

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791630

研究課題名(和文) 骨軟部腫瘍切除後欠損に対する脂肪由来幹細胞による組織再生と蛍光イメージング評価

研究課題名(英文) Tissue regeneration and fluorescent imaging evaluation of adipose-derived stem cells for bone and soft tissue defect after tumor excision

研究代表者

林 克洋 (Hayashi, Katsuhiko)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80507054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍切除後に生じる骨欠損、軟部組織欠損に対し、脂肪由来幹細胞を用いた細胞移植療法の有効性とその作用機序を検証した。ラット骨欠損モデルで脂肪幹細胞移植群の骨形成は組織学的に旺盛であることが確認された。また、幹細胞の分化能の違いに対しMDM2遺伝子に着目した。MDM2の増幅をもつ脂肪肉腫細胞においては、正常脂肪細胞に比べ、他の間葉系細胞へ再分化させやすく、分化能の違いを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Adipose-derived stem cells (ADSCs) were investigated for regeneration of bone and soft tissue defect after tumor excision. Bone defect model in rat histologically proved better osteogenesis in ADSCs grafted model than in control model. MDM2 was focused for the differences of stem cell differentiation potential. Liposarcoma which has higher amplification of MDM2 showed higher differentiation potential to mesenchymal cells than regular adipose cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟部腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

四肢に発生する骨腫瘍、軟部腫瘍の切除手術を行うと、骨欠損、軟部組織欠損が生じ、機能的な問題も生じるため、さまざまな再建手術が行われている。骨の欠損に関しては、人工関節、人工骨移植、自家骨移植などがあり、軟部組織欠損に関しては、皮弁術などがある。理想的な再建方法は、採取部位の犠牲が少なく、かつ自己の組織で再生され、永続的に機能するものである。

近年、細胞を使った組織の再生医療は、あらゆる生体組織で盛んに試みられている。細胞のソースとして、ES細胞やiPS細胞、骨髄間葉系幹細胞などがあげられる。しかし、ヒトの細胞を体外で培養、分化させることには、倫理的な面や操作上の問題などが多くあるのが現実である。

脂肪組織の中には、未分化な多能性細胞が存在することが明らかになっている(Zuk PA, et al.: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-228, 2001)。すなわち、脂肪の間質には未分化な細胞群が存在し、その一部に単一クローンから多方向に分化する幹細胞が確認され、脂肪由来幹細胞とよばれる。これは、脂肪、軟骨、骨、骨格筋、心筋、腱、神経、血管などへ分化誘導できる可能性が示されている(Cowan CM, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature Biotechnology*. 22, 560, 2004 他)。他の骨髄間葉系幹細胞などとくらべると、採取が容易かつ大量にとることができるため、再生医療でネックとなる培養操作を行わなくても十分な移植細胞数が得られる。世界では乳癌切除後の乳房再建や虚血性心疾患に対する臨床試験がすでに始められているが、整形外科分野での応用はまだ少ない。厚生労働省の認可した幹細胞治療臨床試験でもまだ脂肪由来幹細胞は行われていない。

また、脂肪由来幹細胞移植治療に、組織再生や修復能があることは確認されているが、その作用機序は未知な部分が多い。Freiserらはラットの腎臓虚血モデルにおいて、腎動脈をクランプの後、脂肪由来幹細胞投与群と非投与群を比較したところ、投与群では全例生存したが、非投与群では半数が翌日死亡したと報告した。移植した幹細胞が分化するだけの時間ではなく、細胞が分化する以外の機序の関与が濃厚であると考えられる。すなわち、この幹細胞移植治療には、細胞のホーミング、分化、各種成長因子の放出などが複雑に貢献していると考えられる。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、腫瘍切除後に生じる骨欠損、軟部組織欠損に対し、動物モデルを用いて脂肪由来幹細胞を用いた細胞移植療法

を行い、有効性とその作用機序を検証することである。これまで申請者は、癌細胞やリンパ球、幹細胞に GFP (緑) や RFP (赤) の蛍光蛋白を導入し、in vivo イメージングを行い、さまざまな細胞の作用をとらえてきた。(Hasegawa A, Hayashi K, et al. *J Allergy Clin Immunol* 125:461-468,2010, Kishimoto H, Zhao M, Hayashi K, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:14514-7,2009, Hayashi K, et al. *Cancer Res*. 67:8223-8,2007)。

このイメージング技術を用いて移植した細胞の動態を直接観察し、脂肪由来幹細胞の有効性、機序を明らかにする

第一の目標は、脂肪由来幹細胞の骨軟部組織での有用性の証明である。ラットを用いた大腿骨骨欠損モデル、皮下組織欠損モデルを用い、脂肪幹細胞移植治療を行い組織再生を検証する。分化する以外の作用として、移植部位の組織から VEGF や HGF などの成長因子の測定を行い、分化作用以外のメカニズムも明らかにし、脂肪由来幹細胞移植の意義を明確にする。これらの結果から、どのような疾患に、どれくらいの量をどのタイミングで何回移植するのがよいのか明らかにする。本研究の最終的な目的は、脂肪由来幹細胞などの体性幹細胞の治療の有効性と限界をみきわめることである。分化能力の限界と、成長因子放出などのソースとしての役割をはっきりさせることは、否定的な研究ではなく、より安全かつ有効な細胞移植治療法へと導くことができる。幹細胞治療は脂肪由来幹細胞のようなものから ES 細胞までひとくくりで考えられ、腫瘍化など危険な面が前に出るが、体性幹細胞の分化能力、安全性がわかれば、むしろ臨床応用は早まる可能性がある。現在脂肪幹細胞の分離は手技的に安定しており、有効性と安全性を確実にしめせば、すぐにも臨床応用は可能である。また、細胞移植を伴う再生医療は、CPC などの巨額な設備が必要なのが現状であるが、分離のみで行える脂肪幹細胞移植は小施設でも一般的に行える有望な治療法と期待される。

3. 研究の方法

動物モデルの骨軟部組織の欠損に対し、自己脂肪由来幹細胞を用いた細胞移植療法を行い、有効性とその作用機序を検証することを目的とし実験を行った。ラットを用いた大腿骨骨欠損モデルを用いて脂肪由来幹細胞の採取、移植を行い、組織再生を検証した。大腿骨に創外固定を装着し、骨欠損を作成した。鼠径部の脂肪組織を 2g 採取し、組織破砕、コラゲナーゼ処置、フィルター、遠心分離を行うことで、幹細胞を含む間質細胞を得ることができた。これをコラーゲンゲルと骨欠損部に移植した。移植後 3 週で組織学的に検討を行った。移植した幹細胞を追跡するため、蛍光イメージング標識の PKH を使用した。

細胞のラベリングが可能であり、動物に標識した細胞を移植し組織評価を行った。

骨再生の実験として、壊死骨の再生研究を行った。マウスから頭蓋骨を摘出した後、液体窒素で凍結処理し、骨を壊死させた。これを生体内で骨再生を促すため、まず *in vitro* の実験を行った。凍結した骨を培養液にいれ、その上に脂肪幹細胞を培養した。1週間後に摘出し、組織学的に検討した。

脂肪細胞からの分化誘導に関する *in vitro* の実験、ヒト検体を用いた臨床試験を中心に行った。倫理審査委員会の承認を得て、正常脂肪、脂肪由来腫瘍をヒトから採取し、培養した。分化に關与する遺伝子の模索のため、MDM2 が高発現する脂肪肉腫細胞も使用し、比較検討した。

各間葉系幹細胞を Mesenchymal Adipogenesis Kit (Millipore) を使用して、脂肪分化誘導し、脂肪分化誘導後 21 日以降に Oil red O 染色を行った。色素の溶出液を比色定量し得られた吸光度のデータを Student's t 検定で比較した。また、各間葉系幹細胞を Osteogenesis Culture Kit (Cosmobio) を使用して、骨分化誘導した。骨分化誘導後 7 日目以降に ALP 染色、21 日目以降に Alizarin Red S 染色を行った。ALP 染色および Alizarin Red S 染色後、マクロ写真から Image J を用いて特定色域面積を測定し、Mann-Whitney 検定で評価した。

4. 研究成果

ラットを用いた大腿骨骨欠損モデルを用いて脂肪由来幹細胞の採取、移植を行い、組織再生を検証した。大腿骨骨欠損に脂肪由来幹細胞とコラーゲンを移植した。移植後 3 週で、コントロール群と比較し、脂肪幹細胞移植群の骨形成は組織学的に旺盛であることが確認された。コントロール群では線維性の連続が主体であったが、移植群では骨形成が見られた。脂肪幹細胞移植が骨形成に有意義であることが示された。移植した幹細胞を追跡するため、蛍光標識の PKH を使用した。細胞のラベリングが可能であり、動物に標識した細胞を移植した。しかし、組織評価では標識の確認が困難であった。標識率、切片の作成、脱灰操作などに問題があると考えられた。

壊死骨の再生研究はマウスから頭蓋骨を摘出した後、液体窒素で凍結処理し、骨を壊死させた。凍結した骨を培養液にいれ、その上に脂肪幹細胞を培養した。1週間後に摘出し、組織学的に骨表面に細胞が生着することが確認された。

臨床での骨腫瘍の手術は、摘出した腫瘍骨を再利用することが行われている。再利用の際に、液体窒素で腫瘍細胞を不活化するが、その際に、骨細胞も死滅するため、一旦骨は壊死となる。この壊死骨を再生させるためには、通常年単位の月日が必要とされるが、幹

細胞治療によりこれが促進される可能性がある。*In vitro* の実験でまず壊死骨と脂肪幹細胞の反応を確認し細胞が壊死骨に生着することが確認された。

脂肪由来の腫瘍は通常脂肪に比べ MDM2 の増幅が確認されている。MDM2 の増幅による p53 遺伝子の抑制が分化能にどう影響するかを調べた。倫理審査委員会の承認を得て、正常脂肪、脂肪由来腫瘍をヒトから採取し、培養した。正常脂肪組織、高分化型脂肪肉腫 (ALT) のいずれからも初代培養において、段階的な形態変化を伴って紡錘形の線維芽細胞様の細胞が精製・培養された。すなわち、単胞性の脂肪滴を含んだ成熟脂肪細胞が、次第に細胞質を伸ばし、脂肪滴が小さく多数になり、脂肪滴が減少するとともに細胞核が中心に移動して、最終的には線維芽細胞様の細胞となり、活発な増殖活性を示した。次にそれぞれの増殖能と分化能を比較することで、腫瘍の遺伝子異常が細胞の分化に対しても影響を調べた。各間葉系幹細胞を Mesenchymal Adipogenesis Kit (Millipore) を使用して、脂肪分化誘導し、脂肪分化誘導後 21 日以降に Oil red O 染色を行った。いずれからも Oil red O に染まる多数の脂肪滴を含んだ脂肪細胞が多数、分化誘導された。色素の溶出液を比色定量し得られた吸光度のデータを Student's t 検定で比較した。溶出液の吸光度の平均値 (正常脂肪 vs ALT) は、0.522 vs 0.412 ($p < 0.01$) ($n=4$, duplicate) で有意差をもって正常脂肪群の吸光度が高く、分化傾向の強いことがわかった。また、各間葉系幹細胞を Osteogenesis Culture Kit (Cosmobio) を使用して、骨分化誘導した。骨分化誘導後 7 日目以降に ALP 染色、21 日目以降に Alizarin Red S 染色を行った。いずれも ALP 染色で青色に、Alizarin Red S 染色で赤色に染まる像が得られ、骨分化が認められた。ALP 染色および Alizarin Red S 染色後、マクロ写真から Image J を用いて特定色域面積を測定し、Mann-Whitney 検定で評価した。ALP 染色後、特定色域面積の平均値 (正常脂肪 vs ALT) は、363 vs 15235 ($p < 0.01$) ($n=4$, duplicate) であった。Alizarin Red S 染色後、特定色域面積の平均値は、242 vs 2587 ($p < 0.01$) ($n=4$, duplicate) であった。以上より、骨分化においては有意差をもって肉腫群の骨分化傾向がより強いことがわかった。同一ヒト個体の正常脂肪組織と ALT 由来 MSC の脂肪および骨分化能の比較を行い、脂肪分化能は正常脂肪群で高く、骨分化能は ALT 群で高かった。

脂肪組織中に間葉系細胞への分化能を有する間葉系幹細胞が見出され、再生医療の観点から注目を集めている。脂肪系腫瘍の異常遺伝子型として種々のものが報告されており、診断にも応用されている。中でも高分化型脂肪肉腫等にみられる MDM2 遺伝子の増幅は、p53 遺伝子の機能を抑制する働きがある。

MDM2 遺伝子の増幅をもつ脂肪系腫瘍細胞においては、正常脂肪細胞に比べ、他の間葉系細胞へ再分化させやすいと推測された。脂肪細胞および脂肪肉腫細胞からの培養で幹細胞の採取に成功し、分化能の違いも示すことができた。

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 13 件)

Fang X, Murakami H, Demura S, Hayashi K, Matsubara H, Kato S, Yoshioka K, Inoue K, Ota T, Shinmura K, Tsuchiya H. A novel method to apply osteogenic potential of adipose derived stem cells in orthopaedic surgery. PLoS One. (2014) 19;9(2):e88874. 査読有 DOI 10.1371/journal.pone.0088874

Miwa S, Yano S, Tome Y, Sugimoto N, Hiroshima Y, Uehara F, Mii S, Kimura H, Hayashi K, Efimova EV, Fujiwara T, Tsuchiya H, Hoffman RM. Dynamic color-coded fluorescence imaging of the cell-cycle phase, mitosis, and apoptosis demonstrates how caffeine modulates cisplatin efficacy. J Cell Biochem. (2013) 114(11):2454-60. 査読有 DOI 10.1002/jcb.24593

Hayashi K, Tsuchiya H, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Takeuchi A, Kimura H, Miwa S, Inatani H, Okamoto H, Yamada S, Ikeda H, Sawada-Kitamura S, Nojima T, Ooi A, Otsuka T. Diagnosis and treatment of low-grade osteosarcoma: experience with nine cases. Int J Clin Oncol. (2013) in press. 査読有 DOI 10.1007/s10147-013-0592-z
林克洋, 土屋弘行, 山本憲男, 白井寿治, 西田英司, 丹澤義一, 武内章彦, 木村浩明, 三輪真嗣, 五十嵐健太郎 明細胞肉腫の治療成績、日整会誌 (2012) 86:675-678 査読無

Miwa S, Nishida H, Tanzawa Y, Takata M, Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Kimura H, Igarashi K, Mizukoshi E,

Nakamoto Y, Kaneko S, Tsuchiya H. TNF- α and tumor lysate promote the maturation of dendritic cells for immunotherapy for advanced malignant bone and soft tissue tumors. PLoS One. (2012) 7(12):e52926. 査読有 DOI 10.1371/annotation/7c0f14e6-cfba-4f5f-b93d-1a149eaeec96

Suganuma S, Tada K, Hayashi K, Takeuchi A, Sugimoto N, Ikeda K, Tsuchiya H. Uncultured adipose-derived regenerative cells promote peripheral nerve regeneration. J Orthop Sci. (2012) 18:145-151. 査読有 DOI 10.1007/s00776-012-0306-9

Kimura H, Tome Y, Momiyama M, Hayashi K, Tsuchiya H, Bouvet M, Hoffman RM. Imaging the inhibition by anti- $\beta 1$ integrin antibody of lung seeding of single osteosarcoma cells in live mice. Int J Cancer. (2012) 131 :2027-33 査読有 DOI 10.1002/ijc.27475

Yamamoto N, Hayashi K, Tanzawa Y, Kimura H, Takeuchi A, Igarashi K, Inatani H, Shimozaki S, Kitamura S, Tsuchiya H. Treatment strategies for well-differentiated liposarcomas and therapeutic outcomes. Anticancer Res. (2012) 32: 1821-5 査読有

Hayashi K, Kimura H, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Kishimoto H, Hasegawa A, Bouvet M, Hoffman RM. Comparison of Cancer-Cell Seeding, Viability and Deformation in the Lung, Muscle and Liver, Visualized by Subcellular Real-time Imaging in the Live Mouse. Anticancer Res (2011) 31:3665-72 査読有

Takata M, Sugimoto N, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Nishida H, Tanzawa Y, Kimura H, Miwa S, Takeuchi A, Tsuchiya H.

Activity of bone morphogenetic protein-7 after treatment at various temperatures: Freezing vs. pasteurization vs. allograft. *Cryobiology* (2011) 63:235-239 査読有 10.1016/j.cryobiol.2011.09.001

Hayashi K, Karita M, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Takeuchi A, Kimura H, Miwa S, Tsuchiya H. Functional outcomes after total scapulectomy for malignant bone or soft tissue tumors in the shoulder girdle. *Int J Clin Oncol* (2011) 16:568-73 査読有 10.1007/s10147-011-0229-z

林克洋, 土屋弘行. 知っておきたい 脂肪由来幹細胞移植. *臨床整形* (2011) 46: 864-866 査読無

〔学会発表〕(計 11 件)

Hayashi K, Tsuchiya H, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Takeuchi A, Tanazawa Y, Inatani H, Okamoto H, Yamada S, Otsuka T. Long-term histological findings of oncologically sterilized autoclaved bone, irradiated bone and frozen bone. 低温医学学会総会 2013.11.28-29 今池ガスビル (名古屋)

Hayashi K, Tsuchiya H, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Tanazawa Y, Takeuchi A, Inatani H, Otsuka T. Biological reconstruction after excision of bone metastasis using tumor-bearing autografts treated with liquid nitrogen. 33rd Hong Kong Orthopedic Association Annual Congress 2013.11.23-24 (China)

Hayashi K, Yamada S, Inatani H, Okamoto H, Tsuchiya H, Otsuka T. Long term result of “second-look operation” following unplanned excision of soft tissue malignancy. International Society of Limb Salvage 17th General Meeting. 2013.6.11-13 Plazzo Re Enzo (Italy)

Hayashi K, Tsuchiya H, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Takeuchi A, Kimura H, Miwa S, Hoffman RM, Otsuka T. Leading

Technology for in vivo Fluorescent Sarcoma Imaging. The 26th European Musculo Skeletal Oncology Society 2013.5.29-31 Swedish Exhibition and Congress Center (Sweden)

林克洋 松下廉 山田聡 稲谷弘幸 立松尚衛 岡本秀貴 土屋弘行 大塚隆信. 骨軟部悪性腫瘍に対する直流通電療法の抗腫瘍効果. 第 40 回日本生体電気・物理刺激研究会 2013.3.8-9 ウエスティン都ホテル (京都府)

林克洋 村瀬熱紀 山田聡 稲谷弘幸 岡本秀貴 大塚隆信 土屋弘行. 15 年以上経過し筋肉内転移が診断された腎細胞癌の 2 例 2013.2.22-23 第 32 回日本画像医学会東京ステーションコンファレンス (東京都)

林克洋、土屋弘行、山本憲男、白井寿治、西田英司、丹沢義一、武内章彦、木村浩明、三輪真嗣、五十嵐健太郎、稲谷弘幸、下崎真吾、大塚隆信. 転移性骨腫瘍の切除後に液体窒素処理した腫瘍骨を用いた生物学的再建. 日本低温医学会総会 2012.11.21-22 イイノコンファレンスセンター (東京都)

林克洋、大塚隆信、土屋弘行. 低悪性度の骨肉腫の診断と治療について. 中部整形外科災害外科学会 2012.10.5-6 フェニックスプラザ (福井県)

Hayashi K, Tsuchiya H, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Takeuchi A, Kimura H, Miwa S, Hoffman RM. Comparison of Sarcoma Cell Seeding in the Lung and Muscle, Visualized by Real-Time Imaging in the Live Mouse. AAOS American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2012.2.9 Moscone center (USA)

Hayashi K, Tsuchiya H, Takeuchi A, Otsuka T, Hoshi M, Ieguchi M, Chosa E, Sakamoto T, Tajino T, Yamada H, Yokouchi M, Sakayama K, Kidani T, Isobe K, Maehara H,

Tome Y. Multicenter Study of Caffeine-potentiated Chemotherapy for Bone and Soft Tissue Sarcoma. 9th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society Meeting (APMSTS) 2012.9.7-9 Hilton Kuala Lumpur (Malaysia)

Hayashi K, Tsuchiya H, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Tanzawa Y, Takeuchi A, Kimura H, Miwa S, Igarashi K, Hoffman RM. Comparison of Sarcoma Cell Seeding, Viability and Deformation in the Lung, Muscle and Liver, Visualized by Subcellular Real-Time Imaging in the Live Mouse. International Society of Limb Salvage/Musculoskeletal Tumor Society Combined Meeting、2011.9.17 China National Convention Center (China)

林克洋, 土屋弘行, 山本憲男, 白井寿治, 西田英司, 丹沢義一, 武内章彦, 木村浩明, 三輪真嗣, 五十嵐健太郎, ロバート M ホフマン. シンポジウム「腫瘍の転移」肉腫細胞の可視化モデルを用いた肉腫転移機構の解明. 日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.20 ベイシア文化ホール(群馬県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 克洋 (HAYASHI KATSUHIRO)
名古屋市立大学・医学部・講師
研究者番号：80507054

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし