

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462725

研究課題名(和文) 遺伝子導入脂肪組織由来幹細胞による骨髄細胞動員を介した骨延長部仮骨形成促進

研究課題名(英文) Acceleration of osteogenesis in distraction osteogenesis with gene transfected cells

研究代表者

三川 信之 (MITSUKAWA, NOBUYUKI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：40595196

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)：頭蓋顎顔面変形症に対して仮骨延長法が普及しつつある。しかし、現在でも後戻りが問題で、仮骨形成を促進する方法が求められている。我々はこの問題を解決するために皮下脂肪組織中の細胞移植が有用と考えている。皮下組織から採取できる脂肪組織由来幹細胞、天井培養由来前駆脂肪細胞を比較すると、両者とも骨分化能を持つ点では一致していた。しかし、DNAエピジェネティクスレベルでみると両者には差が存在し天井培養由来前駆脂肪細胞の方が骨分化をしやすい傾向にあることを明らかにした。一方で仮骨形成に重要である血管新生に関してDNAエピジェネティクスは差がなかった。これらの差は遺伝子導入を行う際に重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Distraction osteogenesis has been getting wide spread use. However, poor osteogenesis is one of the big problems of the method. We think it important to supply cells which promote osteogenesis. As a cell source of regenerative medicine of bone, cells harvested from subcutaneous adipose tissue is a possible option. From subcutaneous adipose tissue, two types of cells can be harvested. One is adipose derived stem cell, the other is ceiling culture-derived cells. We revealed that both types of cell have osteogenic potential. Nonetheless, there exist the differences in epigenetic status of osteogenesis related genes between two types of cells. DNA methylation status indicated that ceiling culture derived cell is more likely to differentiate into osteoblast than adipose derived stem cells. On the other hand, there were no differences in VEZF gene, a master regulator of differentiation into vascular endothelial cell. We think it important to consider those epigenetic differences in gene therapy.

研究分野：骨延長学

キーワード：骨延長術 細胞移植 細胞分化 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

頭蓋顎顔面変形症に対して、申請者らが世界に先駆けて行ってきた仮骨延長法が普及しつつある (Satoh, Mitsukawa, J Craniofac Surg, 2006)。仮骨延長法は、細胞生物学的には緩徐持続的な伸展刺激により、軟部組織を含む細胞増殖と細胞外基質産生による組織の統合再生が行われる、という特徴を持つ (Lee, Bone, 2009)。しかし、現在でも仮骨形成不全により、長い保定期間と延長後の後戻りが問題で、患者は複数回の手術を受けることがあり、仮骨形成を促進する方法が求められている。

骨再生中の組織では、骨芽細胞、血管内皮細胞などを迅速大量に供給することが良好な治癒機転に重要で、それらの供給源として局在性幹細胞や前駆細胞の増殖分化が期待される。しかし、しばしば骨延長術では以前の手術による癒痕化で延長部の局在性の再生細胞群の減少により組織再生力が不足した状態にある。このような創傷治癒力が低下した状態においては、外在性幹細胞の導入の重要性が指摘されている。

我々は外来性幹細胞の供給源として皮下脂肪組織由来細胞が有力であると考えている。皮下組織は安全にかつ大量に移植様細胞を採取できるため再生医療の細胞供給源として有望視されている。しかし、皮下脂肪組織由来細胞の有用性は脂肪移植や脂肪分化の観点での研究が多く、一方、骨再生に関連した研究は数少なく、不明点が多かった。

2. 研究の目的

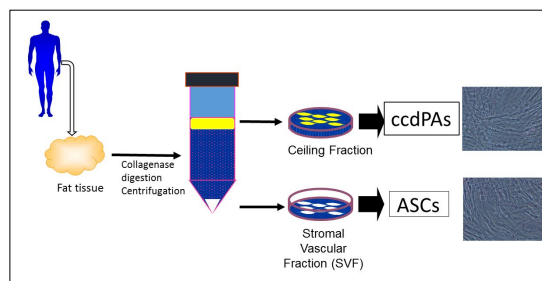
脂肪組織由来細胞の骨再生治療における有用性を検討する。

3. 研究の方法

手術時に廃棄されるヒト腹部皮下脂肪組織を倫理委員会の承認と書面での同意を経て採取した。

(1) 皮下脂肪組織由来初代培養細胞の確立

皮下脂肪組織から2種類の細胞を分離した。1つは、皮下脂肪組織を細切ののち、コラゲナーゼ処理して遠心分離し沈殿分画を培養し底面に接着した細胞であり、脂肪組織由来幹細胞 (adipose derived-stem cells, ASC) と呼ばれる。もう1つは、Sugiharaらにより報告された天井培養法より分離される細胞



で ceiling culture-derived preadipocytes, ccdPA と我々は名付けている。天井培養法ではコラゲナーゼ処理後の遠心物の浮遊分画を培養液を充滿した容器で培養し、天井面に接着した細胞を用いた。骨分化誘導刺激後に成熟骨細胞特異的の蛋白質 BGLAP ELISA を行った。

(2) エピジェネティクスからみた多分化能の解析

ASC, ccdPA とも潜在的に他種類の細胞に分化しうる多分化能を持っている。細胞移植治療では移植細胞の分化解析が重要である。遺伝子のプロモーター領域 DNA メチル化は mRNA 転写を強く抑制することが知られている。分化関連遺伝子の DNA メチル化を BeadChip450K を用いて計測した。

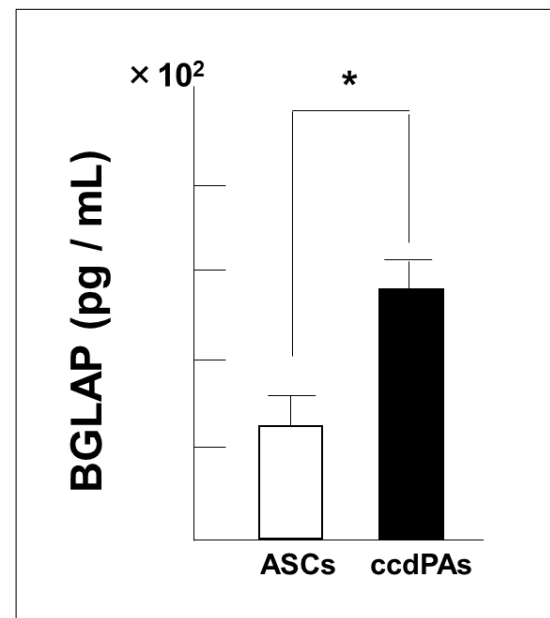
各遺伝子の転写開始点 (transcription start site, TSS) から 1500 bp 上流 (5' 方向) までをプロモーターと定義した。

4. 研究成果

(1) 脂肪組織由来の初代培養細胞

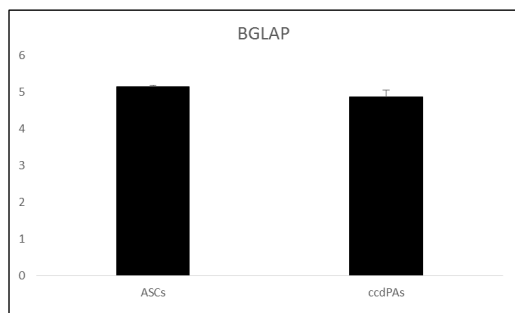
天井面に接着し時間を経過した後では、ccdPA は脂肪滴がない紡錘形細胞の状態であり、外観的には ASC と区別できなかった。

ccdPA は ASC と比べて BGLAP 分泌量が多かった。



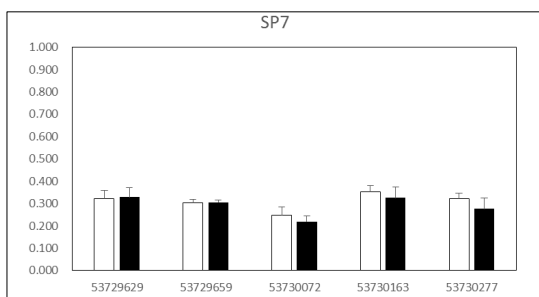
(2) BGLAP 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化量は ccdPA と比べて ASC で高い

BGLAP 遺伝子プロモーター領域には 10 個の CpG サイトが存在し、それらの合計メチル化量を比較したところ、ccdPA は ASC と比べて有意に低値だった。すなわち、ccdPA の方が ASC と比べて BGLAP mRNA の転写が起こりやすいと考えられた。



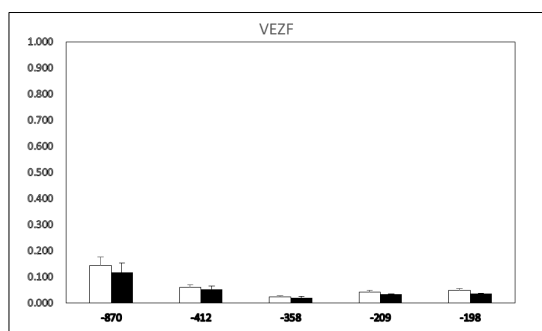
(3) SP7 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化率は差がない

SP7 は骨分化を促進する転写因子である。SP7 プロモーター領域には 5 つの CpG サイトが存在し、ccdPA, ASC 間にメチル化率の差はみられなかった。



(4) VEZF 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化率は差がない

血管内皮細胞分化のレギュレーターである VEZF 遺伝子プロモーター領域には 4 つの CpG サイトが存在し、ccdPA, ASC 間にメチル化率の差はみられなかった。



まとめ

一般に ASC は強力な血管新生促進作用を持つことが知られ、脂肪移植に添加して移植生着を促す使い方が行われている。ASC は血管内皮分化能を持つ。血管内皮分化マスターレギュレーターである VEZF 遺伝子の発現ポテンシャルを DNA メチルからみた場合、ccdPA は同等の状態だった。

移植細胞自身の骨分化能に期待する場合、ccdPA の方が骨分化特異的蛋白分泌が多く、BGLAP DNA レベルでメチル化の違いがみられた。一方、転写因子 SP7 は差がみられなかった。

これらの結果から、血管内皮分化による血

管新生を期待する場合、遺伝子導入 vehicle としては ASC, ccdPA との間には大差がない可能性がある。一方、骨細胞分化を期待して移植する場合、ASC, ccdPA は DNA エピジェネティクスレベルで明らかな違いがあることを考慮する必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

笹原資太郎、窪田吉孝、三川信之、他。日本形成外科学会基礎学術集会、ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター、大阪市、2017年10月19、20日

〔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

三川 信之 (MITSUKAWA NOBUYUKI)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：40595196

(2) 研究分担者

窪田 吉孝 (KUBOTA YOSITAKA)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：10375735

佐藤 兼重 (SATO KANESHIGE)

千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号： 50138442