヒト臍帯血生着不全モデルマウスに BM-DFAT とヒト臍帯血 CD34⁺細胞を同時移植し、移植後の末梢血中のヒト血液細胞 (hCD45⁺) なら

びに骨髓細胞中のヒト血液細胞の各分画を FACS にて解析した結果、移植 12 週後の末梢血ならびに骨髓において、ヒト CD45⁺細胞を検出するとともに、骨髓中に造血幹細胞分画を含むヒト血液細胞分画を検出し、ヒト臍帯血と DFAT の同時移植によるヒト臍帯血の生着作用を明らかにした。

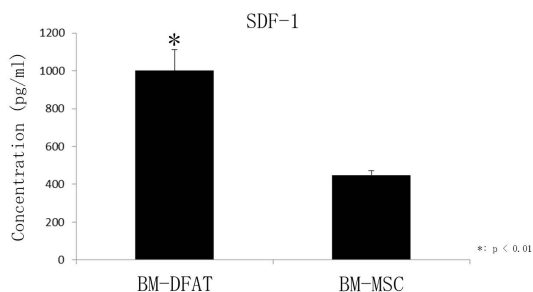


図 2 : BM-DFAT における培養上清中の SDF-1 濃度

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 2 件)

(1) Kono S, Kazama T, Kano K, Harada K, Uechi M, Matsumoto T. Phenotypic and functional properties of feline dedifferentiated fat cells and adipose-derived stem cells. The Veterinary Journal. 2014; 199(1):88-96. 査読有.
doi: 10.1016/j.tvjl.2013.10.033.

(2) Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, Kazama M, Kano K, Ryu J, Tokuhashi Y, Matsumoto T. Osteogenic effects of dedifferentiated fat (DFAT) cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy (OVX)-induced osteoporosis. Tissue Engineering Part A. 2013;19(15-16): 1792-1802. 査読有.
doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0380.

[学会発表] (計 1 件)

(1) 風間智彦、菊田晋祐、田中伸明、風間美奈子、徳橋泰明、加野浩一郎、松本太郎 . 骨欠損および骨粗鬆症に対する脱分化脂肪細胞 (DFAT) 自家移植の効果 第 13 回日本再生医療学会総会 2014 年 3 月 4 日 ~ 3 月 6 日 国立京都国際会館 (京都)

[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

風間 智彦 (KAZAMA, tomohiko)
日本大学・医学部・助手
研究者番号 : 80525668