

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11649

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞(ADSC)移植による放射線誘発急性障害、特に骨髄障害回避の検証

研究課題名(英文) Verification of avoidance of radiation-induced acute injury by adipose stem cell (ADSC) transplantation -Focus on bone marrow damage-

研究代表者

大津山 彰 (Akira, OOTSUYAMA)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10194218

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)：X線被曝マウスに脂肪幹細胞を静脈移植し、骨髄移植と同様の放射線骨髄障害の回復が得られるかを検討した。6.5GyX線でC57BL/6メスマウスを全身被曝させ、同雄マウスの皮下脂肪織から得た脂肪幹細胞 1×10^6 個を静脈移植し、生存率の経時的動態を照射非移植マウスと比較検討した。また蛍光染色した脂肪幹細胞を移植し、経時的に主要臓器を摘出し組織観察と同時にDNAを抽出してPCRでオスマーカー遺伝子SSTY2の発現をみた。移植群では照射後約20日で生存率が非移植群を30%上回り、脂肪幹細胞による放射線骨髄障害の回復が証明された。組織観察とPCRの結果から移植細胞は肺と脾臓に集積していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪幹細胞は多能性幹細胞であり、多方面の再生医療の様々な組織の再生に用いられている。ただし、脂肪幹細胞に造血支持能力はあるが骨髄移植の代替になるという報告は無い。本研究の成果は、HLA適合や採集量が少ない等の問題がある骨髄細胞移植使用に対し、そのような制約が少ない脂肪幹細胞が、放射線急性骨髄障害を回復させる能力があることを証明したことに学術的意義がある。また、社会的には事故原子炉の撤去など高線量被曝の可能性がある作業現場が長期にわたり存在する現状をふまえ、緊急被曝医療の一端として脂肪幹細胞の移植が、高線量被曝時の急性骨髄障害の回避のために有効な手段となれば、社会的意義も大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)： We examined whether transplantation of adipose stem cells (ADSCs) into X-ray-exposed mice could recover from a radiation-induced acute injury, especially bone marrow damage, similar to bone marrow transplantation. 1×10^6 ADSCs derived from subcutaneous adipose tissue from male mice were intravenously transplanted 6.5 Gy C57BL/6 female mice exposed to X-rays. The changes in survival rate with time were compared with those of non-irradiated mice. After transplantation of fluorescently stained ADSCs, major organs were sampled with time for histological observation and DNA was extracted and PCR was performed to determine the expression of the male-marker gene SSTY2.

The survival rate of the transplanted group was 30% higher than that of the non-transplanted group at about 20 days after irradiation, demonstrating recovery of radiation-induced bone marrow damage by ADSCs. Histological observation and PCR results showed that the transplanted cells accumulated in the lung and spleen.

研究分野：放射線生物学

キーワード：脂肪幹細胞 ADSC 放射線骨髄障害 再生医療 組織再生 幹細胞移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

福島第一原子力発電所事故後の処理は、融解した核燃料の処理や廃炉への解体作業に向かい、他の原発も耐用年数経過に伴い何れその時期を迎える。廃炉作業員は、作業環境上常に高線量被ばくの恐れが現実となる。不幸にも高線量被ばく事故が起きた場合、緊急被曝医療では造血幹細胞移植が初期治療の選択肢の1つとなる。しかし、一般的に高線量被ばく事故のような場合は、緊急性を要する造血幹細胞移植にもかかわらず、HLA (Human Leukocyte Antigen)適合検査から始まり、短時間でのドナー獲得は容易ではない。近年、脂肪組織中に多能性幹細胞 (Adipose Derived Stem Cell:ADSC)が発見され、間葉系細胞 (脂肪、骨、筋、軟骨、血管等)への多分化能を持った細胞として報告された。これらの細胞は VEGF や HGF 等の細胞増殖因子を分泌し、血管の再生や脂肪移植、骨格筋再生などの整形外科領域、急性腎障害や前立腺周囲平滑筋再生などの腎泌尿器疾患領域、心筋梗塞、四肢血管再生などの血液疾患領域、腸管ろう孔再生、腸炎の軽減、肝細胞再生等の消化器疾患領域等で臨床実験のみならず、すでに一部では臨床応用も始まっている。また ADSC は大量に移植用の幹細胞数を得ることができ、HLA への適合も比較的緩いとされていることから、自己の ADSC が使えない場合でもドナー捜しの時間的問題も回避でき、早期の治療開始が可能となるのではないかと考えた。ただ現状ではこの ADSC が骨髄移植の代替になるという報告は無い。しかし骨髄移植と同等の効果がなくとも BMC (Bone Marrow Cell) レベルの造血支持能力は認められているので、骨髄移植までの時間を短縮できるのでは無いかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では高線量放射線被ばく事故を想定し、緊急被ばく医療として骨髄移植に変わる ADSC 移植による放射線骨髄障害回避のための早期治療開始の可能性を検証するために、全身放射線被ばくマウスを作成し、ADSC を移植することにより、実際に放射線障害抵抗性が得られるかどうかを経時的に生存率を観察し検討する。加えて、その機構を探るためにレシピエントをメスマウス、ドナーをオスマウスとする独自の実験群を作成し、Y染色体上の SSTY2 遺伝子をマーカーにし、PCR を用いてオス由来 ADSC のレシピエント組織への定着、特に骨髄での定着の有無を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

実験動物: ICR/crj マウス(8-10週齢)、C57BL/6 マウス(8-10週齢)、C57BL/6 マウス(10-12週齢)

処置:

A グループ: ICR/crj マウスは X 線全身照射 6Gy を受けた直後に、ICR/crj マウスの ADSC 細胞を伏在静脈から (1×10^6 個/500 μ l, *iv*) あるいは腹腔内 (2.5×10^6 個/1ml, *ip*) に投与し、生存率を経時的に観察した。

B グループ: C57BL/6 マウスは X 線全身照射 6.5Gy を受けた直後に、C57BL/6 マウスの ADSC 細胞を伏在静脈から (1×10^6 個/500 μ l, *iv*) に投与し、生存率を経時的に観察した。

ADSC の調整: ICR/crj マウスの皮下脂肪を摘出し、細胞分離処理後 (0.15% コラゲナーゼ溶液中で 37℃ 1 時間振盪インキュベート、100 メッシュフィルター濾過)、DMEM に播種し 37℃、CO₂

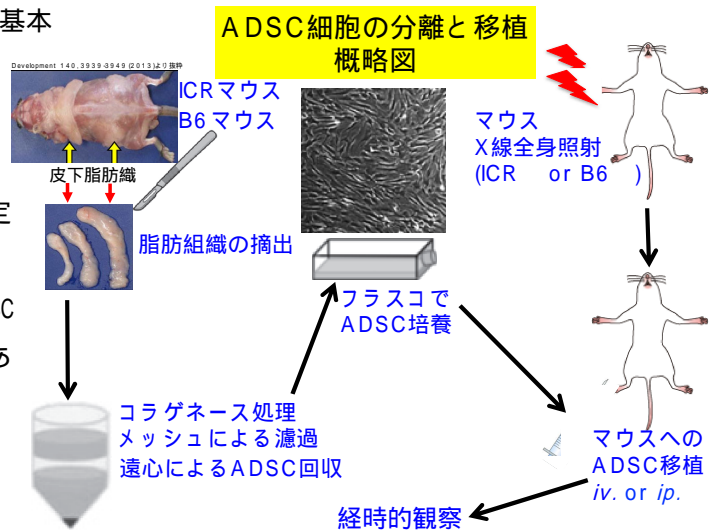
インキュベーターで培養を行う。4 日目にパッセージを行い、7 日目にトリプシンによって剥離し、生体染色蛍光色素 PKH26 でラベル後、移植細胞として調製した。

ADSC の同定：マウス ADSC の表面抗原の発現パターンについては諸説あるが、本研究では Cyagen 社の ADSC 商品[C57BL/6 mouse adipose derived mesenchymal stem cell Catalog#MUBMD-01001] を参考にした。この細胞の characteristics and identity は、CD29⁺ CD44⁺ Sca-1⁺ CD117⁻となっていた。よって本研究では初代培養 ADSC 中の CD44⁺ Sca-1⁺ CD117⁻ 細胞の存在割合をセルアナライザーで算出した。

病理学・分子生物学的解析：実験に用いたマウスは終生飼育群と、経時的屠殺群にわけ、屠殺群の主要臓器は HE 染色ならびに蛍光顕微鏡で PKH26 ラベル ADSC の定着部位の観察を行った。C57BL/6 マウスをレシピエントにして C57BL/6 マウスの ADSC をドナーにした B グループでは、屠殺群マウスの主要臓器と大腿骨から DNA を抽出し、PCR で SSTY2 遺伝子を検出し、オス由来 ADSC のレシピエント臓器での定着を確認した。

平成 30 年度

大規模実験を行う施設がないので、基本的に一群 20 匹(移植群 10 匹、対照群 10 匹)を用いた移植実験を一ヶ月単位で毎月行った。初年度は ICR マウス群の実験を中心に実験諸条件を確定し、n 数が 200 ほどになるまで行い、生涯観察を令和 2 年度まで続け、ADSC が造血支持能力だけを有するのか、あるいは骨髄分化能も有するのかを確認した。



令和 1 年度

H30 年度と同様の実験サイクルで C57BL/6 マウス群の実験を中心に実験を行い、移植群生存マウス主要臓器から DNA を抽出し、PCR で SSTY2 遺伝子を検出することで、オス由来 ADSC がレシピエントの各臓器でどの様に定着しているか、PKH26 ラベル細胞の定着部位観察とともに確認を行った。

令和 2 年度

ADSC 移植実験の不足分を追加し、C57BL/6 マウス実験群から得られた DNA の解析を引き続き行った。また ICR マウス実験群による生涯観察群の結果から ADSC が造血支持能力だけなのか骨髄分化能があるのかの検討をおこなった。C57BL/6 マウス実験群にも生涯観察群を残しておき、マウス種による骨髄障害の軽減作用の違いを検討した。

4. 研究成果

ICR メスマウスに X 線 6Gy を全身照射直後、ICR オスマウスの ADSC(脂肪幹細胞)を伏在静脈 ($1 \times 10^6 / 500 \mu l$, *iv*)あるいは腹腔内 ($1 \times 10^7 / 1ml$, *ip*)に投与し、生存率を経時的に観察した実験では、6Gy 照射 *iv*移植群は約 650 日で、照射非移植群は約 600 日で観察が終了し(マウス全頭

死亡)、移植群と非移植群の生存率に移植後 20 日目で 40%の差があり有意差があった(図 1)。 *ip* 移植群と非移植群間の生存率に有意差はなかった。

C57BL/6 メスマウスに X 線 6.5Gy 全身照射直後、C57BL/6 オスマウスの ADSC を伏在静脈 (1×10^6 個/500 μ l, *iv*) に投与し(移植群 108 匹、非移植群 168 匹)、生存率を経時的に観察した実験では、6.5Gy 照射 *iv* 移植群は約 600 日で、照射非移植群は約 400 日で観察が終了し(マウス全頭死亡)、移植群と非移植群の生存率に移植後 20 日目で 30%の差があり有意差があった(図 2)。

移植用 ADSC 中の CD44⁺ Sca-1⁺ CD117⁻ 細胞をセルアナライザーで解析した結果、約 16%の細胞が CD44⁺ Sca-1⁺ CD117⁻ の表現系を示していた。他の再生医療を目的とした ADSC の移植実験では再生目的臓器の幹細胞と ADSC を同時移植するとさらに効率の良い再生効果があるとの論文が複数発表されており、ADSC と BMC を同時に移植する実験系も行った。ADSC (1×10^6 個) と BMC (1×10^5 個) を伏在静脈 *iv* で混合移植し、250 日が経過時点で、移植群と非移植群の生存率に移植後 20 日目で 50%の差があり有意差がみられ、ADSC+BMC 混合移植群ではより大きな放射線障害回避効果がみられた(図 2)。

移植細胞の体内での動向を追跡するため、PKH26 で ADSC をラベルし移植後経時的かつ組織学的に追跡観察したところ、移植後 7、30 日目にレシピエントの肺・脾臓で存在を認めた。また、ドナーのオス Y 染色体上のマーカー遺伝子 SSTY2 を PCR で解析したところ肺・脾臓・骨髄で存在を認めた。また 30 日目の脾臓の HE 所見で髄外造血象が観察され、ADSC 移植は放射線誘発障害回避に有効であることがわかった。

ADSC 移植群では放射線照射後約 20 日目で生存率が非移植群を 30%以上回り、ADSC に放射線急性骨髄障害を回復させうる能力があること、またその発現機構の一部について証明することができた。ADSC 移植は放射線被曝医療の一端を担える可能性がある。

図 1

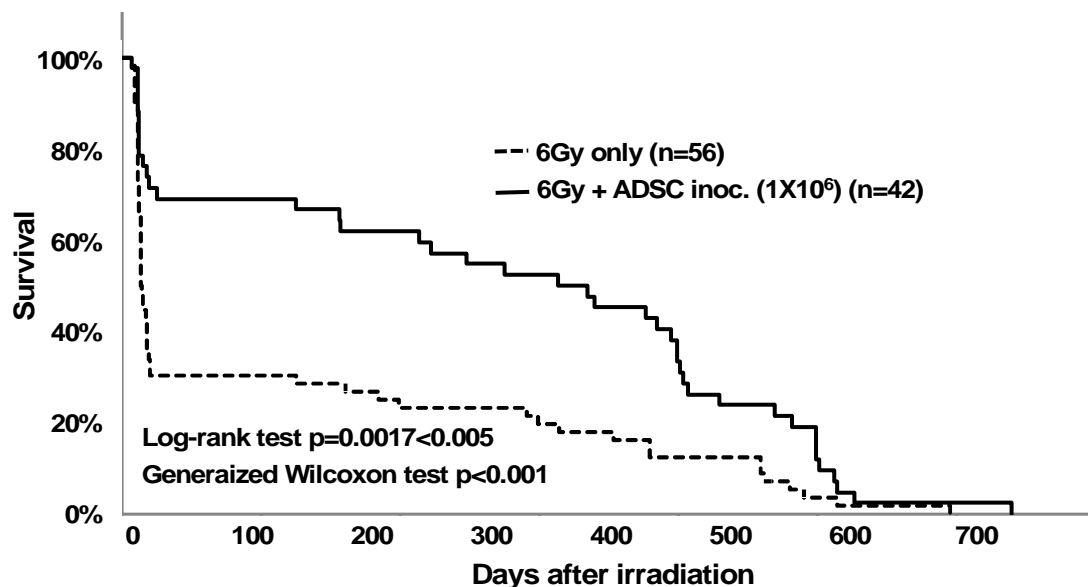
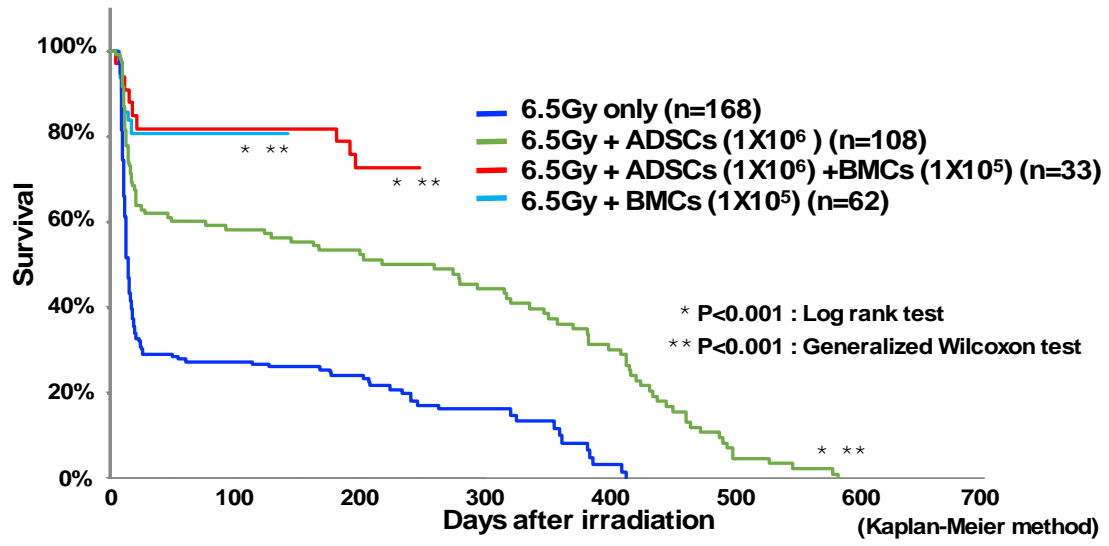


Figure 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akira OOTSUYAMA	4. 巻 43
2. 論文標題 Life-Prolonging Effects of Adipose Tissue-Derived Stem Cell Transplantation into Mice Exposed to a Lethal Dose of X-Rays	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of UOEH	6. 最初と最後の頁 25-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7888/juoeh.43.25	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akira OOTSUYAMA
2. 発表標題 Transplantation of adipose-derived stem cell (ADSCs) plus bone marrow to mice after whole body X-ray-irradiation
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第63回大会（福島）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akira OOTSUYAMA
2. 発表標題 Effects of adipose tissue-derived stem cell transplantation in whole-body X-ray irradiated mice -Destination of transplanted cells-
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第62回大会（京都）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大津山 彰
2. 発表標題 脂肪幹細胞(ADSC)による放射線障害の軽減作用 III
3. 学会等名 第56回 放射線影響懇話会（熊本）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira OOTSUYAMA
2. 発表標題 Effect of adipose-derived stem cell (ADSC) transplantation to reduce whole body X ray damage in mice
3. 学会等名 16th International Congress of Radiation Research (Manchester, England) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大津山 彰
2. 発表標題 脂肪幹細胞(ADSC)による放射線障害の軽減作用 II
3. 学会等名 第55回放射線影響懇話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大津山 彰
2. 発表標題 X線被ばくマウスに対する脂肪組織由来幹細胞(ADSC)移植の放射線障害軽減効果
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第61回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------