

## 脱分化脂肪細胞を用いた骨再生の基礎研究

日大生産工(院) ○海老原俊一

日大・医学 松本太郎

日大生産工 野呂知加子

### 1 緒言

近年、日本は急激な高齢化が進み、身体の衰えからくる疾患が、医療費負担の増加や、患者の健康年齢の低下を招く事が懸念されている。

骨粗鬆症はその中の一つであり、加齢によって骨の代謝のバランスが崩れる病気である。骨量が急激に低下するため、容易に骨折してしまう。欧州、日本、米国において 7500 万人以上の患者が存在し、欧州と米国では毎年 230 万人の骨折を生じていると推定される<sup>1)</sup>。

特に大腿骨頸部の骨折は治療が難渋し、年間に 12 万件を超えると推定されている。寝たきりの原因となり、介護の必要性を増加させるなど、大きな社会問題となっている。また、寝たきりの状態から床ずれが起き、患部から感染症を発症し、約 10%が一年以内に死亡する。

新規治療法の開発により骨粗鬆症の治療は進展しているが、ひとたび骨折を引き起こすと、外科的な固定法以外に有効な方法はなく、患者の QOL を向上させるには至らないことが多い。

これらの問題を解決するため、自身の細胞や組織を用いて、失われた組織や臓器を再生し治療しようとする再生医療の研究が進んでおり、最も良く研究されている幹細胞に、骨髄間葉系幹細胞がある。

骨髄間葉系幹細胞は骨髄中に存在し、骨、軟骨、脂肪などの間葉系細胞に分化する能力を持つことが知られている。しかし、骨髄採取に伴う患者への侵襲性が高く、骨髄機能の低下した高齢者からは十分な細胞量を採取出来ないことなどから、万人への治療にはなり得ていない。

この様な経緯から、我々は脱分化脂肪細胞(以下 DFAT)に着目した。DFAT は脂肪組織から脂肪細胞を単離し、天井培養という方法で脱分化させた繊維芽細胞様の細胞群である。DFAT は骨、軟骨、平滑筋などの初期分化マーカーの発現が確認されており、多能性間葉系前駆細胞の形質を持っていると考えられる<sup>2)</sup>。また、DFAT は骨髄間葉系幹細胞と比較して、(1)採取に伴う侵襲性が著しく低い。(2)新生児から高齢者に至るまで脂肪組織は存在するので、年齢を問わず採取可能である。(3)純度の高い細胞群である。といった利点があり、特に高齢者に対する骨再生用ドナー細胞として有用であると考えられる。

本研究では、骨粗鬆症によって続発する骨折治癒の促進を目指し、ヒト DFAT の *in vitro* および *in vivo* での骨分化能と生体内での骨再生能力を DFAT の年齢別、継代数別に比較する。

---

Basic study for bone regenerative medicine with Dedifferentiated fat cells

Shyunichi EBIHARA, Taro MATSUMOTO and Chicako NORO

## 2. 実験方法

### 2-1. 使用細胞

ヒト DFAT は、日本大学医学部および日本大学付属板橋病院倫理委員会の承認を受け、手術に伴い切除され、廃棄される予定の脂肪組織を患者の同意を得て取得された脂肪組織から調整した。

### 2-2. 細胞培養

ヒト DFAT を直径 3.5cm の細胞培養ディッシュに播種し、10%FBS 含有 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen)を用い、37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下でコンフルエントになるまで培養した。培地は 4 日ごとに交換した。

### 2-3. 骨分化誘導

骨分化誘導方法は沖ら<sup>3)</sup>の方法を用いた。コンフルエントになった DFAT の培地を 10%FBS 含有 DMEM+10 $\mu$ M レチノイン酸に交換し、1~4 週間培養した。

### 2-4 骨分化度の評価

骨組織にはカルシウムの沈着と、アルカリフォスファターゼ活性の発現が特徴的である。これらを測定することで、骨分化度の指標とした。

アルカリフォスファターゼ活性は ALP 染色キット(武藤化学株式会社)、カルシウムの沈着は 1%アリザリンレッド S(Sigma)溶液を用いて染色し、測定を行った。

## 3. 今後の予定

### 3-1 至適スキャホールドの決定

近年の細胞工学の進歩により、細胞の支持体としての役割を果たし、増殖や分化を促進するスキャホールドが、再生医学の領域で利用されている。今回はオリンパスラルモ社より提供を受けた、骨への置換が比較的速い $\beta$ -TCP( $\beta$ リ

ン酸 3 カルシウム)を含有した I 型コラーゲンスポンジを用いる。この複合材料をスキャホールドとし、ヒト DFAT を播種後骨分化誘導を行い、骨分化能を評価する。さらに材料の比率やポアサイズなどを比較し、至適スキャホールドを決定する。

### 3-2 骨様組織の遺伝子発現解析

骨組織には、I 型コラーゲン、オステオカルシン、オステオポンチン、初期分化マーカーとして Runx2 などが発現している。骨誘導した DFAT 由来の骨様組織から RNA を採取、RT-PCR 法にて定量し、骨組織へ成熟度を、年齢別、継代数別に比較、評価する。

### 3-3 生体内への移植

ヒト DFAT を $\beta$ -TCP/I 型コラーゲンスポンジに播種後、3 週間骨分化誘導培地で培養した DFAT/ $\beta$ -TCP/I 型コラーゲンスポンジ複合体をヌードラットの皮下に移植する。3 週間後移植片を摘出し、骨組織への分化度を組織学的に評価する。評価方法として、マッソントリクローム染色を行う。

## 4. 参考文献

- 1)WHO Scientific Group : Prevention and Management of Osteoporosis. *World Health Organization, Geneva, 2003*
- 2)Matsumoto, T. et al.; Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells Exhibit Multilineage Potential. *J Cellular Physiology*. 215, 2008:210-222.
- 3)Oki, Y. et al.; Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells Can Trans-Differentiate into Osteoblasts InVitro only by ALL-Trans Retinoic Acid. *Cell Structure And Function*. 33, 2008 :211-222