

ヒト骨髄における間葉系幹細胞の増殖と分化

伊藤尹敦、服部拓哉*、青木利満*、天野久美子*、中野 茜*、中村こずえ*

帝京短期大学、*帝京大学医学部小児科

Growth and Differentiation of Human Marrow Mesenchymal Stem Cells

Tadaatsu ITO, Takuya HATTORI*, Toshimitsu AOKI*,
Kumiko AMANO*, Akane NAKANO*, Kozue NAKAMURA*

Teikyo Junior College, *Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan

Human mesenchymal stem cells (MSCs) from the bone marrow were isolated, expanded, and tested their ability to undergo osteogenesis and adipogenesis. Bone marrow cells were layered on 1.073 g/ml Percoll solution, and centrifuged for 30 minutes at 460G. Cells were cultured in Iscove's medium containing 10% FBS at 37°C and 5% CO₂, with medium changes every 3-4 days. When culture dishes became confluent, the cells were detached, and were split 1:2, and replated. MSCs were grown in an osteoinductive medium, or in an adipogenic inductive medium. MSCs were isolated exclusively from tested bone marrows. MSCs were cultured, proliferated extensively, and were capable of osteogenic or adipogenic differentiation of culture.

要 旨

ヒト骨髄間葉系幹細胞を分離・培養・継代増殖し、骨芽細胞、脂肪細胞、筋芽細胞への分化誘導能を検索した。骨髄細胞を比重1.073g/mlに調整したPercoll液に重層遠沈する。細胞を10% FCS加イスコフ培養液に浮遊させ、炭酸ガス培養器内で培養する。3～4日ごとに培養液を交換し、付着細胞が80～90%に増殖すると、トリプシン処理をして継代培養する。継代細胞の骨芽細胞、脂肪細胞への分化誘導能を検索した。全例で骨髄間葉系幹細胞が培養、継代、増殖し、分化誘導因子添加で骨芽細胞、脂肪細胞への分化が認められた。

I 緒 言

骨髄は造血幹細胞の主たる産生場所であり、造血幹細胞を増殖・分化・成熟させ、血液細胞を血中へ放出し、個体の血液細胞を持続的に維持している。近年、ヒトの骨髄には、骨、軟骨、筋肉、腱、脂肪、表皮、間質細胞などの結合組織系への分化能を備えた間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells) が存在していることが報告された¹⁾。

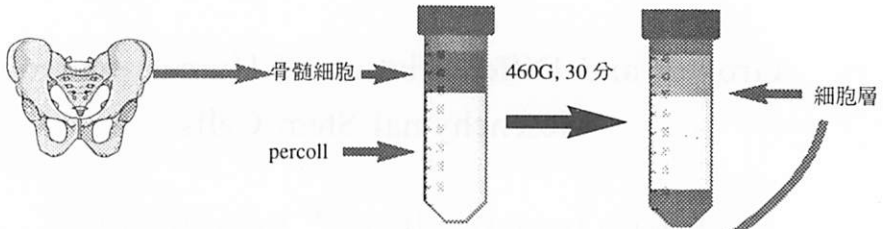
著者達は、間葉系幹細胞をヒト骨髄から分離・培養・増殖させ、継代を重ねてゆく方法を確立し報告してき

た²⁾⁻⁵⁾。その方法論および間葉系幹細胞の骨芽細胞、脂肪細胞への分化誘導能について報告する。

II 方 法

1. 間葉系幹細胞を含む単核細胞浮遊液の作製 (図1)
1) 帝京大学小児科にて諸検査・鑑別診断のために骨髄穿刺された10人15回の骨髄液の一部を使用した。腸骨稜を穿刺してヘパリンナトリウムを加えた10ml注射筒に骨髄液を約2-8ml採取する。これを26Gの針を使用して14ml遠心管に注ぎ、培養液で洗浄後、1200rpm, 5分間遠心分離する。脂肪層と上澄み

間葉系幹細胞の分離



間葉系幹細胞の培養と継代

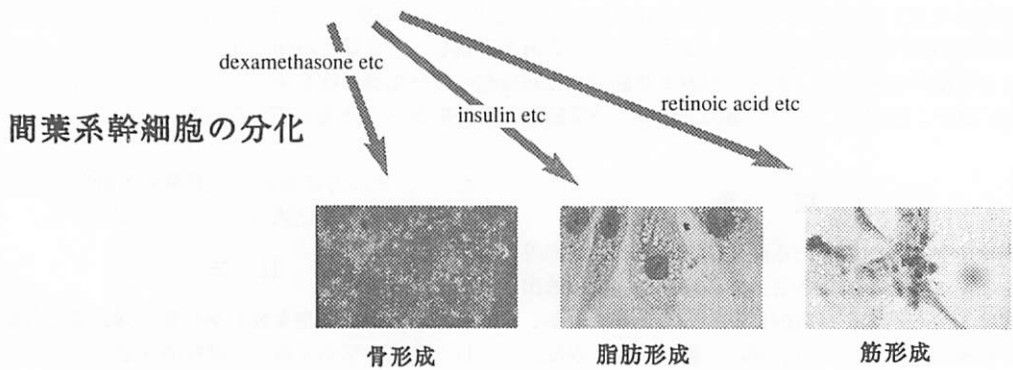
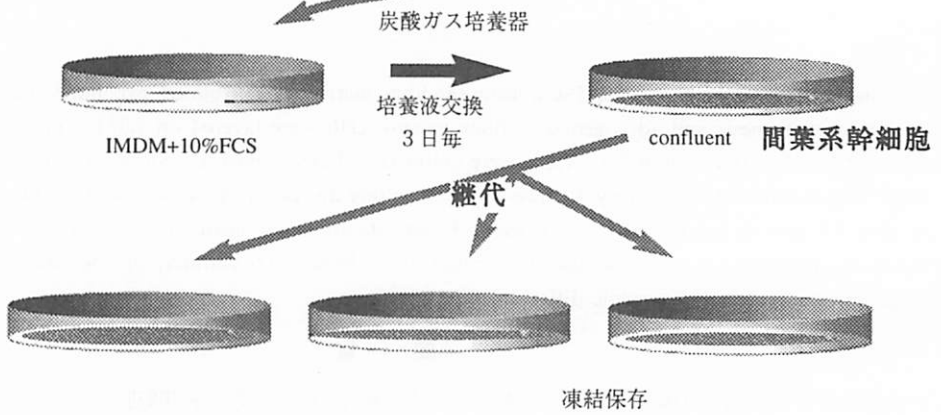


図1 間葉系幹細胞の分離、培養、継代の方法

間葉系幹細胞の分離、培養、継代の方法

を除去したあと、細胞浮遊液を作製する。

- 2) 14ml遠心管に、密度を1.073g/mlに調整した53.8% Percoll液を8ml入れて、細胞浮遊液を重層する。460G, 15分間遠心し、分離された2層目の細胞層を取り出す(図1 間葉系幹細胞の分離)。洗浄後、1200rpm、5分間遠心し、上澄みを除去して細胞浮遊液を作成する。
- 3) 細胞数を算定し、10% FCS 加イスコフ培養液7ml中に細胞数 5×10^7 個になるよう調整し、100mm 組織培養皿にプレートする。

2. 間葉系幹細胞の培養と継代(図1)

- 1) 組織培養皿を炭酸ガス培養器(37°C, CO₂ 5%)に入れて培養する。
- 2) 培養3日目、培養液と非付着細胞を除去し、新培養液を7ml加える。3-4日ごとに培養液交換をする。
- 3) 継代操作は付着細胞が培養皿の80-90%になったら、培養液を除去した後に5mlのPBSで付着細胞を洗浄する。0.25%トリプシン1mM EDTA1mlを加えて、炭酸ガス培養器内にて5-10分間浸す。細胞層の剝離を確認したら10% FCS 加培養液を10ml以上加える。培養液7ml中に 5×10^7 個の細胞数になるよう調整して100mm 組織培養皿にプレートする。炭酸ガス培養器内で培養する。
- 4) 倒立型培養顕微鏡下で細胞層の形成過程を経時的に観察する。

3. 間葉系幹細胞の同定

- 1) フローサイトメトリー解析
FACScan (BECTON) を用いて3回継代・培養した間葉系幹細胞に対する表面マーカー(CD14, 35, 71, 29, 34)の発現パターンを検索。
- 2) 骨形成の分化誘導
間葉系幹細胞を骨誘導培養液(10⁻⁷M dexamethasone, 10mMβ-glycerophosphate, 0.05mM sodium ascorbate, 10% FCSを含むイスコフ培養液)で培養する。3-4日ごとに培養液交換をする。
- 3) 脂肪形成の誘導
間葉系幹細胞を脂肪誘導培養液(10μg/mlインシュリン, 0.5mM methylisobutylxantine, 1μM dexamethasone, 10% FCSを含むイスコフ培養液)で培養する。3-4日ごとに脂肪維持培養液(10μg/mlインシュリン, 0.5mM methylisobutylxantine, 1μM dexamethasone, 10% FCSを含むイスコフ培養液)で培養液交換をする。

4. 組織学的検索

May-Giemsa 染色、ヘマトキシリン・エオジン染色のほか、次の染色法を試みた。

1) von Kossa 染色

組織内に沈着したカルシウムが2重置換反応によって黒褐色の金属銀微粒子に置換される原理を利用したものである。この染色によって、骨芽細胞に沈着した磷酸カルシウム存在を確認することができる。

2) アルカリフォスファターゼ染色(アゾ色素法)

naphthol誘導体を基質とし、酵素作用により遊離した naphthol化合物を、ジアゾニウム塩で補足、アゾ色素として濃紫青色または鮮赤色に発色し、酵素活性部位に沈着させる。この染色でアルカリ性フォスファターゼの活性を指標として、細胞膜機能の活性を確認することができる。

3) オイル赤O染色

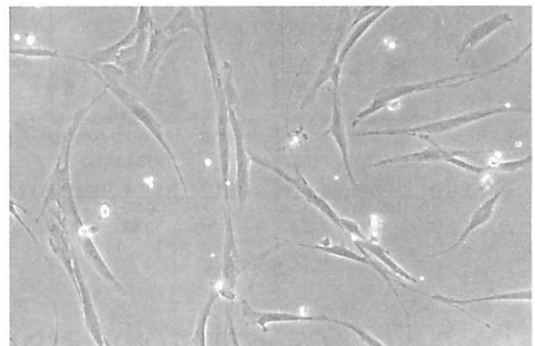
脂質親和性の高い色素を有機溶媒に溶かしたものを脂質に作用させると、色素が一部脂質に移行して染色される原理を利用している。これにより、脂肪芽細胞に含まれる脂肪滴の存在を確認することが可能である。

III 結 果

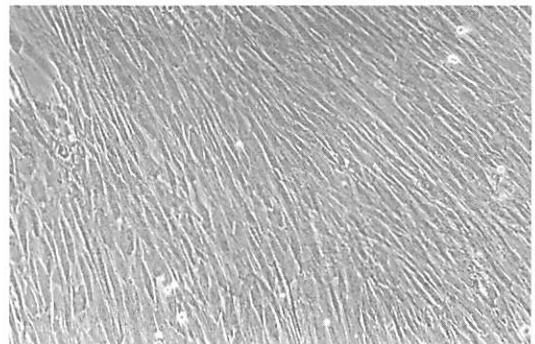
1. 間葉系幹細胞の in vitro における増殖能

- 1) プレート後の細胞の形態(図2 a, b)

図2 間葉系幹細胞のin vitro 増殖



a. 培養7日目の線維芽細胞様形態(位相差)



b. 培養30日目のconfluent状態(位相差)

培養開始30分で細胞は培養皿に付着した。2-3日経過すると、付着細胞は、紡錘型の線維芽細胞様の形態となった(a)。8-30日で培養皿は confluent になった(b)。

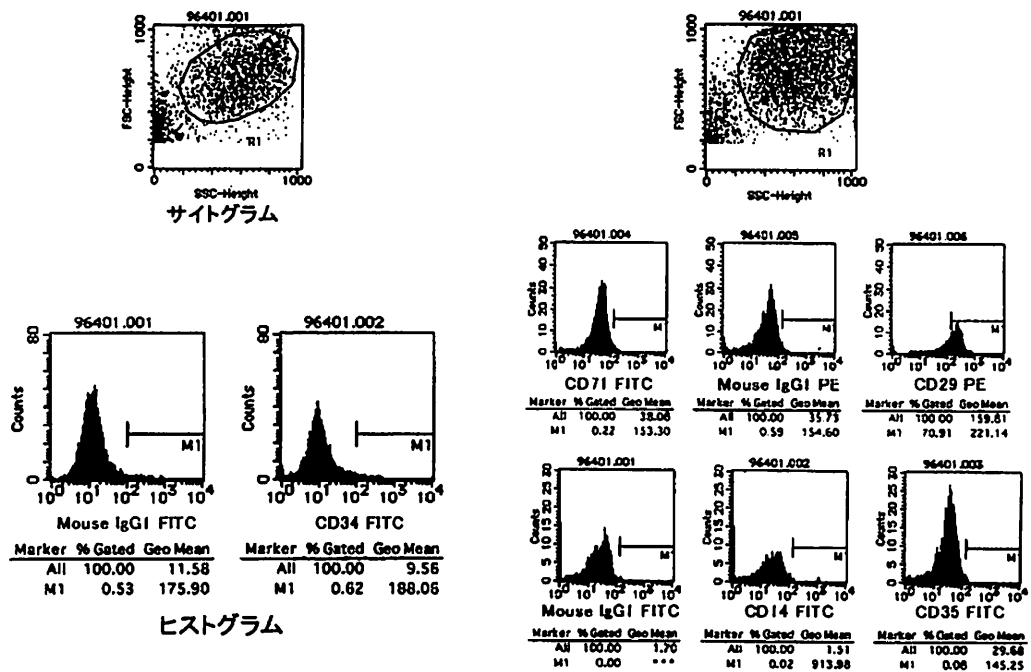
2) 分離と継代

プレート後、confluent になり第1継代するまでの期間は2-4週間であった。間葉系幹細胞は継代を重

ねるにつれ増殖速度が低下した。

2. フローサイトメトリーによる間葉系幹細胞の解析

FACScan による図3のサイトグラムでは、均一な細胞群は1つで、ヒストグラムでCD29は70%以上の細胞がM1の領域内に含まれていた。CD14, 34, 35, 71ではM1の領域内の細胞は1%以下、CD29は陽性、CD14, 34, 35, 71は陰性と推定できた。

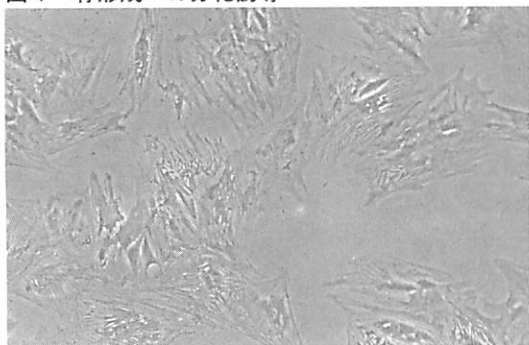


これはFACScan(BECTON)によりMSCsに対するCD14、29、34、35、71の発現パターンを示したものである。サイトグラムは、横軸に細胞内部構造(SSC-Height)、縦軸に細胞の大きさ(FSC-Height)をプロットしたものである。M1はMouse IgG1を陰性コントロールとして得た陽性の基準領域である。

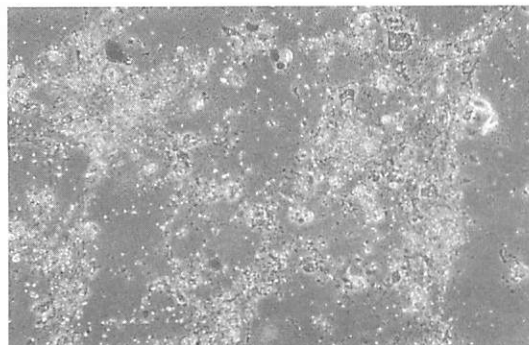
図3 間葉系幹細胞のFACS解析

3. 骨形成への分化誘導 (図 4 a, b)

図 4 骨形成への分化誘導



a. 分化誘導培養 1 週目 (位相差)

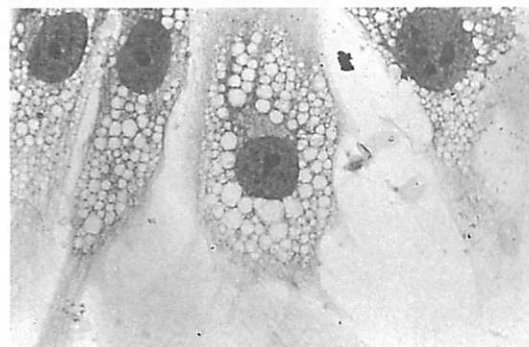


b. 分化誘導培養 8 週目

分化誘導を開始してから 1 週間後、細胞は紡錘状から四角、多角形へと変化した(a)。また、細胞を覆うように不透明のカルシウム様の結晶が沈着し始め、8 週間には沈着は培養皿全体に広がった(b)。誘導された細胞の von Kossa 染色、アルカリフォスファターゼ染色ではともに陽性細胞が認められた。

4. 脂肪形成への分化誘導 (図 4 c)

分化誘導培養 3 日目で、細胞は紡錘状から四角、多角形へと変化し、培養 7 日目で脂肪滴・空胞を含



c. 脂肪形成への分化誘導培養30日目の May-Giemsa 染色

む細胞が出現し、経時的にその割合は増加した。図 4 c は誘導30日後の May-Giemsa 染色である。細胞質内の丸い脂肪滴様の空胞は 7 日目で約10%の細胞に出現し、だんだんとその割合は増加した。オイル赤 O 染色は陽性であった。

IV 考 察

検索した骨髄の10例15回全例において間葉系幹細胞の分離・培養・継代・増殖が可能であった。本実験において間葉系幹細胞は継代により増殖し続けることにより、自己複製能があると推測された。また、誘導物質により、骨、脂肪細胞へと分化し、多分化能もあることより、幹細胞の性質を持っていることが確認された。細胞をプレートしてから、confluent になり、第1継代するまでは、2-4 週間であった。また、間葉系幹細胞は継代を重ねてゆくうちに増殖速度が低下した。本研究では、Pittenger ら¹⁾の報告に比べ、増殖速度が遅かった。第1に DMEM 培養液ではなく、グルコース、ビタミンC含有量の高いイスコフ培養液を使用したため、脂肪・骨芽細胞へと分化誘導したためと推測される。第2に FCS の Lot チェックもすべきであった。著者らの研究室では筋芽細胞への分化も確認している⁴⁾⁵⁾。間葉系幹細胞はこれ以外に軟骨、腱、表皮、間質細胞さらに肝、神経などの細胞にも分化しうることが報告されている⁶⁾⁻⁸⁾。

1998年、Thomson らによりヒト ES 細胞が樹立された⁹⁾。この細胞から得られた幹細胞を利用した細胞・組織移植や遺伝子治療などの再生医学への期待は極めて大きい。しかし、ヒト胚細胞を使用する倫理問題に対して、各国の対応はまだ論議中である。骨髄細胞由来の MSCs 研究は倫理問題をさけることができ、自己骨髄から細胞・組織を誘導し、自家移植しても拒絶反応はみられない。将来の細胞・組織移植や遺伝子治療などの再生医学に寄与するものと期待される。

V 文 献

1. Pittenger MF et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147, 1999
2. 伊藤尹敦他: Human Mesenchymal Stem Cells に関する検討 *Int J Hematol* 71:188, 2000
3. 伊藤尹敦他: 小児期の骨髄 Mesenchymal Stem Cells 第3回日本組織工学会、6月30日、2000年、広島市
4. Ito T et al: Mesenchymal stem cells from bone marrow of children with various diseases. *ISH*,

August 26-29, 2000, Toronto, Canada

5. Ito T et al: In vitro growth of bone marrow mesenchymal stem cells in children with various diseases. Pediatric Academic Societies Meeting, April 26-May 1, 2001, Baltimore, USA
6. Patrick CW et al eds : Frontiers in Tissue Engineering, Pergamon, UK, 1998
7. Mackay AM et al: Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4(4):415-428, 1998
8. Woodbury D et al: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neuron. *J Neurosci Res* 561:364-370, 2000
9. Thompson JA et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocytosis. *Science* 282: 1145-1147: November 6, 1998.