

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	柴山 尚大
学位論文題目			
間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化段階に応じた骨芽細胞への分化能， 増殖能，細胞老化についてのin vitroにおける検討			
共著者名			
竹川政範，松田光悦，稲積実佳子，伊藤広也，近藤英司			
未公表			
研究目的			
<p>骨髄由来間葉系幹細胞（BM-MSC）はin vitroで分化能および増殖能を示し，骨組織の再生医療だけでなく、様々な分野で臨床に利用されている。しかし，BM-MSCは骨髄中の有核細胞の0.01～0.001%と少なく，幹細胞治療のために十分な細胞数を得るには多量の骨髄を採取する必要がある。一方，体重の平均約20%を占める脂肪組織から得られる脂肪組織由来幹細胞（ADSC）も多分化能を持った組織幹細胞であることが明らかになり，骨髄に代わる幹細胞として注目されている。幹細胞（MSC）を組織再生に使用する上で問題点は，それぞれの組織から得られるMSCは，分化能や細胞特性が異なることである。したがって，各組織から得られたMSCごとの細胞特性を理解し比較検討することは，MSCによる再生医療を容易にそして効率的に行う上で重要であると考えられる。</p> <p>本研究は継代数の異なるラットBM-MSCとADSCを用い，それぞれの細胞特性すなわち増殖能，骨芽細胞への分化能，そして複製老化を比較し，骨組織の再生医療における両者の有用性について比較検討した。</p>			

【BM-MSCとADSCの培養】

F344ラットの大腿骨と肩胛部から脂肪を無菌的に採取した。

採取した脂肪は0.075% type I コラゲナーゼ (Sigma) 含有PBSで、37°C 30分間の酵素処理後、遠心分離して細胞ペレットを得た。細胞ペレットを標準培地で再懸濁しADSC第0継代目 (ADSC-P0) として培養した。

大腿骨から骨髓液を採取し、10% FBS (GIBCO) と複合抗生物質を含有したDMEM (Sigma) の培地 (標準培地) でBM-MSCの第0継代目 (BM-MSC-P0) として培養した。

継代作業は、0.2% トリプシンと1mMEDTAで5分間処理し、 1×10^5 細胞/mlで再播種した後、80% コンフルエントで継代培養を重ね、BM-MSC-P2, -P8及びADSC-P2, -P8を得た。

【骨芽細胞への分化】

MSCがコンフルエントに達した後、標準培地に100nM dexamethasone (Wako), 10 nM β -glycerol phosphate (Sigma), 50 μ M ascorbic acid 2-phosphate (Sigma)を加えた骨芽細胞分化誘導培地に交換した。標準培地のみで培養したものをコントロールとした。

【細胞増殖能の検討】

Flow cytometry (FCM)を用い、Plopidium Iodide (PI;Sigma) 染色による細胞増殖能の評価を行った。

【骨芽細胞への細胞分化能および細胞老化の検討】

本研究は定量的Real time-PCR (RT-PCR) (Light Cycler480 II ;Roche)をTaqMan assayで行い、データ分析は $\Delta \Delta$ CT法を用いた。BM-MSC-P2, -P8, 及びADSC-P2, -P8に0時間をコントロールとし、経時的に1, 2, 4, 6, 12, 24時間まで骨芽細胞分化誘導培地で培養して分化誘導後、RNAを抽出した。

骨芽細胞への分化能の評価のために間葉系幹細胞から前骨芽細胞への分化を決定する因子としてRunx2, 前骨芽細胞から未熟骨芽細胞への因子としてOsterix, 分化の後期で石灰化が起こる時期に発現するOsteocalcinを定量化した。また細胞老化の評価のためにP16を定量化した。

成 績

BM-MSCとADSCの増殖能の比較

ラットBM-MSCとADSCの同じ継代数ではBM-MSC方が増殖能が高く、継代を重ねてもBM-MSCの増殖能は維持されている傾向を示した。

BM-MSCとADSCの骨芽細胞への分化能の比較

BM-MSCとADSCのRunx2, Osterix発現

Runx2とOsterixの発現量は、ADSCよりBM-MSCの方が多いたことが示された。

Runx2とOsterixの24時間の発現量総和の比較では、OsterixにおいてADSCの発現量が有意に少なく、継代による骨芽細胞への分化能低下はADSCの方が少ないことが示された。

BM-MSC/ADSCのRunx2とOsterix発現量の比較

Runx2において、ADSCに対するBM-MSCの発現量は、P2で3.05倍、P8で2.87倍であった。OsterixにおいてはP2で3.89倍、P8で1.56倍であり、P2とP8の両方でBM-MSCの方が、Runx2とOsterix発現量が多いことが示された。また、Runx2とOsterix発現量はADSCに比べBM-MSCの方が多いが、継代による骨芽細胞への分化能の低下は、ADSCの方が少ないことが示された。

BM-MSCとADSCのOsteocalcin発現

BM-MSC-P2, -P8, 及びADSC-P2, -P8において、Osteocalcin発現量を分析したところ、48時間以内に発現は認めなかった。

BM-MSC/ADSCのP16遺伝子発現量の比較

P2とP8の両方でBM-MSCの方がADSCよりP16遺伝子の発現量は少なかった。P2からP8へ継代を重ねるとBM-MSCは1.61倍の増加量、ADSCは2.36倍の増加量で、BM-MSCの方がP16遺伝子発現の増加量は少なかった。

考 案

【増殖能と幹細胞の継代数と増殖能について】

ラットBM-MSCとADSCの同じ継代数ではBM-MSC方が増殖能が高く、継代を重ねてもBM-MSCの増殖能は維持されている傾向を示した。このことから、幹細胞治療において必要な細胞数を確保するための増殖能に関しては、ADSCと比較した場合、BM-MSCの方が再生医療に適した幹細胞源と考えられた。

【幹細胞の継代と骨芽細胞への分化能に関して】

Runx2とOsterixの発現量は、ADSCよりBM-MSCの方が多いたことが示され、BM-MSCは骨芽細胞への分化能が高いことが示唆された。このようにBM-MSCは骨再生医療に利用する上で、骨芽細胞の細胞源となりうるが、早期の継代数で移植することが最適な条件と考えられた。一方で、ADSCは継代を重ねて移植しても、骨芽細胞への分化能の低下が少ないことから、継代数の影響を少なく移植でき、同様に骨芽細胞の細胞源となりうると思われた。

【幹細胞の継代数と細胞老化に関して】

本研究では、BM-MSCとADSCとの間に明らかな増殖能と骨芽細胞への分化能の違いを認めただことから、複製による細胞老化が関与している可能性があると考えた。同じ培養環境、同じ継代数ではADSCに比較してBM-MSCの方がP16遺伝子の発現量は少なく、継代を重ねてもBM-MSCの方がP16遺伝子発現の増加量は少なかった。このことから、BM-MSCの方が細胞老化しにくいことが示された。

結 論

骨芽細胞への分化能，増殖能，細胞老化について，ラットを用いた動物実験によってBM-MSCとADSCを比較した．その結果，BM-MSCは骨再生医療に利用する上で，早期の継代数で用いることが最適な条件と考えられた．一方で，ADSCは継代を重ねて用いても，骨芽細胞への分化能の低下が少ないことから，継代数の影響を少ない骨芽細胞の細胞源となりうると考えられた．また，幹細胞の品質に影響を与える因子の1つとして，複製老化が関与していると考えられた．




引 用 文 献

- 1) Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K, Zhou C.: Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage, and Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* 2008 Aug;17(4):761- 773.
- 2) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH.: Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001 7(2):211-228.
- 3) Wall ME, Bernacki SH, Lobo EG.: Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2007 Jun;13(6):1291-1298.

参 考 論 文

なし

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	柴山 尚大
審査委員長 <u>新谷 洋</u>  審査委員 <u>高橋 隆</u>  審査委員 <u>松田光悦</u> 			
学 位 論 文 題 目 間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化段階に応じた骨芽細胞への分化能、増殖能、細胞老化についての in vitro における検討			
<p>本研究は、ラット由来の骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) と脂肪組織由来幹細胞 (ADSC) について、それぞれの細胞特性すなわち増殖能、骨形成細胞への分化誘導能、そして癌抑制遺伝子を継代数を変えて比較し、骨組織の再生医療における両者の有用性について比較検討したものである。</p> <p>研究の背景として、骨組織再生医療の分野では、再生培養骨を用いた骨再生が盛んに研究されており、主に BMSC が十分な分化誘導能、増殖能を示し、骨芽細胞への分化も良好であることから臨床試験が進んでいる。しかし生体からの採取が侵襲的であり、かつ採取量に制限がある。</p> <p>一方、ADSC も多分化能、特に骨芽細胞やほかの間葉系細胞への分化能をもつといわれており、かつ豊富な細胞数の確保と非侵襲的な採取が可能であるため、臨床応用が可能と考えられる。しかし BMSC、ADSC の増殖能、骨形成細胞への分化誘導能、さらに癌抑制遺伝子など細胞特性の違いについては十分に比較検討されておらず、骨組織の再生医療における両者の有用性が十分に検討されていないため、本検討が行われた。</p>			

本研究は、F334 ラットの大腿骨と肩胛部から骨髓並びに脂肪を無菌的に採取し、それぞれ通法に従った処理の後、継代培養し第2継代と第8継代の細胞を実験に使用した。

増殖能の分析に PI 染色を施し FACS 解析を行い、同じ継代数では BMSC の方が高い増殖能を示し、継代を重ねても BMSC の増殖能は維持されているという結果を得た。骨芽細胞への分化誘導能を検討するために BMSC, ADSC から骨芽細胞へ分化する過程において発現する *runx2*、*osterix* を指標として検討した。その結果 *runx2* 発現量は、BMSC、ADSC 共に P8 より P2 の方が多く、BMSC, ADSC 共に P2 の方が骨芽細胞に分化しやすい。また *runx2*、*osterix* 発現量は BMSC の方が多いことから、前骨芽細胞、骨芽細胞に分化しやすいことを示し、継代による骨芽細胞への分化能の低下は、BMSC では大きく、ADSC は小さいことを示した。次に BMSC において 24 時間を越えると形態異常や細胞死する細胞を認めため、癌抑制遺伝子 P16 について比較検討している。ADSC の方が P16 遺伝子の発現量は多く、継代を重ねても P16 遺伝子の発現は高く、ADSC の方が癌化のリスクが少ないことを示した。これらの結果より、1) BMSC は骨再生医療に利用する上で、有用な骨芽細胞の細胞源であり、早期継代数で移植することが最適な条件である、2) ADSC は継代数の影響を少なく移植できるため、細胞数が必要な場合には、BMSC に代わる細胞源となりうる、3) ADSC においても本実験の結果から骨再生医療への応用の可能性が広がった、と結論した。

したがって、本研究結果から、これらの幹細胞は骨創の治療に関して極めて有用な細胞源であることを示し、かつ将来的に新たな治療法開発につながる情報を提供したものである。

また本学位論文提出者は、当該および関連領域について十分な知識を有しており、諮問審査においても明快な回答が得られた。よって本審査委員会は本論分が医学博士の学位論文に値するものと判断した。