

人工造血巣としての脱細胞化骨髄の可能性

Application Potentiality for Decellularized Bone Marrow as Artificial Focus of Hematopoiesis

中村奈緒子(東医歯大生材研) ○木村剛(東医歯大生材研) 橋本良秀(京大工) 船本誠一(札幌医大)

南 広祐(東医歯大生材研) 藤里俊哉(大阪工大) 岩田博夫(京大再生研) 岸田晶夫(東医歯大生材研)

Naoko NAKAMURA, Tsuyoshi KIMURA, Kwangwoo NAM, Akio KISHIDA, Tokyo Medical and Dental University
Yoshihide HASHIMOTO, Kyoto University, Seiichi FUNAMOTO, Sapporo Medical University
Toshiya FUJISATO, Osaka Institute of Technology, Hiroo IWATA, Kyoto University

Abstract: Recent studies have revealed that hematopoietic stem cells (HSCs) home to the microenvironment (HSC niche), and induce hematopoiesis. In the HSC niche, the maintenance, proliferation and differentiation of HSCs are regulated. Niche is consisted of extracellular matrix (ECM) and supporting cells such as mesenchymal stem cell (MSC), osteoblast and CXCL12-abundant reticular cell (CAR cell). It is well known that HSCs are regulated by biological substances secreted from various supporting cells. However, the role of ECM is not yet known in detail. In the present study, we constructed an artificial niche using decellularization method in order to fine out the role of ECM. The decellularized bone marrow is expected to provide the 3-D structural template, which preserves the original niche structure. The decellularization of bone marrow was performed by using detergent methods and high-hydrostatic pressure (HHP) method. The decellularized bone marrow was implanted into a C57BL/6 mouse to investigate whether the decellularized bone marrow would function as hematopoietic stem cell niche template for blood forming. Although decellularized bone marrow was implanted subcutaneously, we found out that the decellularized bone marrow became red bone marrow after 4 weeks. Therefore, it is demonstrated that the decellularized bone marrow provides a specific microenvironment for hematopoiesis.

Key Words: HSC niche, Decellularized bone marrow

1. 緒言

造血幹細胞移植は、悪性リンパ腫や白血病などの治療法である抗癌剤の大量投与や、放射線治療時の骨髄抑制に対する二次的治療、および再生不良性貧血に対する治療法の一つとして行われている。近年、造血幹細胞に関する骨髄への生着、自己複製、分化の制御等の研究により、骨髄内に存在する細胞外マトリックス (ECM) が構成する微小環境 (Niche; ニッチ) と造血支持細胞が造血幹細胞の自己複製能や分化系列の決定に大きく影響すると考えられている¹⁾。支持細胞が分泌する物質が造血幹細胞の自己複製や分化を制御していると言われている。一方、三次元構造や表面特性など、造血ニッチの構造因子についてはまだ明らかになっていない。ニッチを人工的に構築することが可能となれば、生体外での血液産生、造血幹細胞移植への利用、白血病の制御機構の解明などの造血幹細胞研究へ貢献できる²⁾。これまでに、造血ニッチの機能を模倣して、サイトカインや増殖因子の添加、造血を支持する細胞 (ニッチ細胞) との共培養など、二次元での培養が研究されてきたが、効率良く造血幹細胞を増殖、分化させるには至っていない³⁾。そこで本研究では、人工的に造血を導く培養システムの開発を目的とし、その中心要素である造血巣の構築について検討した。造血巣としては、生体組織から細胞を除去した脱細胞化骨髄を用い、造血関連細胞として間葉系幹細胞を用いて、*in vitro* および *in vivo* で細胞の接着性や分化、造血との関係について評価し、人工骨髄による血液産生システムについての検討を行った。

2. 実験

2-1 脱細胞化骨髄の調製

ブタ肋骨の海綿骨部を採取し、直径 8mm 高さ 3-4mm の円柱状に加工した。高静水圧(HHP)処理法および界面活性剤処理法にて、脱細胞化処理を実施した。界面活性剤処理法は、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を用いた方法を応用し

た⁴⁾。HHP 処理法は、高静水圧印加装置 Dr. CHEF ((株)神戸製鋼所)を用い、10,000 気圧の高静水圧印加処理を行った後、生理食塩水で洗浄した⁵⁾。脱細胞化処理による構造変化の評価は、走査型電子顕微鏡観察によって行った。

2-2 脱細胞化骨髄移植実験

HHP 処理法および SDS 処理法にて調製した脱細胞化骨髄を C57BL/6 マウスの皮下に移植した。移植 4 週後に安楽死させ、移植した脱細胞化骨髄を採取した。移植脱細胞化骨髄を 10 %中性緩衝ホルマリン液で固定後、H-E 染色し、顕微鏡下で細胞浸潤および造血能を観察・評価した。移植脱細胞化骨髄内への造血系細胞の生着について、蛍光タンパク質(EGFP)発現マウス(C57BL/6-Tg(CAG-EGFP))を用いて移植脱細胞化骨髄の二次移植実験を行った。具体的には、C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)マウスの皮下に脱細胞化骨髄を一次移植し、移植 4 週後に移植脱細胞化骨髄を採取した。その後、X 線照射した C57BL/6 マウスに一次移植脱細胞化骨髄を移植 (二次移植) した。また、X 線照射した C57BL/6 マウスに、C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)マウスの血液細胞を皮下注射および尾静脈注射により移植し、それぞれコントロールとした。移植 1 週後に、脱細胞化骨髄の二次移植、GFP 陽性血液細胞の皮下および尾静脈注射した X 線照射マウスの尾静脈から血液を採取した。Phusion® Blood Direct PCR Kit (FINNZYMES, Thermo Fisher Scientific)を用いて、採取した血液中の EGFP 遺伝子を増幅させた。アガロースゲル電気泳動によって、X 線照射マウス血液中の EGFP 陽性細胞の存在を確認した。動物実験は、東京医科歯科大学実験動物委員会承認された方法にて行った。

3. 結果と考察

HHP 処理法および SDS 処理法にて調製した脱細胞化骨髄を Fig.1 に示す。骨髄細胞および赤血球を始めとする血球系細胞の除去が確認できた。これにより、赤色の肋骨骨髄は、赤色を呈していなかった。また、肉眼的所見におい

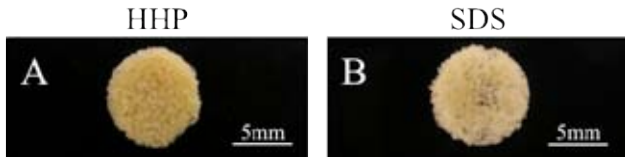


Fig. 1 Photographic image of decellularized bone marrow treated by (A) HHP and (B) SDS.

では、SDS 処理法にて脱細胞化を行った場合、骨梁以外の組織が減少しており、疎な構造が観察された。

また、Fig.2 に脱細胞化骨髄の走査型電子顕微鏡にて観察した画像を示す。HHP 処理法による脱細胞化骨髄では、骨梁の他に細網組織や脂肪組織が観察された。一方、SDS 処理法による脱細胞化骨髄では、骨梁のみが観察された。以上より、骨梁、細網組織、脂肪組織で構成されている海綿骨の脱細胞化処理では、処理方法により差異が生じ、HHP 処理法では細網組織と脂肪組織を維持可能であるが、SDS 処理法により細胞成分だけでなく細網組織と脂肪組織が除去されること明らかになった。

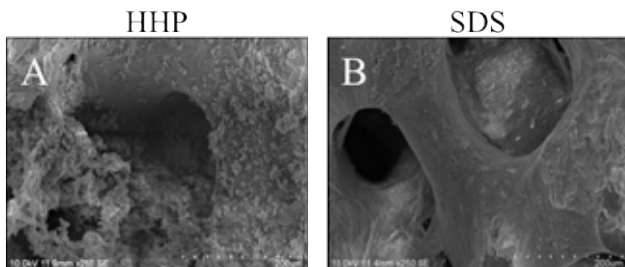


Fig. 2 Scanning electron microscope image of decellularized bone marrow treated by (A) HHP and (B) SDS.

以上、脱細胞化処理方法によって脱細胞化骨髄の構造および残存成分に差異が観察されたため、この差異による違いが誘引する影響について検討を行った。Fig.3 に C57BL/6 マウスの皮下に移植し、4 週間後に摘出した各々の脱細胞化骨髄のヘマトキシリン-エオジン染色の結果を示す。両者にて、マウス宿主細胞が脱細胞化骨髄へ浸潤している様子が観察された。HHP 処理法による脱細胞化骨髄では、脱細胞化の際に残存していた細網組織と脂肪組織の構造を維持させたまま、細網組織上に細胞が浸潤していた。一方で、SDS 処理法による脱細胞化骨髄は骨梁周囲に隙間なく細胞が浸潤していた。そのため、HHP 処理脱細胞化骨髄の Fig.3(A)においては、細網組織のネットワーク状の構造や脂肪組織の脂肪滴の空間が観察された。また、肉眼的所見では、脱細胞化後は白黄色であった脱細胞化骨髄が再び赤色を呈しており、脱細胞化骨髄内部にて造血細胞が生着し、赤血球が産生されたことが示唆された。

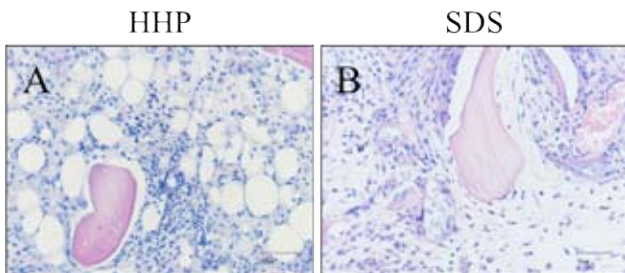


Fig.3 Histological image of implanted decellularized bone marrow to C57BL/6 mice after 4 weeks. (A): HHP, (B): SDS.

次に、脱細胞化骨髄内への造血細胞の生着を検討するために、脱細胞化骨髄の二次移植実験を行った。EGFP 陽性の造血細胞を有する C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)マウスに脱細胞化骨髄を一次移植後、造血細胞が脱細胞化骨髄に生着した後に X 線照射 C57BL/6 マウスに二次移植した場合、X 線照射 C57BL/6 マウスの血液中に EGFP 陽性の血液細胞が確認されれば、一次移植時の脱細胞化骨髄への造血細胞の生着が示される。Fig.4 に X 線照射 C57BL/6 マウスの血液中に EGFP 遺伝子発現の結果を示す。脱細胞化骨髄を二次移植したマウスの血液にて EGFP 陽性が確認された。この結果より、一次移植した脱細胞化骨髄内への造血細胞の生着が示され、また、脱細胞化骨髄内に生着した造血細胞が血液産生能を有することが示された。したがって、脱細胞化骨髄を用いることで、本来は造血が行われない皮下にて、血液産生環境が構築されたことが明らかになった。

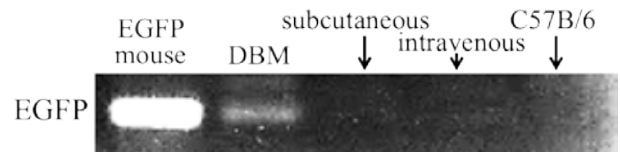


Fig. 4 Gene expression of EGFP of whole blood after 1 week of implantation to the irradiated mice.

4. 結言

本研究により、脱細胞化骨髄が造血巣として機能することが明らかとなった。今後は、脱細胞化骨髄内に生着した造血細胞の細胞種を特定するとともに、造血環境を *in vitro* で再構築することを目的として、造血幹細胞の生着に必要な要素を特定していく予定である。

5. 謝辞

本研究の一部は、学術振興会科学研究費補助金および京都大学共同研究課題萌芽の研究の助成を受けて行われた。

参考文献

- (1) Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches, *Nat Rev Immunol*, vol. 6 no. 2, pp. 93-106, 2006.
- (2) Joan E. Nichols, Joaquin Cortiella, Jungwoo Lee, et al. In vitro analog of human bone marrow from 3D scaffolds with biomimetic inverted colloidal crystal geometry. *Biomaterials*, vol. 30, pp. 1071-9, 2009.
- (3) Barker J, Verfaillie CM. A novel in vitro model of early human adult B lymphopoiesis that allows proliferation of pro-B cells and differentiation to mature B lymphocytes. *Leukemia*, vol. 14, no.9, pp. 1614-20, 2000
- (4) Wilcox HE, Korossis SA, Booth C, et al. Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *J Heart Valve Dis*, vol.14, pp. 228-37, 2005.
- (5) Hashimoto Y, Funamoto S, Kimura T, et al. The effect of decellularized bone/bone marrow produced by high-hydrostatic pressurization on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, vol. 32, pp. 7060-7, 2011.