

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20527

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞(ASC)とFibrinを用いた骨芽細胞シートによる骨形成能の評価

研究課題名(英文) Prospects of osteogenesis using adipose-derived MSCfat (ASC) and Fibrin seat.

研究代表者

松原 正和 (Matsubara, Masakazu)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50736551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は脂肪幹細胞を用いた骨再生医療についての基礎的研究である。申請者が樹立したASC株はIn Vitroの研究にて多分化能を有することが確認された。骨芽細胞、軟骨芽細胞への分化については、各細胞への誘導実験を行った。骨に関しては石灰化能を細胞染色法(アリザリンレッド)および各種サイトカインの発現にて確認した。(アルカリフォスファターゼ、Osteopontin)また骨関連遺伝子をRT-Pcr法にて確認し各種遺伝子の発現を確認した。(Osteonectin,RUNK2,DLX5)さらにASCから分化させた培養骨芽細胞を、免疫不全マウスに移植し、骨新性能があることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Dedifferentiated fat cells (DFATs) and adipose stem cells (ASCs) have been reported to show the similar multilineage potential with bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs), and can be more easily harvested from mature adipose tissue than MSCs. ASCs are heterogenous cell populations of mesodermal stem cells with contamination by smooth muscle cells, blood cells, perithelial cells, and endothelial cells in particular at early passage. Compared to ASCs, DFATs can be dedifferentiated from mature adipocytes to fibroblast-like cells in vitro and show high proliferative and high homogeneous. Bone tissue engineering of DFATs and ASCs is expected for the regenerative medicine. The purpose of this study was to compare the osteogenic potent of DFATs and ASCs.

研究分野：再生医療

キーワード：骨再生

1. 研究開始当初の背景
再生医療において患者の機能再建を行う上で、iPS 細胞や ES 細胞に代表される人工万能幹細胞の応用は急務かつ必須であると考えられる。顎顔面領域において病変切除後には骨組織の欠損を伴い、こうした欠損に対しては多分化能を有する間葉系幹細胞の応用が広く研究されており近年臨床応用されるものと想定される。しかし再生能の低い骨組織再生をティッシュエンジニアリングにおいて成功させることは、再生医療の中でも困難な領域である。通常顎顔面領域における広範囲骨組織欠損においては骨誘導性サイトカインや人工骨の応用、また自家骨移植を用いた手法で機能再建が行われている。しかしどの手法も骨組織を有効に再生することは期待できない。自家骨移植を行う場合当然ながら患者の負担や苦痛は計り知れない。こうした背景から培養骨芽細胞を基盤としたティッシュエンジニアリングの応用が期待されている。骨再生の核となるのは当然ながら骨芽細胞である。さらに細胞の定着と増殖には骨格となる足場と、成長因子の存在が不可欠である。これらの要因がそろって骨再生が有効かつ確実に行われる。そのためまず核となる骨芽細胞が大量に必要とされ、間葉系幹細胞より骨芽細胞株の樹立が最優先となる。近年骨再生分野においては多分化能を有する骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell:BMSC)を用いた研究が広く行われている。BMSC は骨誘導を行うことで骨芽細胞への分化能を示す。BMSC の採取は造血系である骨髄や皮質骨基質内に存在するとされており、申請者らはマウス大腿骨粉碎皮質骨内より回収した BMSC が骨芽細胞への分化能を示すことを報告した。(Yamachika E, et al. J Mol Hist, 43(2), 2011.)しかし BMSC 採取には侵襲が大きいことも問題であり、その代用と

して採取が容易である脂肪由来幹細胞 (Adipose Mesenchymal Stem Cell:ASC)を用いた試みが注目されている。**近年脂肪組織中にも間葉系幹細胞が存在することが報告されており (Mareschi K, et al. J Cell Biochem, 97, 2006.)** **申請者は過去の研究にて ASC が in vitro において BMSC 同様に骨誘導下で骨芽細胞へ分化する可能性のあることを予備実験にて証明した。**

今後の課題は in vitro で ASC の細胞特性を調べ、移植実験を成功させることである。しかしこの点は多くの研究者が有効な移植法が確立できず苦難している点である。培養細胞のみでは移植できず、足場となる生体材料と成長因子との複合移植が必要である。多くの報告では、培養細胞は異種生物由来の生体材料や人工物を応用した複合移植がなされている。こうした手法を臨床応用する際に当然ながら安全性に問題がある。**申請者らはこの点を改善するために同種生物由来のフィブリンシートの応用に着目した。**血液中には骨再生に有用な多くのサイトカインを含み、またフィブリンは骨芽細胞の足場材としての性質も有する。**本申請研究の着眼点は骨誘導した ASC をフィブリンシート内に封入させ、細胞移植に有効な条件を満たした骨芽細胞シートを作成することである。**フィブリンを細胞移植媒体とした再生医療は、形成外科領域で皮膚組織移植などの際に応用される。移植されたフィブリンは組織親和性に優れ、速やかに線溶系にて溶解を受け吸収されるため安全性の確立された物質と言える。近年では骨再生分野への応用も期待されているが、未だ培養骨芽細胞との複合移植の報告はない。本研究にて ASC 由来の培養骨芽細胞株の樹立およびフィブリンシートを媒体とした骨芽細胞シートの移植法を確立させ、骨再生医療の発展の新たな一歩としたい。

2. 研究の目的

脂肪由来幹細胞は分化能に優れ多量に採取できるため、適切な条件下にて培養することで骨髄由来幹細胞よりも多くの骨芽細胞を作り出すことが可能であると予測される。また移植実験においても精製した骨芽細胞シートは骨再生に必要な成長因子を含み骨欠損部において確実に骨形成を行うことが可能であると想定している。

本研究の成功はこれまで困難であったASC由来骨芽細胞株樹立および未だ成功例の少ない細胞移植法までを一連に確立させる可能性を有しており、骨再生医療分野の発展に大きく貢献できる。

また完全自己生体由来の細胞、媒体を用いた移植法を確立させる事が可能となり、これは倫理的概念を重視する再生医療において有意義なものになると思われる。

3. 研究の方法

本研究は In Vitro における ASC の培養実験および In Vivo での移植実験までを一貫して行う。まず第一段階に ASC の樹立方法および多分化能について実験する。第二段階として骨誘導した ASC を精製フィブリンに封入し骨芽細胞シートを作成する。そして移植実験を行い骨形成能の評価を行う。

実験動物より血液と脂肪組織採取および酵素処理による ACS 採取

実験動物に GFP 雌性マウス (C57BL/6-Tg) を使用。吸入麻酔後大腿部皮下脂肪組織を約 1g 採取、また眼下窩静脈叢より 1cc 程度の採血を行う。血液は細胞移植の際使用するため、分画後に -20 で保存する。脂肪組織はコラゲナーゼ処理し脂肪細胞を回収する。さらに採取した細胞を継代培養することで増殖能の活発な ASC を選択的に採取することが可能になる。この手法にて 5×10^3 個の ASC が回収でき、BMSC を同量回収する場合は約 500 倍の組織量が必要であるとされている。

(Ohgushi H, et al. J Biomed Mater Res, 48, 1999.)

ASC を大量培養し骨誘導培地にて骨芽細胞への分化誘導

上記にて樹立した ASC を 75cm² 培養用フラスコで培養する。(D-Mem, 100mg/ml

Penicillin-Streptomycin) 3 回継代した後 ASC を Ascorbic Acid, Hydrocortisone,

Glycerophosphate を添加した骨誘導培地にて培養し骨芽細胞へ分化誘導を行う。この時点での骨芽細胞への分化能は Alizarin Red 染色法にて確認する。

骨誘導後の ASC が有する細胞特性をサイトカイン、遺伝子レベルで解析

ASC を 96Well のマルチプレートにて上記条件下で培養する。培養後に ELISA 法を用いて各種骨形成マーカーの動態を計測する。さらに ASC をフローサイトメトリーにて細胞表面に発現する表面マーカーについて検討を行う。間葉系幹細胞と関連する Stro1, CD29, 105, 73, 44 などの発現を調べる。また BMSC との比較にて CD34 の発現パターンに相違点があるとの報告があり (Zannettino AC, et al, J Cell Physiol, 214, 2008.)、他の遺伝子についても発現パターンに相違点がないかの検討を行う。

フィブリンシートを基盤とした骨芽細胞シートの精製

ASC 採取時に同ドナーより採血した血液を Rodella らの報告にて開発された遠心分離システム MEDIFUGE[®] を使用し Fibrinogen および Thrombin を分画する。これらをシャーレ内で反応させ、成長因子を含んだ Fibrin 重合体 (フィブリンシート) を作成する。(Rodella LF, et al, Microsc Res Tech, 78(8), 2011.) ASC を骨誘導下にて共培養した後に回収し、フィブリンシート時にシート内に封入させる事で骨芽細胞シ

ートが精製できる。

ヌードマウスを用いた骨芽細胞シート移植実験

移植動物としてヌードマウス (BALB/c, 雌性, 6 週齢) を用いる。吸入麻酔後に背部皮下組織内および頭部前頭骨骨膜下に切開を行い作成した骨芽細胞シートを移植する。移植後 2, 4, 6 週群を設定し、期間終了後に移植片の摘出を行う。また移植部位における細胞の生存は 470nm の GFP 照射装置にて確認を行う。また骨形態計測解析ソフトウェアは高額機器であるためレンタルにて対応する。

X 線学的解析による形成骨の形態学的検討

摘出移植片は 10%ホルマリン固定後動物用 μ CT 撮影装置 (R-mCT, Rigaku 社製) を用い 10 μ m のスライス幅で撮影を行う。撮影した画像は骨形態計測解析ソフトウェア (TRI/3D-BON, RATOK 社製) にて 3 次元構築を行い骨形成パターンについて形態学的に検討する。また形成された骨組織の微細構造、特に新生骨内への血管新生や同所移植 (頭部骨膜下) 異所移植 (背部皮下組織) における形成骨の相違点についても検討を行う。当研究施設には上記記載装置が無いので、当項目の実験は主に外部研究施設と連携し行う。

形成骨の組織学的解析および各免疫組織学的検討

上記終了後に摘出移植片はパラフィン切片を作成する。まず HE 染色にて新生骨の程度を確認する。さらに抗 Osteocalcin, 抗 Runx-2 抗体の発現を免疫染色法にて検討を行い、Alkaline Phosphatase-TRAP の 2 重染色法にて局所における骨リモデリング様式についても検討する。また形成骨基質内の骨細胞が移植細胞由来かを抗 GFP 抗体を用いた免疫染色法にて確認する。

4. 研究成果

1) In Vitro における ASC の石灰化能

アリザリン染色にて活発な石灰化を示した。

2) 骨関連遺伝子の発現

ASC の細胞特性として骨関連サイトカイン ALP の活性は、骨誘導後に上昇を認めた。また骨関連遺伝子である RUNK2 の発現量を計測した結果、継続的に発現量は上昇する傾向であり、骨髄幹細胞 (BMC) との比較で有意差が確認された。

3) 骨形成能の評価

ASC を基盤とした骨芽細胞シートは免疫抑制マウスへの移植を行った。移植後シートを摘出し、組織的観察を行った結果、移植シートは骨様硬組織へ置換されていた。免疫学的染色法を用いて観察した結果、オステオカルシン、GFP 陽性であり、移植細胞由来の骨新生が発生した事が確認された。

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0件)

[学会発表](計1件)

第63回日本口腔外科学会総会
松原正和・脂肪幹細胞による骨再生療法の展望

(H29年10月20日 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

松原正和 (Masakazu Matsubara)
岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科
顎口腔再建外科学・助教
研究者番号：50736551

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()