

学位論文

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、癌化についての *in vitro* における検討

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

柴山 尚大

(竹川 政範、松田 光悦、稲積 実佳子、伊藤 広也、近藤 英司)

学位論文

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、癌化についての in vitro における検討

間葉系幹細胞の in vitro での検討

柴山尚大，竹川政範，松田光悦，稲積実佳子，伊藤広也，近藤英司
旭川医科大学医学部歯科口腔外科学講座

主任教授：松田光悦

旭川医科大学医学部歯科口腔外科学講座

原稿総頁数;11

図および表の総数;6

連絡先

柴山尚大

078-8510

北海道旭川市緑が丘東 2 条 1 丁目 1 番 1 号

旭川医科大学医学部歯科口腔外科学講座

電話番号 ; (0166)68-2270

FAX 番号 ; (0166)68-2267

e-mail;naos74@asahikawa_med. ac. jp

緒言

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell=MSC) は、幹細胞を用いた組織再生治療において高い効果が期待されている。特に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いる。

幹細胞源としては、骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone marrow-derived Mesenchymal Stem Cell=BMSC) 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、様々な分野で臨床試験が進められている [1-4]。しかし BMSC は骨髄中の有核細胞の 0.01~0.001%と少なく、幹細胞治療のため十分な細胞数を得るためには多量の骨髄を採取する必要であり、かつその操作は侵襲的である。一方、骨髄組織以外にも多分化能を持った組織幹細胞の存在することが明らかになり、幹細胞の供給源として注目されている。なかでも体重の平均約 20%を占めるといわれる脂肪組織から得られる脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived Stem Cell=ADSC) は、比較的侵襲的かつ簡便に採取でき、培養せずに臨床応用が可能な程豊富な細胞数を得ることができ、多岐にわたる分化能と高い増殖能を備えているといわれている [5-7]。

しかし、問題点として、BMSC と ADSC は採取量、採取による生体への侵襲程度が異なり、骨再生医療に利用する上で、細胞数を増殖させるために継代を行う必要がある。その際の BMSC と ADSC の増殖能、骨芽細胞への分化能、さらに癌化など細胞特性の違いについては十分に明らかにされておらず、細胞特性に統一された見解がない [8] [9]。これら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なことと考えられる。

本研究はラット由来のBMSCとADSCについて、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、そして複製老化の指標である*p16*癌抑制遺伝子を比較し、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。

材料と方法

本研究において、ラット BMSC と ADSC は、予備実験により分化能、増殖能、P16 癌抑制遺伝子発現の差が明らかに比較できた第 2 継代目と第 8 継代目を用いた。

【BMSC と ADSC の培養】

F344 ラット（オス，8 週齢，5 匹；三共ラボサービス INC, Tokyo, Japan）から大腿骨と単徑部の脂肪を無菌的に切離し摘出した。

大腿骨は骨端を切除し，10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO: Life technology Japan, Tokyo, Japan) と複合抗生物質 (streptomycin-penicillin-fungizone : GIBCO : Life technology Japan, Tokyo, Japan) を含有した Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma, Tokyo, Japan) の標準培地を 20G 針のついた注射筒に入れ骨髓を洗い出し，BMSC の第 0 継代目 (BMSC-P0) として培養した。

脂肪は，0.5 mm 大に切り刻んだ後，0.075% type I collagenase (Sigma, Tokyo, Japan) 含有 PBS で，37°C 30 分間，軽度に振盪させた。Collagenase の反応を停止させるため，10% FBS の入った培地を同量加え，1500rpm で 10 分間遠心分離 (HITACHI, Tokyo, Japan) して細胞ペレットを得た。細胞ペレットは，10% FBS の入った培地の中で再懸濁し，壊死細胞塊を除去するために，80 μ m メッシュのナイロンフィルターで濾過した。濾液を再び遠心分離した後，10% FBS と複合抗生物質の入った培地で再懸濁し，ADSCs 第 0 継代目 (ADSC-P0) として培養した。

両者とも初代培養は 1 週間継続し，その後，0.2% trypsin と 1mMEDTA で 5 分間処理し， 1×10^5 細胞/ml で再播種した。この継代で得た細胞を 2 週間培養し，80% コンフルエントで継代培養を重ね，BMSC-P2，-P8 及び ADSC-P2，-P8 を得た。

【骨芽細胞への分化】

間葉性幹細胞がコンフルエントに達した後，標準培地に，100nM dexamethasone (Wako, Osaka, Japan), 10 nM β -glycerol phosphate (Sigma, Tokyo, Japan), 50 μ M ascorbic acid 2-phosphate (Sigma, Tokyo, Japan) 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) を用いて細胞周期解析と増殖能の評価を行った。100% エタノールで細胞を固定し RNase 処理後，propidium iodide

(PI;Sigma, Tokyo, Japan) で 30 分間室温で染色した後に, FCM 解析を行った. FCM 解析には, FACS Calibur®(Becton Dickinson, NJ, USA) を用い, データの解析は, ModFit LT®(Verity 社)を用いた.

【骨芽細胞への分化能の検討】

骨芽細胞への分化能は Real-Time PCR を用いて mRNA 発現を解析した. 骨芽細胞へ分化する過程において, デキサメタゾン を添加した骨芽細胞誘導培地で BMSC, ADSC を培養することにより, BMSC, ADSC から前骨芽細胞へ分化する際は *runx2*(*runt-related transcription factor 2*), 前骨芽細胞から骨芽細胞へ分化する際は *osterix* が発現することがわかっており, その mRNA 発現を比較検討した.

定量的 Real-Time PCR (Light Cycler® 480 II ; Roche, Basel, Switzerland) により行った. BMSC-P2, -P8, 及び ADSC-P2, -P8 に対して骨芽細胞への分化誘導を行った. デキサメタゾン を添加した骨芽細胞誘導培地を経時的な 24 時間のタイムコースで加え分化誘導後, *runx2*, *osterix* の mRNA を Rneasy Mini Kit®(Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて抽出した. その後, Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit® (Roche, Basel, Switzerland) を用いて cDNA を合成した. 24 時間を越えると, BMSC-P8 を検鏡したところ分化誘導されないままの細胞や平坦で形態の大きな細胞など形態異常を示す細胞が多くみられたため, 本実験においては 24 時間まで解析した. Real-Time PCR の蛍光検出フォーマットは TaqMan®アッセイで行いました. β -*actin* で標準化し, データ分析は $\Delta \Delta$ CT 法を用いた.

【*p16* 癌抑制遺伝子発現の検討】

BMSC-P8 において 24 時間を越えると分化誘導されないままの細胞や分化を起さず平坦で形態の大きな細胞など形態異常を示す細胞を多く認めたため, 癌抑制遺伝子 *p16* について比較検討した. *p16* 癌抑制遺伝子は, 継代とともに増加することもわかっており, 細胞老化の指標としても関与することが報告されている. *p16* 遺伝子は, サイクリン依存性キナーゼとサイクリンの複合体を阻害することで, 間接的に Rb の活性状態を維持し, 細胞周期の G1-S チェックポ

イントを制御し、細胞周期を停止させるとされている。BMSC-P8 ように継代を重ねた MSC を検鏡したところ、形態異常や分化誘導をしない細胞を多数認めたことから、BMSC-P2, -P8, 及び ADSC-P2, -P8 の *p16* 遺伝子の発現量を Real-Time PCR を用いて mRNA 発現を解析した。骨芽細胞への分化能の解析と同様に Real-Time PCR の蛍光検出フォーマットは TaqMan®アッセイで行いました。β-actin で標準化し、データ分析は ΔΔCT 法を用いました。

尚、本実験は、旭川医科大学動物実験委員会の承認を得、旭川医科大学動物実験の取り扱い規約に従って行った。

結果

BMSC と ADSC の増殖能の比較 (図 1)

FCM による細胞周期解析と細胞増殖能の評価を行った結果、P2 と P8 の両方で BM-MSc は ADSC より S 期の細胞比率が高かった。一方、S 間の細胞比率は BMSC-P2 から -P8 への減少率は 52% の差であったが、ADSC では 61% の差であった。

BMSC と ADSC の骨芽細胞への分化能の比較

BMSC と ADSC の *runx2* 発現 (図 2)

BMSC の *runx2* 発現は、P2, P8 共に上昇を認めた。発現量は、いずれの時間においても P2 の方が多く、誘導開始 24 時間で最大 4.4 倍の違いを認めた。

ADSC の *runx2* 発現は、P2 と P8 の両方で減少がみられ、発現量は BMSC と同様に、いずれの時間でも P2 が多く、分化開始 24 時間で最大 6.9 倍の違いを認めた。このことから、BMSC, ADSC 共に P2 の方が前骨芽細胞に分化しやすいことが示された。

BMSC と ADSC の *osterix* 発現 (図 3)

ADSC, BMSC 共に、*osterix* 発現の上昇を認めた。その発現量は、いずれの時間においても P8 に比べ P2 が多く、BMSC では分化開始 12 時間で最大 9.5 倍、ADSC では分化開始 12 時間で最大 3.8 倍の違いがみられた。

このことから、BMSC, ADSC 共に P2 の方が骨芽細胞に分化しやすいことが示されました。

ADSCの発現量に対するBMSCの*runx2*と*osterix*発現 (図4)

同じ継代数でのBMSC, ADSCの24時間発現量総和の比較では, *osterix*において, P2とP8ともにBMSCの方が有意に発現量が多く, BMSCの方が骨芽細胞に分化しやすいことが示された.

BMSCとADSCの第8継代目の発現量に対する第2継代目の発現量 (図5)

*runx2*と*osterix*発現量はBMSC, ADSC共にP2の方が多いたことが示されました. また, *osterix*の発現量において, BMSCではP2とP8間の差が大きく, 一方でADSC-P2と-P8間の差が小さいことから, 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.

BMSC/ADSCの*p16*遺伝子発現量の比較 (図6)

BMSC-P8において24時間を越えると分化誘導されないままの細胞や分化を起さず平坦で形態の大きな細胞など形態異常を示す細胞を多く認めたため, 癌抑制遺伝子*p16*について比較検討した.

同じ培養環境, 同じ継代数ではADSCの方が*p16*遺伝子の発現量は多く, 継代を重ねても, *p16*遺伝子の発現は高いことから, *p16*癌抑制遺伝子の観点では, ADSCの方が癌化のリスクが少ないことが示された.

考察

【BMSCとADSCの増殖能について】

ラットBMSCとADSCの第2継代目と第8継代目において, PI染色によるFCM解析の結果, 同じ継代数ではBMSCがADSCより増殖能が高く, 継代を重ねてもBMSCの増殖能はADSCに比べて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, BMSCの方が再生医療に適した幹細胞源と考えられた. しかし, Pengら[10]は, 3週齢SDラットのBMSCとADSCの第3継代目を用いて, 成長曲線解析や, われわれと同様なFCM解析を行ったところ, BMSCに比較してADSCの方が増殖能が高いと報告している. 報告者によって増殖能が異なる理由として, 培養時の低

酸素状態，血清濃度による栄養状態，継代時のトリプシン濃度など培養環境の違いや継代作業の違いが関与しているといわれている [11-13] . さらにBMSCとADSCは純粋な細胞集団ではなく、多様な前駆細胞によって構成されていることが関与していると考えられる [8] . 本実験においてもこれらの要因が影響を及ぼしている可能性が考えられるため，今後はトリプシン濃度や酸素濃度の調節，FCMを用いた幹細胞マーカーによる分取などを行い，BMSCとADSCの比較を行う必要があると思われた.

【BMSCとADSCの骨芽細胞への分化能について】

BMSC, ADSCから骨芽細胞へ分化する過程において，デキサメタゾンを追加した骨芽細胞誘導培地で培養することにより，BMSC, ADSCから前骨芽細胞へ分化する際は*runx2*，前骨芽細胞から骨芽細胞へ分化する際は*osterix*が発現することがわかっている．本研究ではラットBMSCとADSCの第2継代目と第8継代目を用いて，*runx2*と*osterix*のmRNA発現について定量的Real-Time PCRを行い，骨芽細胞への分化能を比較し，以下の結果が示された.

- ・ BMSC, ADSC共に第2継代目の方が前骨芽，骨芽細胞に分化しやすい.
- ・ 第2継代目，第8継代目共にBMSCの方が前骨芽，骨芽細胞に分化しやすい.
- ・ 継代による骨芽細胞への分化能の低下はADSCの方が少なかった.

Pengら [10] は3週齢のラットを用いて，BMSCとADSCの骨芽細胞への分化能を，ALP活性について比較したところ，BMSCの方が骨芽細胞への分化能が高いというわれわれの結果と同様な報告をしている．また，マウスBMSCの第1継代目と第6継代目の骨芽細胞への分化能を比較したKretlowら [14] の報告においても，第1継代目と比較して第6継代目は有意に骨芽細胞への分化能が低下したというわれわれの結果と同様な報告をしている．これらから，BMSCはADSCと比較して，より有用な骨芽細胞の細胞源であり，BMSCは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.

次に，継代による骨芽細胞への分化能の低下はADSCの方が少なかったという結果に関しても，Wallら [15] はマウスADSCを用いて同様の報告をしている．この結果から，ADSCは，継代数の影響を少なく移植できるため，骨欠損が大きく，細胞数が必要な場合には，BMSCと比較してADSCが有用であると考えられた.

また、本実験の結果においてADSCの*runx2*発現が、P2とP8の両方で減少した点においては、デキサメタゾンの濃度によって骨芽細胞への分化を阻害する報告[16]もあることから、今後は細胞種によって異なるデキサメタゾン濃度での検討も必要と考えられた。

【癌抑制遺伝子 *p16* 発現に関して】

幹細胞は、加齢によって老化の指標ともされる癌抑制遺伝子 *p16* の発現が増加し、機能不全になることが報告されている[17-21]。本研究では、BMSC-P8において24時間を越えると分化誘導されないままの細胞や分化を起こさず平坦で形態の大きな細胞など形態異常を示す細胞を多く認めたため、癌抑制遺伝子 *p16* について比較検討した。

同じ培養環境、同じ継代数ではADSCに比較してBMSCの方が *p16* 遺伝子の発現量は少なく、継代を重ねてもBMSC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、同じ培養条件、同じ継代数ではADSCの方が癌化しにくいことが示された。

MSCは、培養時の低酸素状態、血清濃度による栄養状態、継代時のトリプシン濃度など培養環境の違いや継代作業の違いなどによって生じるDNA傷害性ストレスによって、*p16* 癌抑制遺伝子発現がより増加すると報告[22]されている。本研究結果において同じ培養環境、同じ継代数でBMSC、ADSCを培養しても、*p16* 癌抑制遺伝子発現量に差が生じたことから、BMSC、ADSCのそれぞれに至適培養環境があることが考えられた。これは、マウス胎仔由来線維芽細胞を継代培養する際に培養容器内の酸素濃度を生体内に近いとされる3%に下げて培養すると、分裂寿命を起こさなくなるという報告[23]と類似した結果であった。

BMSCとADSCを効率的に、そして安全に臨床応用していくために、詳細な細胞ごとの特性を把握し、その特性に適した培養環境の確立が今後必要であると考えられた。

結語

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となり、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。

また、ADSCは、継代数の影響を少なく移植できるため、骨欠損が大きく、細

胞数が必要な場合には、ADSC が有用である可能性があることが示唆された。

しかし、BMSC と ADSC を効率的に、そして安全に臨床応用していくために、より詳細な細胞特性を把握し、その特性に適した培養環境の確立が今後必要であると考えられた。

参考文献

- (1) Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belém L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT. :Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003, 107(18):2294-2302.
- (2) Stamm C, Kleine HD, Westphal B, Petzsch M, Kittner C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. :CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg* 2004, 5(3):152-158.
- (3) Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. :Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Jun 25;99(13):8932-8937.
- (4) Aggarwal S and MF Pittenger. :Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005, Feb 15;105(4):1815-1822.
- (5) 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.
- (6) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. :Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 April 2;284(5411):143

-147.

(7)Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, Gleneck K, Shihabuddin L, Tubo R. :Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng* 2002 Oct;8(5):739-751.

(8)Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. :Clarification of the nomenclature for MSC:The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7(5):393-395.

(9) Roura S, Farré J, Soler-Botija C, Llach A, Hove-Madsen L, Cairó JJ, Gòdia F, Cinca J, Bayes-Genis A. :Effect of aging on the pluripotent capacity of human CD105+ mesenchymal stem cells. *Eur J Heart Fail* 2006 Oct;8(6):555-563.

(10)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.

(11) Tunaitis.V, Borutinskaite.V, Navakauskieneetal.R. ;Effects of different sera on adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011 Oct;5(9):733-46.

(12) Yang S, Pilgaard L, Chase LG, Boucher S, Vemuri MC, Fink T, Zachar V. : Defined xenogeneic-free and hypoxic environment provides superior conditions for long-term expansion of human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012 Aug;18(8):593-602.

(13) Valorani MG, Montelatici E, Germani A, Biddle A, D'Alessandro D, Strollo R, Patrizi MP, Lazzari L, Nye E, Otto WR, Pozzilli P, Alison MR. : Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials. *Cell Prolif.* 2012 Jun;45(3):225-238.

- (14) Kretlow JD, Jin YQ, Liu W, Zhang WJ, Hong TH, Zhou G, Baggett LS, Mikos AG and Cao Y. : Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biol.* 2008 Oct 28;9:60.
- (15) 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.
- (16) Li X, Jin L, Cui Q, Wang GJ, Balian G. : Steroid effects on osteogenesis through mesenchymal cell gene expression. *Osteoporos Int.* 2005 Jan;16(1):101-8.
- (17) Zhang YY, Li X, Qian SW, Guo L, Huang HY, He Q, Liu Y, Ma CG, Tang QQ. : Down-regulation of type I Runx2 mediated by dexamethasone is required for 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol.* 2012 May;26(5):798-808.
- (18) Van Zant G, Liang Y: The role of stem cells in aging. *Exp Hematol* 2003 Aug;31(8):659-672.
- (19) Rando TA: Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 2006 Jun 29;441(7097):1080-1086.
- (20) Ruzankina Y, Brown EJ. : Relationships between stem cell exhaustion, tumour suppression and ageing. *Br J Cancer* 2007 Nov 5;97(9):1189-1193.
- (21) Wodarz D: Effect of stem cell turnover rates on protection against cancer and aging. *J Theor Biol* 2007 Apr 7;245(3):449-458
- (22) Kim WY, Sharpless NE. : The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell.* 2006 Oct 20;127(2):265-75.
- (23) Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. : Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2003 Aug;5(8):741-747.

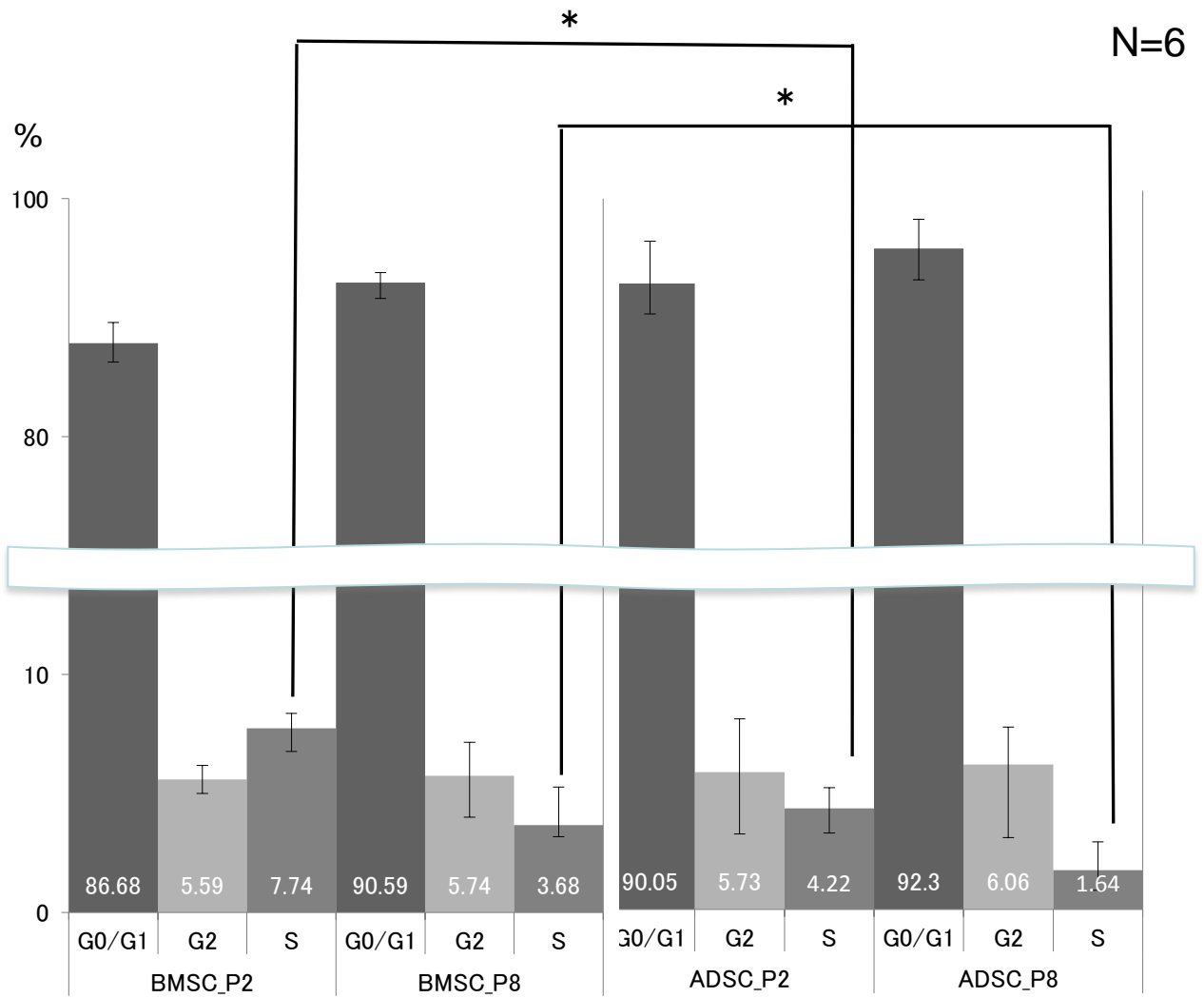


図1

BMSC / ADSC -P2/P8のPI染色によるFCM解析

* ; p < 0.05(t検定)

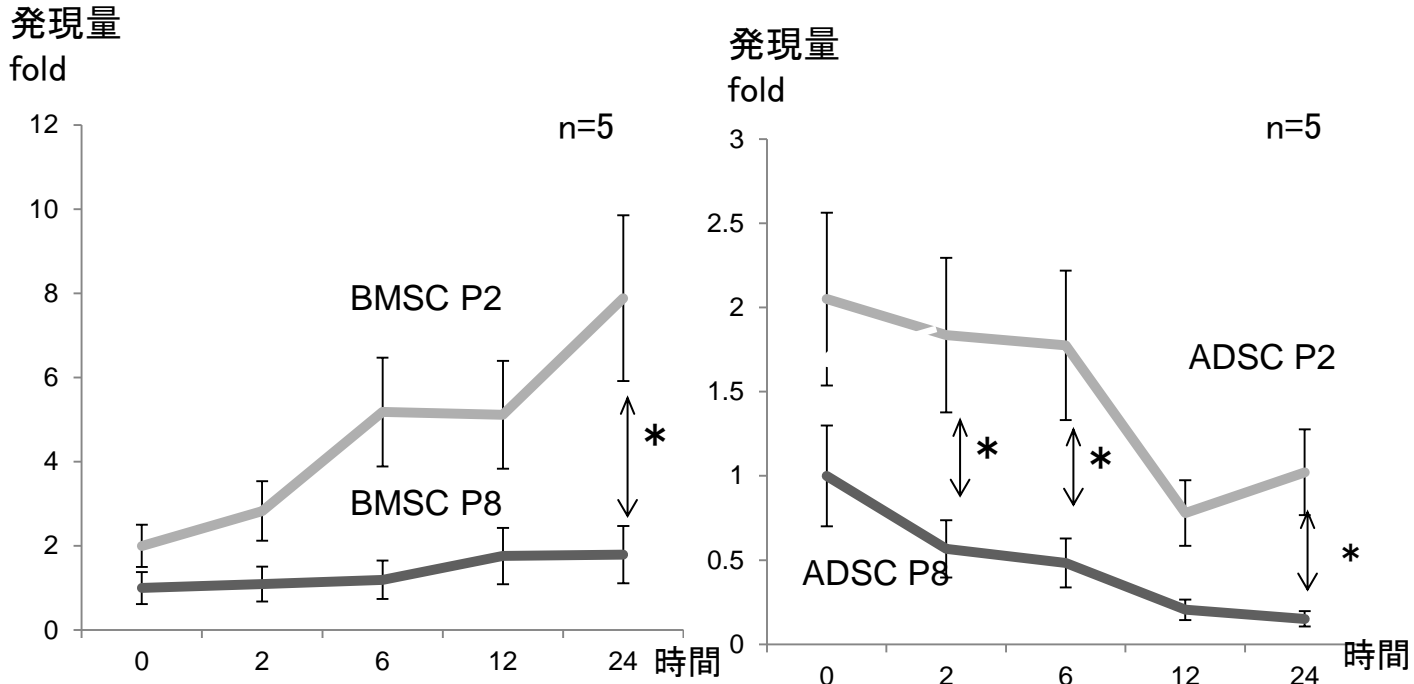


図2 *runx2*発現量
同種間で継代別の*runx2*発現量を比較

* ; p < 0.05 (t検定)

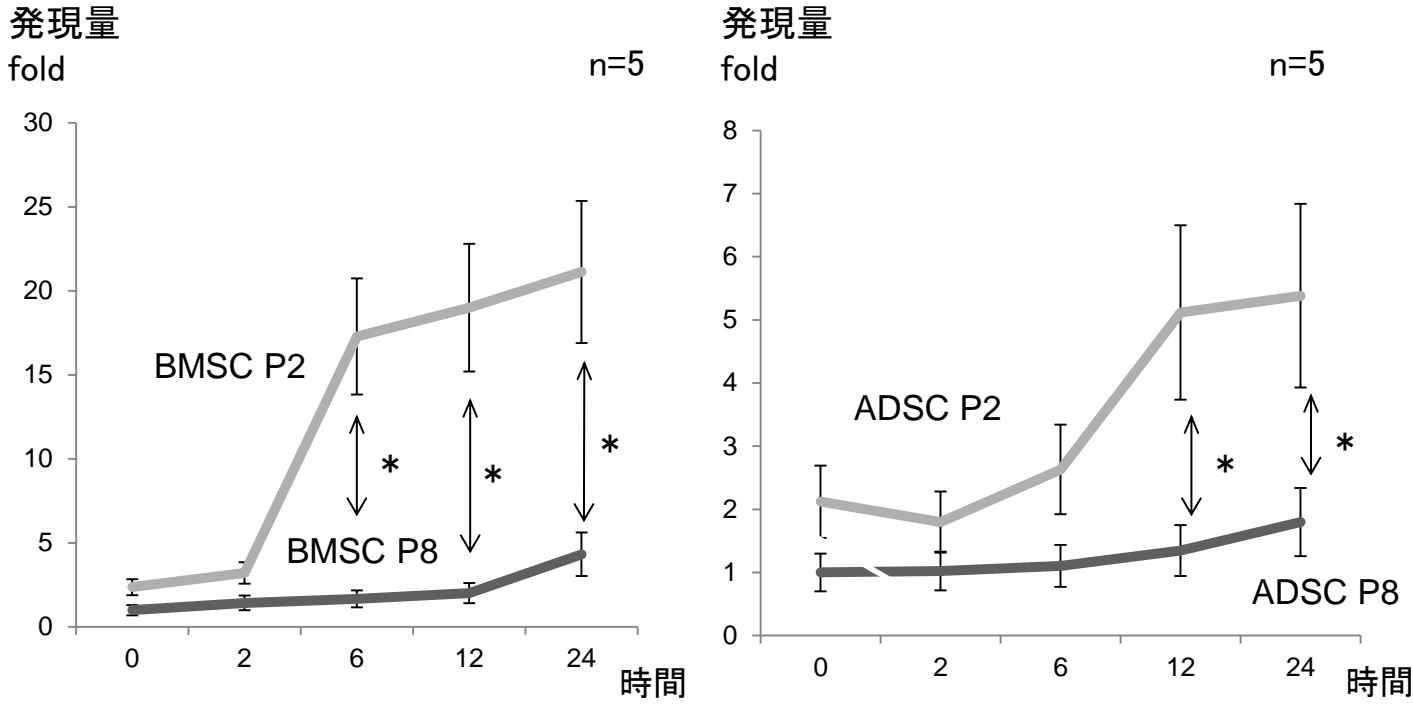


図3 *osterix*発現量
同種間で継代別の*osterix*発現量を比較

*; $p < 0.05$ (t検定)

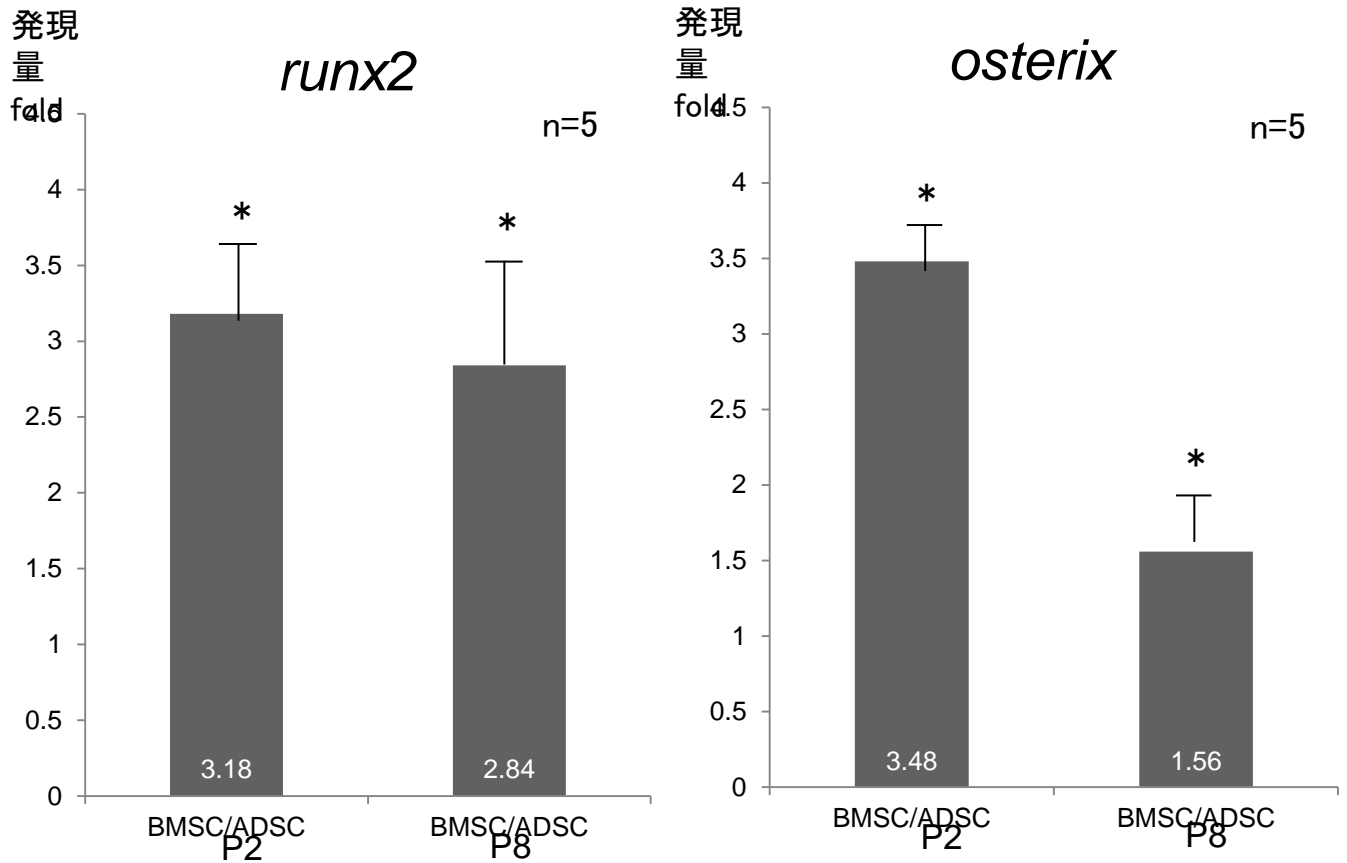


図4 24時間*runx2*, *osterix*発現量

BMSCに対するADSCの骨芽細胞分化マーカー発現量(ADSC/BMSC_P2,P8)

*; $p < 0.05$ (t検定)

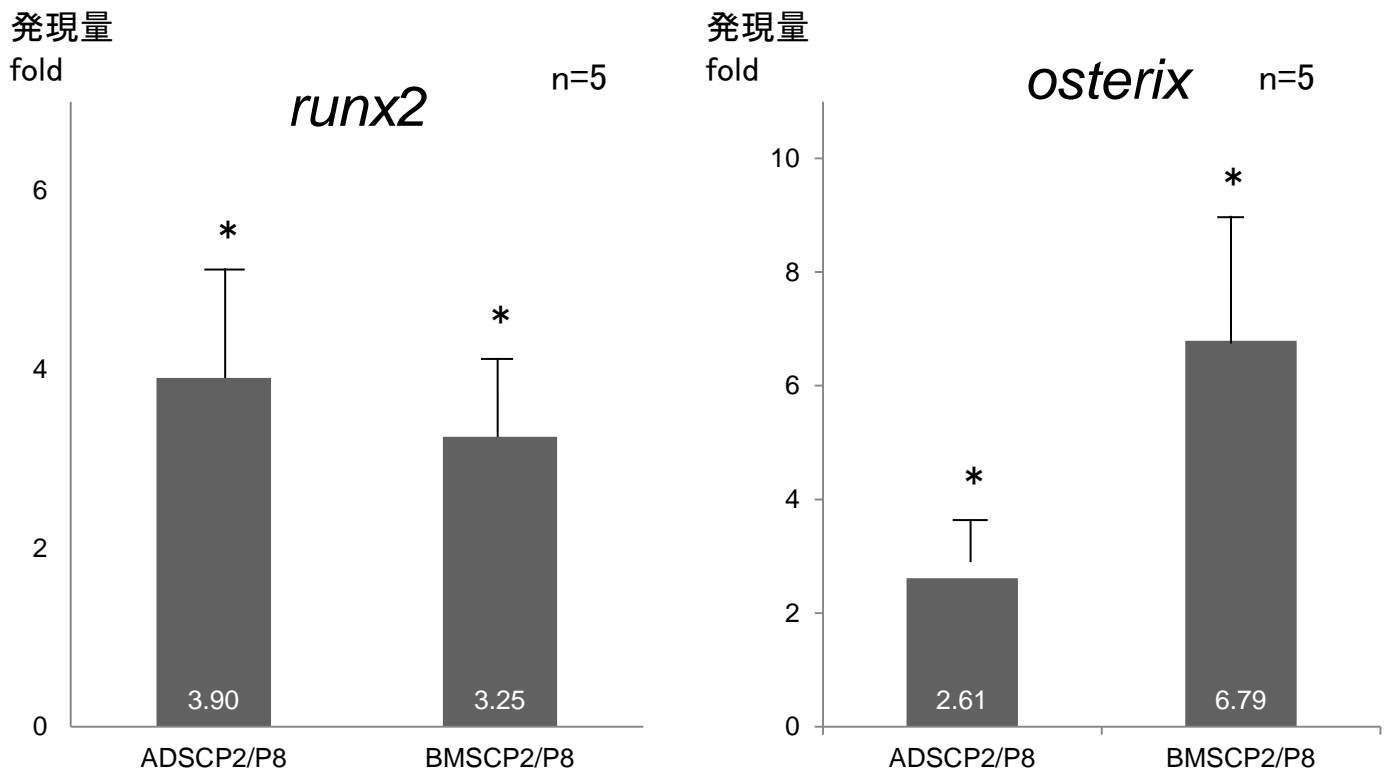


図5 24時間*runx2*, *osterix*発現量
第8継代に対する第2継代の骨芽細胞分化マーカー
発現量(ADSC,BMSC_P2/P8)

*; $p < 0.05$ (t検定)

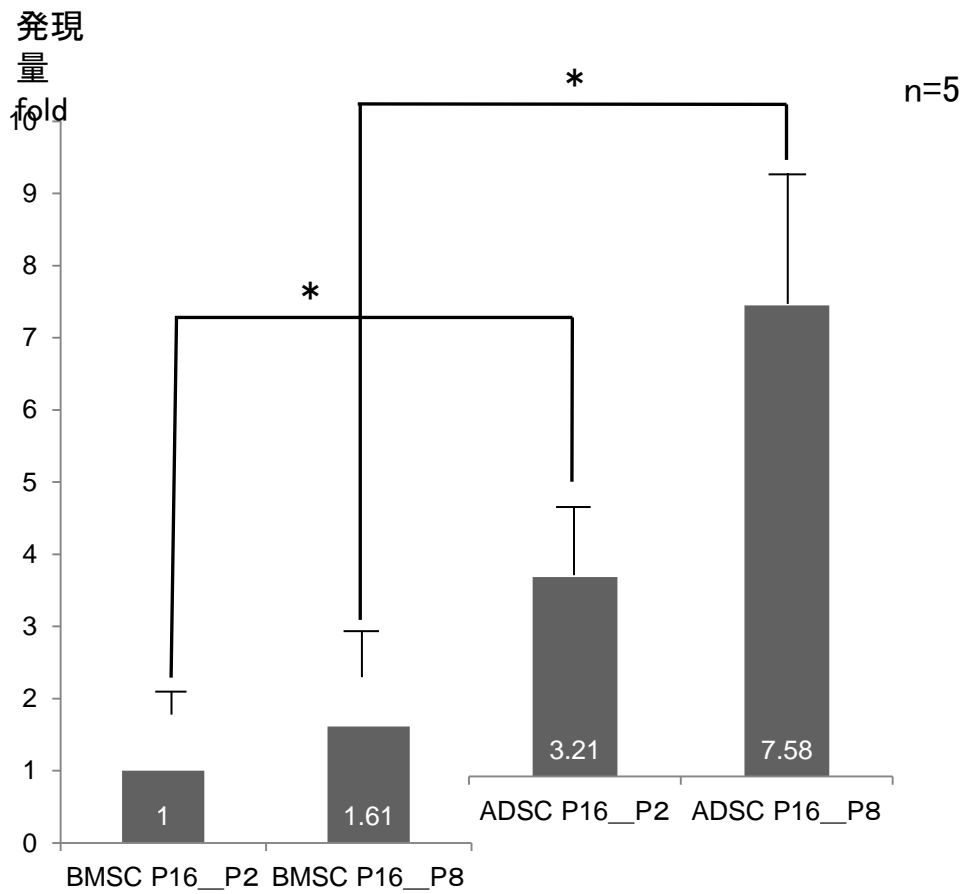


図6
BMSC, ADSC-P2, P8のp16発現量の分析

*; p < 0.05(t検定)