

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461595

研究課題名(和文) 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた骨髄再生の研究・人工骨髄の作成をめざして

研究課題名(英文) Analysis of Regenerated Bone Marrow by Adipose-derived stromal cells grown on a hydroxyapatite scaffold

研究代表者

植田 高弘 (UEDA, TAKAHIRO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20322505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス脂肪由来間葉系細胞を用い作成した人工骨髄が、免疫不全マウスであるNODマウスの皮下で、造血細胞の長期維持が可能であること確認し骨髄ニッチを提供する能力を有することを示した。また、脂肪由来間葉系幹細胞の抗炎症効果の確認のため冠動脈血管炎モデルマウスを用いて検証したところ、炎症性サイトカインの抑制や血管炎の面積の減少など抗炎症効果や免疫調節機能があることが確認できており、今後の骨髄再構築の機序の解明に役立つデータが得られている。

研究成果の概要(英文)：Regenerated bone marrow created using mouse adipose-derived mesenchymal cells (ADSC) was confirmed to be able to maintain long-term hematopoietic cells subcutaneously in NOD immunodeficient mice and was demonstrated to have the ability to provide bone marrow niches. Moreover, the results of an investigation using a murine model of coronary vasculitis to confirm the anti-inflammatory effect of murine ADSC revealed anti-inflammatory effects and immune regulatory functions such as inhibition of inflammatory cytokines and reduction of the area of vasculitis; data useful for future elucidation of the mechanism of bone marrow reconstruction were obtained.

研究分野：小児血液

キーワード：間葉系幹細胞 脂肪由来間葉系幹細胞 人工骨髄 造血幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

細胞療法としての幹細胞治療の分野では従来骨髄由来間葉系幹細胞が多くの研究に用いられてきた。しかし臨床応用を考えた場合、大量の骨髄細胞の採取が困難なこと、間葉系幹細胞増幅の効率が低いことなどが明らかになってきた。一方脂肪細胞は、簡便かつ安全に採取でき拒絶反応の回避可能な自己組織として近年注目を集めている。さらに抗炎症作用や免疫調整作用も併せ持つことも示唆されており、加えて自己体性幹細胞としてバンク化することに倫理的ハードルは低く、あらかじめ組織を採取あるいは細胞を処理してバンク化しておけば、重篤な状態の患者に速やかな細胞治療を行おうと考えられる。

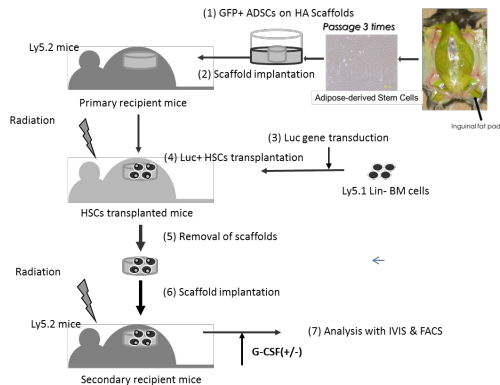
## 2. 研究の目的

脂肪由来間葉系幹細胞はさまざまな組織系統に分化が可能であり、皮下組織から比較的容易に大量に採取でき採取細胞に幹細胞の割合が高く骨髄由来間葉系幹細胞よりも細胞増殖が速く、再生促成因子を多く分泌することが明らかになっている。本研究は脂肪由来間葉系幹細胞と骨担体であるハイドロキシアパタイトを共培養することにより人工的に造血微小環境を構築し、造血幹細胞の維持・増殖・分化を再現できる人工骨髄を作成し、最終的には免疫応答の心配のない自己骨髄の再現と造血幹細胞と脂肪由来骨髄のニッチの制御機構のさらなる解析を行う。さらには脂肪由来間葉系幹細胞には骨髄由来間葉系幹細胞よりより強力な抗炎症作用や免疫調整作用が認められることが示唆されており、骨髄再生機序の解明にもつなげるためこの点についても検討する画期的な研究である。

## 3. 研究の方法

1) マウス脂肪由来間葉系幹細胞を用いて人工骨内に骨髄を再構築し、血球の長期維持の確認や脂肪由来間葉系幹細胞の免疫調整作

用などを検討する。また脂肪由来間葉系幹細胞がもっているであろう抗炎症作用や免疫調整作用を検証するために冠動脈炎モデルマウスを作成して、脂肪由来間葉系幹細胞を投与することによって上記の作用について検証した。



まず、5～8週齢の GFP トランスジェニックマウスから脂肪を採取し間葉系細胞を樹立する。間葉系細胞を幹細胞専用培地にて増殖後複数の HA と脂肪由来間葉系幹細胞を骨芽細胞誘導培地で3日間共培養し、C57/BL6-Ly5.2 マウス皮下に移植する。

### a) 皮下ニッチの造血能の評価

Step 1) 2)の皮下ニッチ C57/BL6-Ly5.2 に致死量の放射線を照射し、MACS Sorting をもちいて純化した C57/BL6-Ly5.1 の造血幹細胞を移植する。移植細胞の皮下ニッチへの生着の様子を免疫染色や FACS にて観察する。また末梢血中の Ly5.1 細胞の推移も FACS にて検討する。もし生着細胞数が少なくて十分解析できないときは、すでにわれわれが日常的に行っているルシフェラーゼ遺伝子を導入したレンチウイルスベクターを作成し、Ly5.1 のマウス造血細胞に遺伝子導入して移植を行い IVIS in vivo リアルタイムイメージングシステムを用いて評価する。また一定期間毎に FACS で皮下ニッチ部の造血幹細胞の頻度 c-kit などを指標にして評価する。

b) a) の移植マウスの移植後、皮下のニッチを取り出し半致死量の放射線を照射した C57/BL6-Ly5.2 に2次移植を実施する。移植

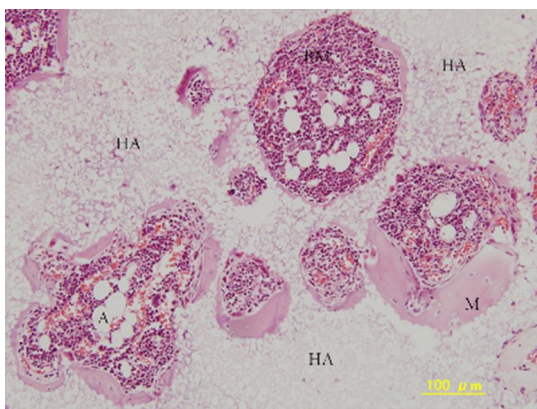
後2週間後より経時的に末梢血を採取し、Ly-5.1細胞の有無を評価する。また骨髄も8週間後に評価し、Ly5.1細胞の生着を確認する。Ly5.1細胞が確認されれば皮下ニッチが造血の場として機能していたことが確認できる。場合によってはin vivoリアルタイムイメージングシステムを用いて評価する。

2)また冠動脈血管炎モデルマウスを作成しその後脂肪由来間葉系幹細胞を尾静脈から投与した群とPBSを投与した群とで1か月後のサイトカイン測定及び病理学的炎症面積の測定を行い脂肪由来間葉系幹細胞も抗炎症作用や免疫調整作用を検討した。

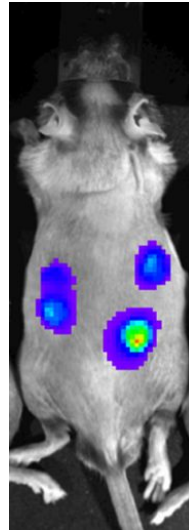
#### 4. 研究成果

マウス脂肪由来間葉系細胞を用い作成した人工骨髄が、免疫不全マウスであるNODマウスの皮下で、ヒト造血細胞の長期維持が可能であること確認し骨髄ニッチを提供する能力を有することを示した。

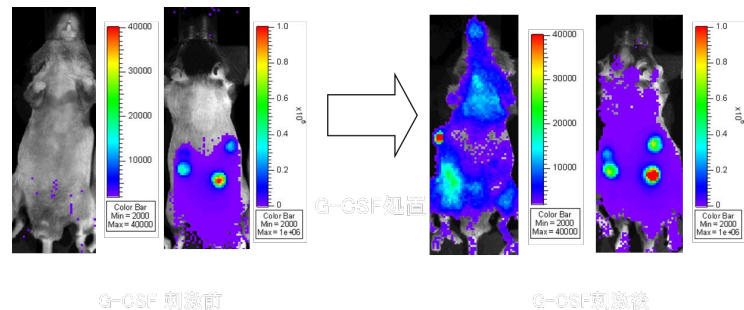
1) まず免疫不全マウスであるNOGマウスに脂肪由来間葉系幹細胞を充満させたハイドロキシアパタイト(HA)を皮下に移植し6~8週間後にハイドロキシアパタイトを取り出し再び病理組織学的な検討したところBMLikeな骨髄の再現が確認できた。



ルシフェラーゼ遺伝子導入された造血細胞がIVISによって人工骨髄中に集積していることを確認した、



また上記HAを2次移植したマウスにG-CSFを投与したところルシフェラーゼ遺伝子導入された造血細胞の増加がIVISによって確認され、維持増殖が長期にわたって認められた。



また、脂肪由来間葉系幹細胞の抗炎症効果の確認のため冠動脈血管炎モデルマウスを用いて検証したところ、血管炎の面積の有意な減少と炎症性サイトカインであるIL-1b, TNF- $\alpha$ , IL-13, IL17がPBS投与群と比べて脂肪由来間葉系幹細胞投与群で有意差をもって、低下を認めた。以上より抗炎症効果や免疫調節機能があることが確認できており、今後の骨髄再構築の機序の解明に役立つデータが得られている。

#### 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 7件)

**Ueda T**, Fujita A, Ogawa R, Itoh Y, Fukunaga Y, Shimada T, Migita M. Adipose-derived stromal cells grown on a hydroxyapatite scaffold can support hematopoiesis in regenerated bone marrow in vivo. *Cell Biol Int*. 2014;38:790-8

Keino D, Kinoshita A, Tomizawa D, **Ueda T(15/22)** Ohara A et al.: Residual disease detected by multidimensional flow cytometry shows prognostic significance in childhood acute myeloid leukemia with intermediate cytogenetics and negative FLT3-ITD: a report from the Tokyo Children's Cancer Study Group. *Int J Hematol*. 2016 ;103:416-22.

日本医科大学雑誌 総説:小児白血病治療の現状と展望: 11. 2015.181-6

**Migita M**, kumasaka S, Matsumoto T, Tajima H, **Ueda T**, Yamataka A. Cholelithiasis in a patient with type 2 Gaucher disease. *J Nippon Med Sch*. 2014;81:40-2.

小児血液・腫瘍学 2015 診断と治療社 分担 巨赤芽球性貧血 P381 - 4 出血性貧血 385-387 その他の貧血疾患 389-92

総説 思春期のスポーツ貧血 小児科: 55. 1969-76 2014

**日常生活にひそむ小児血液・腫瘍性疾患: 小球性貧血 小児科診療: 80 1 163-68 2017**

〔学会発表〕(計 件)

1. MTX induced leukoencephalopathy may be caused by inflammation mediated by iL-6 and IL-8. 講演 Takeshi Asano, Kiyohiko Kaizu, Toshikazu itabashi, Atsuhiko Fujita, Miho Yamanishi, Jun Hayakawa, Takahiro Ueda, Akihiro Iguchi Taku Miyasho, Miho Maeda. 松山市 愛媛県 2017年11月9日 ~ 11日 国内

〔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  
植田高弘 ( UEDA TAKAHIRO )  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 20322505
- (2)研究分担者  
右田真 (MIGITA MAKOTO)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50256963

(3)連携研究者 ( )

研究者番号:

(4)研究協力者 ( )