

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462271

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞を応用した骨軟部腫瘍切除後組織欠損の再生医療と蛍光イメージング評価

研究課題名(英文) Regeneration using adipose-derived stem cells and fluorescent imaging evaluation for a defect after bone and soft tissue tumor surgery

研究代表者

林 克洋 (Hayashi, Katsuhiro)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：80507054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)においてp53蛋白は骨芽細胞分化や脂肪細胞分化を抑制する。同一個体からALT/WDL組織と正常脂肪組織を採取し、MSCを分離培養し、骨芽細胞分化能と脂肪細胞分化能を比較した。脂肪分化能においては、我々の予想に反して、正常脂肪由来MSCにおいてより多くの脂肪滴が認められた。対照的に、骨芽細胞分化能においては、ALT/WDL由来MSCでより高い分化能を認めた。ALP染色に基づく骨芽細胞分化能の差異はMDM2特異的阻害薬Nutlin-3濃度が上昇するにつれて減少した。ALT/WDL由来MSCにおけるMDM2遺伝子の増幅がより高い骨芽細胞分化能をもたらしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We compared osteogenic and adipogenic differentiation potency between MSCs isolated and cultured from normal adipose tissues and atypical lipomatous tumor/well-differentiated liposarcoma (ALT/WDL) from the same patients. We found greater osteogenic differentiation potency in ALT/WDL-derived MSCs than in normal fat-derived MSCs. In adipogenic differentiation, contrary to our expectations, more fatty acid droplets were observed in normal fat-derived MSCs than in ALT/WDL-derived MSCs. In osteogenic differentiation, as expected, MSCs derived from ALT/WDL had higher differentiation potency than normal fat-derived MSCs. The gap of osteogenic differentiation potency based on ALP staining between ALT/WDL-derived MSCs and normal fat-derived MSCs disappeared as Nutlin-3 concentration increased, suggesting that greater osteogenic differentiation could be caused by amplified MDM2 in ALT/WDL.

研究分野：再生医療

キーワード：脂肪由来幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

癌の外科的治療には、腫瘍と一塊にして発生した臓器の切除が必要である。小病変に対しては臓器障害も少ないが、大きな腫瘍では欠損となった臓器の機能障害が必発である。四肢に発生する骨腫瘍、軟部腫瘍の切除手術でも、骨や筋肉や神経を一塊とした切除が必要であり、骨欠損、軟部組織欠損が生じ、機能的な問題も生じる。臨床ではさまざまな再建手術が行われており、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。骨軟部腫瘍では大きな欠損となることが多く、細胞の量も問題となる。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くらべると、採取が容易で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い、または短期間の培養で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。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。

我々はこれまで、脂肪由来幹細胞から神経や骨の再生に関する研究報告を行っており (Suganuma S, Tada K, Hayashi K,

Uncultured adipose-derived regenerative cells promote peripheral nerve regeneration. *Journal of Orthopaedic Science* 18:145-51, 2013), in vivoでの再生医療の手がかりを得ている。今後は、再生のための効率を上げること、人への応用などがネックとなる。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、脂肪由来幹細胞を用いた再生医療のため、分化誘導の効率化をめざし、in vitro, in vivoでの実験を計画し、有効性とその作用機序を蛍光イメージング法にて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幹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。尚申請者は、脂肪由来幹細胞の分離、培養、in vitroでの分化誘導は、すでに行っており、ウサギでの乳房再建モデルもすでに成功している。また、脂肪幹細胞の採取方法、培養方法にも工夫を行い、皮下脂肪と非典型脂肪腫様腫瘍などから細胞を選び分化能の違いを検討したり、シート培養を行うことで通常培養より高い分化能を得られることを確認したりしている。

### 2. 研究の目的

整形外科手術の患者に同意のもとで手術中に脂肪組織を採取し、培養を行う。骨、筋肉など骨軟部組織欠損に応用出来る細胞へ分化誘導を行うが、その際に分化効率をあげるために p53 などの遺伝子発現やシート培養などの培養方法について新たな知見を得るのを目標とする。p53 遺伝子には間葉系幹細胞に対して脂肪細胞への分化を含めた、特定の間葉系細胞への分化を抑制する働きがあることが知られており、この発現を抑制または、発現の低下した細胞を選択的に採取し培養を行う。シート培養では、骨分化誘導に際して、通常の培養細胞に比べ、アルカリフォスファターゼの発現が上昇していることが確認されているので、筋肉や他の細胞への分化でも有用性を確認する。それらの結果を踏まえて、動物での応用を行い、蛍光イメージングで移植細胞の運命をみきわめ臨床試験へと結びつけていく。

### 3. 研究の方法

異型脂肪腫様腫瘍 (以下、ALT) では MDM2 遺伝子 (以下、MDM2) の増幅がある。MDM2 の増幅は p53 機能の低下を来すと考えられる。p53 は幹細胞において脂肪や骨分化を抑制するため、ALT 由来間葉系幹細胞 (以下、

MSC)は脂肪や骨分化能が高いと予想される。p53 機能の低下する多くの腫瘍で、腫瘍の幹細胞に対する分化誘導療法が有効か、ALT を代表として用いて探った。臨床的、病理形態学的に ALT と診断した患者 6 人から ALT 組織と正常脂肪組織を採取し、各組織から MSC を作成した(図 A)。それぞれの MSC で、MDM2 の mRNA 定量、gDNA のコピー数多型解析をリアルタイム PCR で行った。また、脂肪および骨分化能を比較した。前者はオイルレッド O 染色後、抽出液の吸光度を測定し Student's t 検定で評価した。骨分化能は ALP 染色およびアリザリンレッド S 染色後にマクロ写真から Image J を用いて特定色域面積を測定し、正常脂肪由来 MSC の平均値に対する比に換算しマンホイットニー検定で評価した。

骨分化能について、MDM2 特異的阻害薬 Nutlin-3 を用いて、その濃度を 0~10 $\mu$ M に段階的に変えて骨分化誘導培地に加え、同様に骨分化能を比較した。

また、脂肪由来幹細胞(以下 ADSCs)の臨床応用を目指して、in vivo で ADSCs による凍結処理骨再生能を検討した。ラットの大腿骨骨幹部を摘出し、摘出骨を液体窒素にて凍結処理し、再移植した。皮下脂肪から採取した脂肪組織からコラゲナーゼを用いて ADSCs を抽出し、アスコルビン酸含有の培養にて幹細胞シートを作成した。これを再移植部に巻きつけることで骨再生促進の有無を確認した。処理後、2 週~12 週で屠殺、移植骨を摘出し、CT 撮影及び、組織学的評価(H-E 染色)を行い、骨再生を評価した。

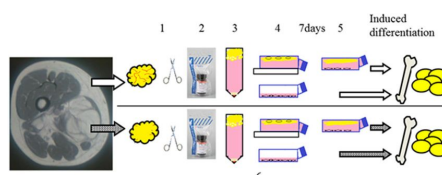
#### 4. 研究成果

ALT 由来 MSC で、MDM2 の mRNA の増加や gDNA のコピー数多型は認めなかった。分化能の比較では、脂肪分化能(正常脂肪対 ALT)は症例で各 0.29 対 0.29 ( $p=0.99$ )、0.16 対 0.13、0.52 対 0.41、0.36 対 0.20、0.44 対 0.28 ( $p < 0.05$ )であった。骨分化能は、ALP 染色で 1 対 2.9、対 4.6、対 2.9、対 90.4、対 0.001 ( $p < 0.01$ )。アリザリンレッド S 染色で 1 対 0.69、対 5.13、対 12.09、対 3.59、対 0.65 ( $p < 0.01$ )であった。分化能の比較では、脂肪分化能は正常脂肪由来 MSC で、骨分化能は ALT 由来 MSC で高い傾向があった。

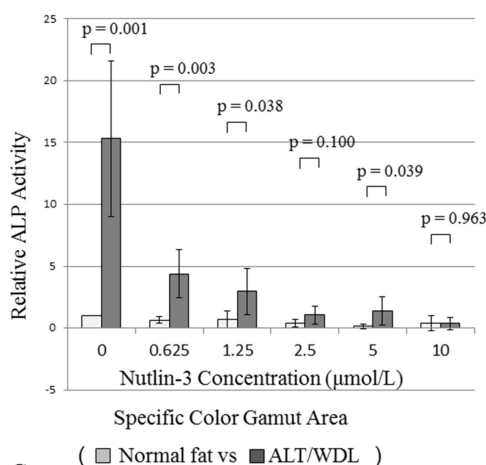
骨分化能が予想通り ALT 由来 MSC で高かったことについて、MDM2 特異的阻害薬 Nutlin-3 を用いて、その濃度を 0~10 $\mu$ M に段階的に変えて骨分化誘導培地に加え、同様に骨分化能を比較したところ、Nutlin-3 の濃度が増すにつれ、骨分化能は低下し、最終的に骨分化能の差異が消失した(図 C)。このことから、骨分化能の差異が MDM2 の増幅により生じていたことが示唆された。以上の内容を Clinical Orthopedic and Related Research に投稿し、採用された。

脂肪由来幹細胞(以下 ADSCs)の臨床応用を目指して、in vivo で ADSCs による凍結処理骨再生能を検討した。ラットの大腿骨骨幹部

を摘出し、摘出骨を液体窒素にて凍結処理し、再移植した。皮下脂肪から採取した脂肪組織からコラゲナーゼを用いて ADSCs を抽出し、アスコルビン酸含有の培養にて幹細胞シートを作成した。これを再移植部に巻きつけることで骨再生促進の有無を確認した。処理後、2 週~12 週で屠殺、移植骨を摘出し、CT 撮影及び、組織学的評価(H-E 染色)を行い、骨再生を評価した。画像評価ではシート群では、時間の経過とともに、処理骨と host bone の境界部で連続性が見られた。組織評価ではシート群では、処理骨に向かう host bone からの新生骨形成を認め、骨癒合の確認が得られた。総合的に骨再生の促進はみられる傾向があったが、モデルのためか、旺盛な再生まではみられない印象であり、移植方法の検討などが必要と考えられた。



A



C

#### 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7件)

- Inatani H, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Takeuchi A, Miwa S, Higuchi T, Abe K, Taniguchi Y, Yamada S, Asai K, Otsuka T, Tsuchiya H. Do Mesenchymal Stem Cells Derived From Atypical Lipomatous Tumors Have Greater Differentiation Potency Than Cells From Normal Adipose Tissues? Clin Orthop Relat Res. 2017 Jun;475(6):1693-1701. doi: 10.1007/s11999-017-5259-z (査読有)

2. 林克洋, 菅沼省吾, 野村一世, 黒田一成, 虎谷達洋, 方向, 土屋弘行. 運動器再生医療における脂肪由来幹細胞の潜在能力. 臨床整形外科 51: 635-639, 2016 ( 査読無 )
3. Kuroda K, Kabata T, Hayashi K, Maeda T, Kajino Y, Iwai S, Fujita K, Hasegawa K, Inoue D, Sugimoto N and Tsuchiya H: The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression. BMC Musculoskelet Disord 16: 236, 2015. DOI: 10.1186/s12891-015-0701-4( 査読有 )
4. Hayashi K, Yamada S, Inatani H, Okamoto H, Takeuchi A, Nishida H, Yamamoto N, Tsuchiya H, Otsuka T. Salvage method for unplanned excision of soft tissue sarcoma: long-term results of second-look surgery following radio-hyperthermo-chemotherapy. Anticancer Res. 2015 ;35(1):493-8. <http://ar.iarjournals.org/content/35/1/493.long> ( 査読有 )
5. Hayashi K, Iwata S, Ogose A, Kawai A, Ueda T, Otsuka T, Tsuchiya H. Factors that influence functional outcome after total or subtotal scapulectomy: Japanese Musculoskeletal Oncology Group (JMOG) study. PLoS One. 2014 Jun 17;9(6):e100119. ( 査読有 ) [doi.org/10.1371/journal.pone.0100119](http://doi.org/10.1371/journal.pone.0100119)
6. Nomura I ,Watanabe K ,Matsubara H , Hayashi K , Sugimoto N , Tsuchiya H: Uncultured autogenous adipose-derived regenerative cells promote bone formation during distraction osteogenesis in rats. Clin Orthop Relat Res. 12: 3798-806 , 2014. doi: 10.1007/s11999-014-3608-8. ( 査読有 )
7. 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 Feb 19;9(2):e88874. doi: 10.1371/journal.pone.0088874 ( 査読有 )
- [学会発表](計 6 件)
1. Xiang Fang, Katsuhiko Hayashi, Hideki Murakami, Hiroyuki Tsuchiya. From Fat to Bone: Making Adipose Derived Stem Cell Sheets and Osteogenesis of Adipose Derived Stem Cell Sheets. American Academy of Orthopedic Surgeons. 2017/3/14-3/18. San Diego (USA)
2. Hayashi K, Yamamoto N, Shirai T, Takeuchi A, Kimura H, Miwa S, Suganuma S, Nomura I, Inatani H, Aoki Y, Fang X, Tsuchiya H  
A novel method to apply adipose-derived stem cells to bone and soft tissue defects after tumor excision.  
International Society of Limb Salvage & Musculoskeletal Tumor Society combined meeting. 2015 年 10 月 6-10 日 (Orlando, USA)
3. 骨端を含む悪性骨腫瘍に対して液体窒素処理した自家骨軟骨移植術の経験  
林克洋 山本憲男 武内章彦 三輪真嗣 五十嵐健太郎 土屋弘行  
第 125 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 2015 年 10 月 2 日 3 日 ウィンクあいち(名古屋)
4. Hayashi K, Tsuchiya H, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Takeuchi A, Kimura H, Ooi A, Otsuka T  
The diagnosis using MDM2 and CDK4 for low-grade osteosarcoma and treatment with biologic reconstruction  
Société Internationale de Chirurgie Orthop dique et de Traumatologie (SICOT) 、2014 年 11 月 19-22 日、Rio de Janeiro (Brazil)
5. マウス内で肉腫細胞の転移臓器播種リアルタイムイメージング  
林克洋 土屋弘行 山本憲男 西田英司 武内章彦 木村浩明 三輪真嗣 ロバート M ホフマン  
第 23 回日本がん転移学会 文化ホ

- ール(金沢) 2014年7月10-11日
6. Case analysis of poor prognostic bone sarcoma patient who underwent tumor-bearing frozen autograft
- Katsuhiro Hayashi, Norio Yamamoto, Hideji Nishida, Akihiko Takeuchi, Takashi Kato, Yu Aoki, Takashi Higuchi, Hiroyuki Tsuchiya
- 低温医学学会総会 野依記念学術交流館(名古屋)2014年11月13-14日

(4)研究協力者 ( )

〔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

林 克洋 (HAYASHI, Katsuhiro)  
“金沢大学・附属病院・助教”  
研究者番号：80507054

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：