

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791896

研究課題名(和文) 脂肪組織由来間葉系幹細胞と多能性前駆脂肪細胞の骨分化能の比較

研究課題名(英文) Comparison of osteogenic potential between adipose derived stem cell and ceiling culture derived proliferative adipocyte

研究代表者

有川 理紗 (Arikawa, Risa)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60623600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞と脂肪細胞は間葉系幹細胞からの分化の最終段階で分かれることから系統上近接しており、脂肪細胞の骨分化誘導による骨欠損治療が行える可能性がある。しかし、脂肪組織由来間葉系幹細胞と天井培養由来前駆脂肪細胞のどちらが分化系上、より骨芽細胞に近いかは明らかでない。我々は同一のヒト脂肪組織から採取した脂肪組織由来間葉系幹細胞と天井培養由来前駆脂肪細胞を比較した結果、脂肪組織由来間葉系幹細胞の方が、骨分化マーカーの発現や基質石灰化能が高いことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Osteoblast and adipocyte locates near in the geneological tree of differentiation, that they bifurcate at the final stage. There is a possibility that treatment of bone defect can be achieved by osteoinduction of cells in fat tissue. However, it is unclear whether adipose derived stem cell or ceiling culture proliferative adipocyte is closer to osteoblast. We clarified that adipose derived stem cell has higher expression of regulators of differentiation into osteoblast than ceiling culture derived proliferative adipocyte. The adipose derived stem cell has higher ability to produce bone matrix in culture for inducing differentiation into osteoblasts than ceiling culture derived proliferative adipocyte.

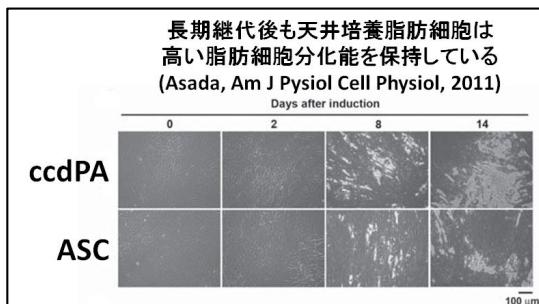
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 形成外科学

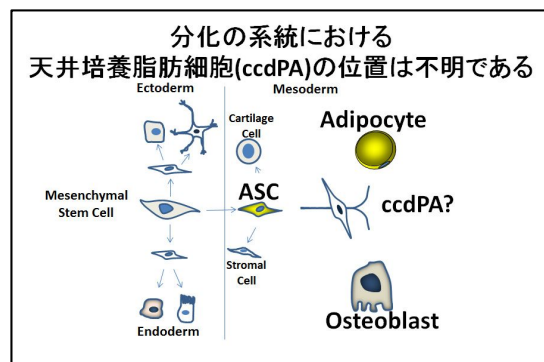
キーワード：骨分化 脂肪幹細胞 脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞と脂肪細胞は間葉系幹細胞からの分化の最終段階で分かれることから系統上近接しており、脂肪細胞の骨分化誘導による骨欠損治療が行える可能性がある。骨欠損に対する治療を要する疾患群は形成外科領域に多数存在し、幹細胞に注目した再生医療の研究が行われている。脂肪組織由来間葉系幹細胞は線維芽細胞と比較して、骨芽細胞へ分化しやすく、骨再生医療に有力な幹細胞の一つと考えられている。また、脂肪由来幹細胞は、骨髄細胞と比べて、容易に大量に採取できる利点がある。幹細胞移植を行う上で癌化は重大な問題であるが、幹細胞の脂肪分化能が高い方が発がんのリスクが低いことが明らかになっており、脂肪由来間葉系幹細胞は安全性の面では、骨髄幹細胞・ES細胞・iPS細胞より優れている(Shimizu, Oncogene, 2010)。脂肪組織から脂肪組織由来間葉系幹細胞を採取する時に同時に採取できる天井培養由来前駆脂肪細胞は、浮遊分画から採取され、脂肪組織由来間葉系幹細胞よりも脂肪細胞の方向に分化が進んだ多能性前駆細胞群であると考えられている。



我々はこれまでに同一のヒト脂肪組織から採取した脂肪組織由来間葉系幹細胞と天井培養由来前駆脂肪細胞が長期の継代後も脂肪細胞分化能の差異を保持していることを明らかにした。分化の系統樹でみた場合、骨芽細胞と脂肪細胞は近接しており、間葉系幹細胞からの分化の最終段階で分かれる細胞である。骨髄幹細胞の研究では、TNF-alpha, Wnt signal, Mechanical signalは骨芽細胞への分化を促進し、PPAR, Microgravityは脂肪細胞への分化を促進することが明らかになっており、骨髄幹細胞の分化において骨芽細胞と脂肪細胞は密接な関係がある (Takada, Expert Opin Ther Targets, 2009)。また、脂肪細胞が分泌するLeptin



が骨芽細胞の骨基質産生を促すなどのフィードバック機構があり、骨芽細胞 - 脂肪細胞間には密接な相互作用がある (Hamrick, Osteoporos Int, 2008)しかし、脂肪組織由来間葉系幹細胞と天井培養由来前駆脂肪細胞のどちらが分化系上、より骨芽細胞に近いかは明らかでない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪組織由来間葉系幹細胞と天井培養由来前駆脂肪細胞の骨分化能の違いを明らかにすることである。

3. 研究の方法

ヒト脂肪細胞を細切して、60分間のコラゲナーゼ処理の後、300g、4で5分間遠心した。沈殿した間質血管細胞群と浮遊細胞群を回収した。それぞれの細胞群からRNAを抽出したのち、逆転写酵素を用いて相補的DNAを作成した。PCRを用いて、遺伝子発現を比較した。間質血管細胞群を7日間培養して培養器底面に接着した脂肪組織由来間葉系幹細胞を得た。また、浮遊細胞を天井培養法にて7日間培養し、培養器天井面に接着した天井培養由来前駆脂肪細胞を得た。それぞれの細胞群からRNAを抽出し、逆転写酵素を用いて相補的DNAを作成した。PCRを用いて、遺伝子発現を比較した。ベータグリセロフォスフェート、アスコルビン酸、ヒドロコルチゾンから成る骨分化誘導培地を用いて脂肪組織由来間葉系幹細胞と天井培養由来前駆脂肪細胞を培養した。メタノールで固定の後、アリザリン染色にて骨基質生成能を比較した。

4. 研究成果

浮遊細胞群は、間質血管細胞群と比べて、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ、レプチン、CCAAT/エンハンサー結合蛋白デルタの発現が高かった。これは、浮遊細胞に脂肪細胞が多く含まれているためと考えられた。7日間培養後、両者は形態的に共に線維芽細胞用の紡錘形細胞となり、脂肪蓄積は全く

観察されなくなった。また、両者の脂肪分化遺伝子発現はほぼ同程度に低値となった。これは、天井培養中に脂肪細胞が急速に脱分化したことによるものと考えられた。この状態においても、天井培養由来前駆脂肪細胞は、脂肪分化誘導条件化で高い脂肪分化能を発揮するポテンシャルを保持していることは我々が既に報告済みである。

一方、ルント関連転写因子2, 転写因子Sp7などの骨分化関連遺伝子は、天井培養由来前駆脂肪細胞と比べて、脂肪組織由来間葉系幹細胞の方が高かった。脂肪細胞が培養化で急速に脱分化して脂肪細胞らしさを失うのとは対照的に、脂肪組織由来間葉系幹細胞は、培養条件化でもある程度、骨分化能を維持しているのは興味深い。

骨分化誘導条件下では、脂肪組織由来間葉系幹細胞は天井培養由来間葉系幹細胞と比べて、アリザリン染色で濃染し、骨基質生成能が高いことを示していた。

我々の研究結果からは、脂肪組織由来間葉系幹細胞は天井培養由来前駆脂肪細胞と比べて、より骨芽細胞に近く、また骨分化誘導条件下でなくても骨分化関連遺伝子を継続して発現することが明らかになった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有川 理紗 (Arikawa, Risa)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60623600