

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659871

研究課題名(和文) 脂肪細胞由来スフェロイドを用いた組織再生の試み

研究課題名(英文) Challenges to tissue regeneration using adipose-derived spheroids.

## 研究代表者

中田 秀美(Nakata, Hidemi)

岩手医科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30451967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織は、骨髄の約1000倍の幹細胞を含むことから、体性幹細胞のソースとして注目されている。本研究ではマウス皮下脂肪より獲得した脂肪由来幹細胞(ASC)を培養し、スフェロイドを作製して、その構造と骨芽細胞分化誘導能について2次元、および3次元に解析を行った。また、ASCスフェロイドにおける、多分化能のマーカ遺伝子発現をin situ hybridizationにて解析した。さらに、単球/マクロファージ系は、移植後の局所において、骨リモデリング開始に寄与すると考えられているため、ASCスフェロイドと単球の共培養を行い、単球とASCスフェロイドの直接的相互作用を解析した(現在論文投稿中)。

研究成果の概要(英文)：Among potential cell-based therapies, adipose-derived stem cells (ASCs) have thought as a promising source of stem cells for tissue regeneration because it contains approximately 1000-fold more stem cells than the bone marrow. In the present study, we analyzed the structures and expression of marker genes for multipotency, including Oct3/4, Nanog, and Sox2 of murine-derived ASC macrospheroids by in situ hybridization. The microstructures of the ASC macrospheroids were observed by transmission electron microscopy, and cell proliferation in the spheroids was analyzed by enzyme-linked immunoassay for bromodeoxyuridine as well as the growth and osteogenic potential of these macrospheroids in three-dimensional environment and following induction of calcification by co-culture with monocytes. These results suggested that ASC macrospheroids presented high capacity for dynamic three-dimensional growth, and it might be promoted its osteogenic potential by monocytes.(Preparing for publication)

研究分野：再生医療

キーワード：脂肪由来幹細胞(ASC) スフェロイド 構造解析 共培養 単球(monocytes)

## 1. 研究開始当初の背景

顎口腔領域の臨床において、骨造成の際、骨だけの移植では、被覆する粘膜の不足のため、移植骨の露出やその状態に付随して起こる、感染などの可能性があるため、骨移植と同時に粘膜の造成や減張が必要になることも多い。しかし、粘膜の減張にも限界があることや、従来行われてきた、骨移植や粘膜移植などの自家組織移植の手術侵襲が大きいことから、それらに代わる再生療法として、採取の低侵襲な自己組織幹細胞を用いた、新しいコンセプトに基づく移植材開発に期待が寄せられている。

幹細胞は、年齢に関わらず体内の様々な組織に含まれているが、なかでも、脂肪組織は皮下の浅層に豊富に存在するため、自家骨や骨髄に比べ、採取が非常に低侵襲である上に、組織の中に含まれる幹細胞の数が骨髄に比較しておよそ 1000 倍であることから、自己体性幹細胞のソースとして近年注目されている。

美容外科などの臨床では既に、腹部などの皮下から瘦身目的で吸引された大量の脂肪組織を、幹細胞を抽出することなくそのまま移植することで、豊胸などに利用されているが、顎口腔領域の移植材として、少量の脂肪組織から骨や粘膜など、元来の組織の由来を超えた方向への分化を起こして利用するためには、脂肪組織を採取してそのまま用いるのではなく、組織の中に潜在する多分化能を持つ幹細胞を選別し、さらに培養して用いる必要がある。その選別方法や培養方法、分化誘導の方法などを、目的に応じて確立してゆく必要があると考えられる。

また、monocyte は、移植床などの創傷部に血管より遊走してきて、局所においてマクロファージ系貪食細胞(破骨細胞)に分化し、骨のリモデリング開始のシグナル伝達に参与すると考えられている。そのため、monocyte との共培養によって、ASC スフェロイドの骨芽細胞分化能が変化する可能性が考えられた。このように、自己細胞を組み合わせることで、より効率的で、しかも少量の自己の細胞を利用した低侵襲な組織移植材の開発が可能になると考えた。

## 2. 研究の目的

ASC をインビトロでマクロサイズのスフェロイドにしてから移植に用いることで、single cell のまま用いる方法と比較して、立体培養によって獲得した細胞間接着と立体構造を生かしたダイナミックな分化誘導を起こすことが可能となると考えられた。また、スフェロイドの豊富な細胞容量と増殖能を利用して、移植後短時間に細胞で場を満たすことができると考えられた。これにより、スキャフォールドフリーで用いることのでき

る自己の移植材開発に繋げることができると考えた。

本研究では ASC スフェロイドの構造解析を行い、内部で壊死に至っている部分がないかを確認した。また、操作性の良い大きなスフェロイドとなった後も間葉系幹細胞の特性である多分化能を維持しているかを確認する目的で、遺伝子発現解析を行い、ASC スフェロイドの立体培養と分化誘導、そして ASC スフェロイドと monocyte との共培養による、相互作用の解析を行った。

これらの解析は、ASC スフェロイドの骨芽細胞分化の可能性と、従来の自己組織移植に代わる新しい組織再生療法の担い手の一選択肢としての可能性について、模索を行うことが目的である。

## 3. 研究の方法

8 週齢の Imprinting Control Region (ICR) Female マウスの腹部より皮下脂肪組織を採取し、37℃ でコラゲナーゼ処理を行った後、幹細胞を分離・獲得し、培養して重層の細胞シートを形成した。そのシートをピンセットで操作できる程度の大きさのスフェロイドに成形した後、 $\beta$ -TCP ディスク、および Hydroxyapatite ディスク上に置いて培養を行った。また、スフェロイドの構造を解析し、多分化能を有するかどうかを検討する目的で、in situ hybridization を行い、多分化能のマーカー遺伝子である Oct3/4、Nanog、Sox2 mRNA の発現を確認した。

さらに、スフェロイド内部での細胞増殖を確認する目的で、BrdU の免疫染色を行い、スフェロイドの立体構造と、構成する細胞および細胞が産生する細胞外基質の特徴を透過電子顕微鏡で確認した。

そして、ASC スフェロイドを、8 週齢の ICR Female マウスより採取した、monocyte と共培養することで、ASC の骨芽細胞分化能に対する作用を解析した。また、表面抗原によって分取した ASC の骨芽細胞分化能を、骨芽細胞分化誘導および遺伝子発現解析によって比較検討した(論文 1)。

本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得て行った。

## 4. 研究成果

$\beta$ -TCP ディスク上に置いた ASC スフェロイドは数日でディスク内に侵入し、ディスク内部での放射状の成長とともに ALP 陽性を示した。また、BrdU による免疫染色の結果、直径 1mm 以上の目視できるほど大きく成長したスフェロイド内部にも細胞分裂が確認され、組織学的にスフェロイド内部に壊死は認めなかった。

スフェロイドは、大きな核を持ち幹細胞の特徴を有する表層の細胞と、立体構造の維持に必要な、コラーゲンなどの細胞外基質を大量に分泌する内部細胞で構成されており、多分化能のマーカー遺伝子の発現は、表層細胞でより強く確認された。胚葉をこえた様々な分化誘導の報告のある脂肪由来幹細胞を立体化することで、豊富な細胞外基質の分泌と三次元的な細胞接着を持つことが明らかとなり、これを立体的な細胞接着を維持したまま分化誘導することで、生体の構造に近い組織再生が実現する可能性が示唆された。

また、monocyte と ASC スフェロイドとの共培養により ASC スフェロイドの石灰化促進が認められた。このことより、monocyte によって ASC の骨芽細胞分化能が亢進した可能性が示唆された（現在論文投稿中）。

脂肪組織から採取される ASC には数種の細胞種が含まれており、培養していくうちにそれぞれが異なる細胞形態を呈していくことがわかった。そこで、細胞表面抗原 CD90 および CD105 によって分取した脂肪由来幹細胞の、骨代謝系シグナリング、wnt などの細胞増殖関連シグナリング、および細胞接着などに関連する遺伝子発現を DNA マイクロアレイでスクリーニングしたところ、同じ脂肪組織に含有される ASC においても、細胞表面抗原の違いによって、分化や増殖に関する特性や potential が異なる可能性が示唆された。また、それらの分取細胞をそれぞれ分化誘導培地で培養し、骨芽細胞分化能を比較検討したところ、ALP 活性や石灰化 nodule の形成においても、マイクロアレイの結果と同様、表面抗原によって違いがあると考えられた（論文 1）。

今後はこれらの結果をもとに、さらに研究を進め、より効率的で、生体の骨リモデリングに近い自己組織移植材開発に繋げていきたいと考えている。

## 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 2 件)

1. Maiko Yamamoto, Hidemi Nakata, Jia Hao, Joshua Chou, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda.  
Osteogenic Potential of Mouse Adipose-Derived Stem Cells Sorted for CD90 and CD105 in Vitro. Stem cells International (IF:2.806) 576358. doi: 10.1155/2014/576358. Epub 2014
2. 黒田真司, 中田秀美.  
骨再生と幹細胞. Journal of Biointegration. 2(1):165-170, 2012

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Nakata H, Yamamoto M, Hao J, Kim YK, Miyasaka M, Nagayama T, Kasugai S, and Kuroda S.  
A trial of three-dimensional bone regeneration by adipose-derived spheroids, in vitro. Academy of Osseointegration(AO) Annual Meeting, March 6-8, Seattle, 2014  
First place Scientific Poster Presentation Award 受賞
2. Kuroda S, Nakata H, Hao J, Kasugai S. Interference of PPAR $\gamma$  and acceleration of Osterix for osteoblast induction in adipocyte precursor cells. Academy of Osseointegration(AO) Annual Meeting, March 6-8, Seattle, 2014
3. 中田秀美, 山本麻衣子, 永山友子, 春日井昇平, 黒田真司.  
脂肪由来スフェロイドの三次元的分化誘導による骨再生の試み  
日本口腔インプラント学会第 43 回年次学術大会. 博多 9/13-15, 2013  
Dentsply Award 受賞
4. 黒田真司, 中田秀美, 山本麻衣子, 春日井昇平.  
PPAR $\gamma$  制御および Osterix 強制発現による, 未分化ラット白色脂肪細胞の骨芽細胞分化誘導の可能性. 日本口腔インプラント学会第 43 回年次学術大会. 博多 9/13-15, 2013
5. 山本麻衣子, 中田秀美, 春日井昇平, 黒田真司.  
CD90, CD105 陽性脂肪組織由来幹細胞の骨芽細胞分化への可能性. 日本口腔インプラント学会第 43 回年次学術大会. 博多 9/13-15, 2013
6. 宮坂宗充, 中田秀美, 山本麻衣子, 金コキョン, 黒田真司.  
低出力超音波パルス(LIPUS)と熱刺激による骨芽細胞様細胞に及ぼす影響について. 日本口腔インプラント学会第 43 回年次学術大会. 博多 9/13-15, 2013
7. 金コキョン, 中田秀美, 山本麻衣子, 宮坂宗充, 黒田真司.  
マウス頭蓋骨骨膜細胞のコラーゲン及びゼラチン培地を用いた 3 次元培養 日本口腔インプラント学会第 43 回年次学術大会.

術大会．博多 9/13-15, 2013

8. 山本麻衣子, 中田秀美, ハオジア, 春日井昇平, 黒田真司.  
CD90 陽性脂肪組織由来幹細胞の骨芽細胞分化の可能性 骨粗鬆症研究会 東京 Mar. 2013

優秀研究発表賞 受賞

9. 中田秀美, 山本麻衣子, ハオジア, 春日井昇平, 黒田真司.  
脂肪組織由来幹細胞からの立体的分化誘導の検討 第12回日本再生医療学会総会 横浜 3月 2013

10. 山本麻衣子, 中田秀美, ハオジア, 春日井昇平, 黒田真司.  
CD90 陽性脂肪組織由来幹細胞の分離と分化誘導 第33回炎症再生医学会 2012 7/5-6 福岡

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

本研究は、現時点では論文投稿中であるため、まだホームページなどへの掲載を行っていないが、掲載が確定した後は、大学の研究室のホームページや論文のインターネット上での公開などを通じて、国内外に広く情報を公開していく予定である。

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

中田秀美 (Hidemi Nakata)  
研究者番号：30451967  
岩手医科大学歯学部  
補綴・インプラント学講座 非常勤講師

### (2)研究分担者

黒田真司 (Shinji Kuroda)  
研究者番号：50323689  
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座  
インプラント・口腔再生医学分野 助教

### (3) 研究分担者

近藤尚知 (Hisatomo Kondo)  
研究者番号：70343150  
岩手医科大学歯学部  
補綴・インプラント学講座 教授