

## ステロイド薬投与によるヒト間葉系幹細胞分化に対する影響

加藤 俊貴 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 大根田 修 (筑波大学 医学医療系)

### 背景・目的

近年、胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)の研究が発展し、幹細胞を使用した再生医療が世界中で注目を集めている。しかし、倫理的な問題や、生体内で悪性腫瘍を形成する危険性があるなど、多くの問題を抱えており、実際の臨床応用には程遠いと言われている。それに対し、組織幹細胞、特に間葉系幹細胞(MSC)は倫理的問題や悪性腫瘍の危険性は比較的安くMSCを使用した再生医療が期待されている。

MSCは骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有する組織幹細胞の1つであり、骨髄や臍帯血、脂肪組織などの生体内の様々な組織に分布していることが明らかとなっている。特に脂肪組織由来MSCは高い増殖能を有することから、臨床応用時の細胞供給源として注目を集めている。また、MSCは、それ自身が持つ多分化能に加えて、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などのサイトカインを豊富に放出することが知られている。このような性質を利用し、心疾患や移植片対宿主病(GVHD)、骨関連疾患に対しMSCを使用した臨床研究が進んでいる。

代表的抗炎症薬であるステロイド薬は喘息やリウマチなど様々な疾患に対して用いられる。しかし、高用量、長期間での投薬には副作用が伴うことが知られており、代表的なものとして骨粗鬆症が挙げられる。また、骨関連疾患に対する症状緩和のため、ステロイド薬を使用するケースは非常に多く、骨関連疾患に対しMSCを用いた細胞治療を行うにあたってMSCに対するステロイド薬投与の影響を評価することは不可欠である。しかし、これまでの研究でステロイド薬投与がMSCに対してどのような影響を与えるのかについての評価は少ない。そこで本研究では、MSCを由来する患者のステロイド薬投与の有無によって分類し、高用量、長期間のステロイド薬投与がMSCの分化へどのような影響を与えるのか検証することを目的とした。

### 方法

#### ヒト脂肪組織からMSCの単離

ヒト脂肪組織はインフォームドコンセントを得た上で、筑波大学人間総合科学研究科整形外科、三島初先生より分与していただいた。脂肪組織は、細かく切り刻んだ後0.1%コラゲナーゼ溶液にて処理した。コラゲナーゼ処理後、組織を懸濁し遠心した。得られたペレットをIMDM / 10%FBS / 2 mg/mL L-glutamine / 0.1% P/S / 5 ng/mL ヒトb-FGF培地にて培養した。播種後観察された接着性細胞をフローサイトメトリーで解析し表面マーカーの特徴がMSCと一致していることを確認した。また、ステロイド薬投与の最大量が50 mg/day、期間が1年以上の患者由来MSCをステロイド薬投与群とした。

#### in vitroにおける分化能の解析

MSCがコンフルエントになった後、それぞれ骨分化培地、脂肪分化培地、軟骨分化培地へ切り替えた。一定期間経過後、Alizarin Red S染色、Oil Red O染色、Toluidine blue染色にてそれぞれの分化能を評価した。

#### RT-PCR法による発現解析

骨分化誘導前後7日後、14日後のMSCからcDNAを合成しRunx2、Alkaline phosphatase (ALP)、osteocalcinなどの骨分化関連遺伝子群をRT-PCR法により解析した。

#### in vivo 大腿骨骨折モデルマウス

術前にゼルフォームへAT-MSCを播種し1~2時間インキュベートした。マウス解析には8~12週齢のC57/BL6マウスを使用した。マウス大腿骨中央を切断し、2 mm程ギャップを作成した後、ギャップ固定のために骨髄内に針を通し、ギャップ周囲にMSCを播種したゼルフォームを移植した。移植28日後、切断部位の骨修復をレントゲン撮影によって評価した。また、骨折させた大腿骨サンプルを固定、脱灰処理し、HE染色にて組織学的評価を行った。

### 結果・考察

ステロイド薬投与群、及び非投与群のMSCを用いてin vitroにおける骨分化能、脂肪分化能、軟骨分化能を解析した。脂肪分化と軟骨分化に関しては群間の差は認められなかったものの、ステロイド薬投与群において骨分化能が有意に低下していることが分かった。そこで、骨分化関連遺伝子群をRT-PCR法にて解析したところ、骨分化初期マーカーの1つであるALPの発現が骨分化誘導前のステロイド薬投与群において有意に低下していることが明らかとなった。ALPは、骨分化における石灰化に重要な機能を持つことが知られており、分化開始時にALPの発現が低いことが骨分化の低下と関係している可能性が示唆された。そこで、ステロイド薬投与群MSCにALPを過剰発現させたところ、in vitroにおける骨分化能が回復することが明らかとなった。

また、in vivoにおける骨修復能を大腿骨骨折モデルマウスにより解析した。in vivoでは、組織学的評価による群間の差は認められなかった。

以上の結果より、高用量、長期間のステロイド薬投与はMSCのin vitroでの骨分化の低下を引き起こし、それは骨分化関連遺伝子発現の違いによる影響であることが示唆された。今後は他の骨分化関連遺伝子の発現解析と、大腿骨骨折モデルマウスを用いたin vivoにおける質的な骨形成能の解析を進めていく予定である。