

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19592081  
 研究課題名（和文）脂肪組織幹細胞から誘導した骨による3次元形状骨の形成に関する研究  
 研究課題名（英文） Study of three-dimensional bone formation induced with adipose tissue derived stem cells

## 研究代表者

楠本健司（KUSUMOTO KENJI）  
 関西医科大学 医学部 教授  
 研究者番号：20161630

**研究成果の概要（和文）**：ヒトの手術などでの残余脂肪を得て（倫理委員会許可済み）、脂肪組織幹細胞の培養を進めた。表面抗原CDマーカー検索しCD34(+)により脂肪組織幹細胞であることを確認し、骨、軟骨、脂肪への多分化能を確認した。

脂肪組織幹細胞の骨分化誘導を行い、得られた骨芽細胞をシャーレ内で連通性ポアを有するハニカムコラーゲンスポンジに播種し、ヌードマウス背部皮下に埋入し、8週後コラーゲンスポンジ部分を摘出し、軟X線写真、ならびに光学顕微鏡、電子顕微鏡により組織学的評価を進めた。特にハニカムポア内への骨量と骨の進入状況を検討した。

**研究成果の概要（英文）**：Human adipose-derived stem cells (ASCs) have the capacity to regenerate and the potential to differentiate into multiple lineages of mesenchymal cells, bone, cartilage, and fat cells. The ASC-loaded honeycomb collagen scaffolds cultured for 14 days were subcutaneously transplanted into nude mice, and excised after 8 weeks. Bone formation in vivo was examined using HE stain, von Kossa stain, and osteocalcin immunostain. These results suggest that this carrier is a suitable scaffold for ASCs and will be useful as a three-dimensional bone tissue engineering scaffold in vitro and in vivo.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：生物・生物工学；移植・再生医療；バイオテクノロジー；脂肪組織；幹細胞；骨；骨新生；再建

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療の中で、ES細胞をはじめとする幹細胞から分化誘導の応用が大いに期待され、特にES細胞が分化万能の細胞としていかなる臓器や細胞にも導けることを期待されているものの、いまだ倫理的な問題や限られた施設や条件下での使用となっていることも含め、汎用性に問題を残している。一方、最近身体を構成する主要な組織細胞にも多分化能を有す体性幹細胞、組織幹細胞の存在が明らかにされつつある。今回対象としている脂肪組織中の幹細胞は、多分化能が確認され、将来の臨床応用が大いに期待されている。また、脂肪組織は、特に形成再建外科領域では、極めて低侵襲、あるいは手術などの余剰組織として採取できるため、その将来の臨床応用を想定しても極めて理想的である。本法が、骨、軟骨、脂肪などへ再生応用する医療の本流として発展させるためには、あらかじめ基礎的に十分検討されることにより、前臨床検討や臨床応用が実現されていくものと考えられる。

2001年Zukが脂肪組織にいわゆる”組織幹細胞”があり、骨・軟骨・脂肪などへの多分化能を持つことを示した。具体的には、脂肪組織をコラーゲナーゼ処理後、遠心分離し、沈下層に含まれる脂肪組織幹細胞を分離培養し、骨、軟骨、脂肪の分化誘導培地で培養した結果、骨、軟骨、脂肪を導けることを明らかにした(Zuk PA et al. Tissue Eng 7:211-28, 2001.)。

この方法により分離培養されたいわゆる“脂肪組織幹細胞”が多分化能を持つことが明らかにされたが、その分化した細胞が臨床応用に対応できるだけの十分量を得ることができるかは世界的にも未だ明らかにされていない。これを解決するためには、適切に分化誘導された細胞が、十分量の細胞数まで増殖すること、サイトカインの動員によりさらに増幅できること、目的とする3次元形状を形成し保つことができること、が臨床応用

へのカギである。今回の研究は、脂肪組織幹細胞からの3次元形状骨を導く再生医療における実際の応用に繋がる重要なテーマである。

本研究により、培養の安定性、誘導細胞数、細胞増幅、3次元形状安定についての成果の積み重ねていくことにより、臨床応用への展開を示すことができると考える。国内外で、脂肪組織から多分化能をもつ幹細胞から骨の誘導の検討がされているものの、未だ実臨床で必要とする3次元形状骨を導く再生医療の系が確立されておらず、本研究にて前臨床検討として明らかにすることを目指している。

## 2. 研究の目的

近年、再建外科では個体自体に供与部(Donor)を不要とする理想的手法として再生医学が注目され、幹細胞、サイトカイン、遺伝子導入、細胞培養の種々の先進的アプローチにより様々な条件を設定して実験的に検討されている。

本研究では、ヒトの脂肪組織から多分化能を有する幹細胞を分離培養し、誘導により得られた骨芽細胞をアテロハニカムコラーゲンスポンジに播種し、再建に有用な用量、目指した3次元形状骨を得ることを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### A: 脂肪組織採取と幹細胞の分離培養:

(1) 脂肪組織幹細胞の培養: 説明と同意を得て、ヒトの本来廃棄する余剰分の皮下脂肪組織(成熟白色脂肪細胞)から成熟白色脂肪組織を採取する。これをリン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、剪刀で細切し、PBS中で0.2%コラーゲナーゼにより37度、1時間処理する。これを100ミクロンのメッシュで濾過し、細胞浮遊液を遠心沈殿(500rpm×5min.)し、沈下層を採取する。これをあらかじめ準備した10%仔牛血清(10%FBS)とDMEM培養液が入ったシ

シャーレ内に入れ培養を進める。10-14日でシャーレ底への接着を確認後、培養液を半量廃棄し、シャーレがコンフルエントになる4日ごとに培地交換し単層培養を進める。この段階で、細胞増殖曲線を出しておく。

(2) 多分化能を有する脂肪組織幹細胞の確認：上記の方法により採取された細胞をFACSにより表面抗原CDマーカー検索しCD34(+)により脂肪組織幹細胞であることを確認する。さらに、骨分化培地(10%FBS添加DMEMに0.1 μM dexamethasone, 50 μM ascorbate-2-phosphate, 10mM β-glycerophosphate 付加)適用後の von Kossa 染色、ALP 活性を、軟骨分化培地(1%FBS 添加DMEMに6.25 μg/ml insulin, 10ng/ml TGF β 1, 50nM ascorbate-2-phosphate 添加)適用後の Alcian blue 染色で、脂肪分化培地(10%FBS 添加DMEMに0.5mM isobutyl-methylxanthine (IBMX), 1 μM insulin 200 μM indomethacin 添加)適用後の oil red O 染色で、それぞれ脂肪組織幹細胞の骨・軟骨・脂肪への多分化能を確認する。

**B:骨分化誘導とハニカムコラーゲンスポンジへの播種、埋入後の3次元形状骨の評価：**

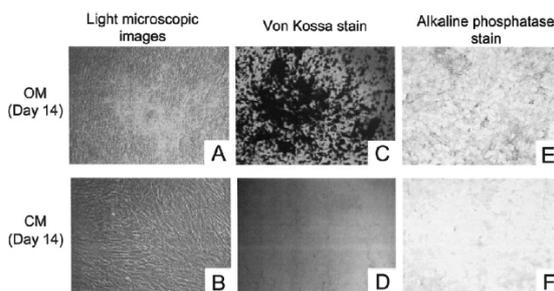
得られた脂肪組織幹細胞を、24well マルチプレートに 8x10<sup>4</sup> 個播種し、コントロール培地(10%FBS添加DMEM)を用いてコンフルエントになってから(1)コントロール培地と(2)骨分化培地(10%FBS添加DMEMに0.1 μM dexamethasone, 50 μM ascorbate-2-phosphate, 10mM β-glycerophosphate 付加)で培養し比較検討する。なお、各培地には、contaminationを防ぐ目的で50U/ml ペニシリン、50mg/ml ストレプトマイシンを添加しておく。2週後、von Kossa 染色、osteocalcin 免疫染色と培養液の Alkaline Phosphatase(ALP)活性を検査する。

得られた骨芽細胞をシャーレ内で100ミクロンの連通性ポアを有するハニカムコラーゲンスポンジに播種し、ヌードマウス背部皮下に埋入する。8週後、コラーゲンスポンジ部分を摘出し、軟X線写真、ならびに光学顕微鏡、電子顕微鏡により組織学的評価を行

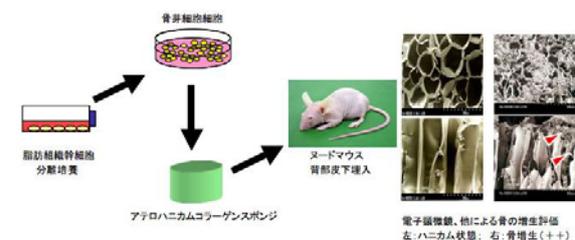
う。特にハニカムポア内への骨量と骨の進入状況を検討する。一部個体は生化学的にALP活性で骨量を検討する。

**4. 研究成果**

脂肪組織から幹細胞を単離培養し、骨の3次元形状骨を得る系で、幹細胞から骨芽細胞を導く段階に、サイトカイン(bFGF, TGF-β 1, BMP-2)を各培養液中に付加し、骨芽細胞の増生ならびに誘導された骨量と骨の性状を検討した。

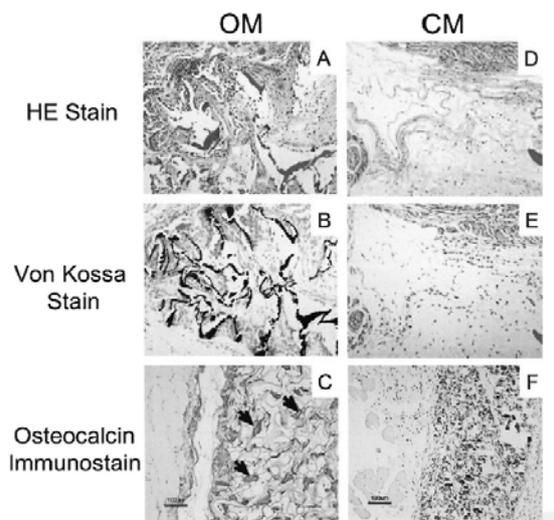


ASCs を骨誘導培地とコントロール培地で14日間培養した結果、上記のように骨誘導培地でのASCsは光顕における細胞が、vonKossa染色陽性、ALP染色陽性として骨への誘導を明らかにした。



検討項目として、軟X線写真、ならびに光学顕微鏡、電子顕微鏡により組織学的評価を行った。特にハニカムポア内への骨量と骨の進入状況を認めた。一部個体は生化学的にALP活性で骨量を検討した。

3次元骨の切片においても、vonKossa染色陽性、Osteocalcin免疫染色陽性で、3次元骨の誘導が示された。



## 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4件)

1) Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg* 122(5):1352-1360, 2008.

2)Kakudo N, Shimotsuma, A, Miyake S, Kushida S, Kusumoto K: Bone tissue engineering using human adipose-derived stem cells and honeycomb collagen scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* 84(1):191-197. 2008.

3)覚道奈津子, 鈴木健司, 櫛田哲史, 楠本健司: ヒト脂肪組織由来幹細胞の分離と脂肪・骨・軟骨への分化 -幹細胞の供給源としての脂肪組織- *関西医科大学雑誌* 59(2-4):169-176, 2008.

4)Kakudo N, Shimotsuma A, Kusumoto K: Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human

adipose-derived stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 359(2):239-244, 2008.

すべて査読あり

[学会発表] (計10件)

1)覚道奈津子, 鈴木健司, 櫛田哲史, 楠本健司: ヒト脂肪組織由来幹細胞と増殖因子を用いた組織再生と展望 第18回日本形成外科学会基礎学術集会 シンポジウム 2009/10/1 東京, 都市センターホテル

2)Satoshi Kushida, Natsuko Kakudo, Kenji Kusumoto: Effects of collagen gel contraction with TGF- $\beta$ 1 and PRP in embedded culture of adipose-derived stem cells of dermal fibroblasts The 7th Annual Meeting of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science 2009/10/15 Daegu, Korea, Hotel Inter Burgo

3)Natsuko Kakudo, Satoshi Kushida, Kenji Kusumoto: Possibility of myofibroblast differentiation of human adipose-derived stem cell. The 7th Annual Meeting of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science 2009/10/15 Daegu, Korea, Hotel Inter Burgo

4)覚道奈津子, 櫛田哲史, 楠本健司: 線維芽細胞・脂肪組織細胞に対する多血小板血漿および線維芽細胞増殖因子による増殖効果 第41回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2009/09/04 神戸市, 神戸国際会議場

5)覚道奈津子, 南方竜也, 光井俊人, 櫛田哲史, Frederik Zefanya Notodihardjo, 楠本健司: Platelet-Rich Plasma(多血小板血漿)によるヒト脂肪組織由来幹細胞とヒト線維芽細胞に対する細胞増殖効果 第17回日本形成外科学会基礎学術集会 2008/10/02 東京, リーガロイヤルホテル東京

6)Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, F.Z.Notodihardjo, Kusumoto K: Proliferation-promoting effect of PRP on human ASCs and DFs The XIXth Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery 2008/09/10 Bologna, Italy, Palazzo della Cultura e dei Congressi

7)覚道奈津子, 下間亜由子, 楠本健司 : ヒト脂肪組織由来幹細胞における FGF-2 の脂肪分化に与える影響 第 37 回日本創傷治癒学会 2007/12/06 横浜市, 横浜ロイヤルパークホテル

8)覚道奈津子, 下間亜由子, 楠本健司 : ヒト脂肪組織由来幹細胞における FGF-2 の脂肪分化に与える影響 第 16 回日本形成外科学会基礎学術集会 2007/10/11 神戸市, クラウンプラザ神戸

9)覚道奈津子, 大西早百合, 南方竜也, 楠本健司 : PRP (多血小板血漿) と PRS (血小板放出上清) がヒト脂肪由来幹細胞の増殖に及ぼす影響 第 16 回日本形成外科学会基礎学術集会 2007/10/11 神戸市, クラウンプラザ神戸

10)Kakudo N, Shimotsuma A, Kusumoto K: Osteogenic potential of adipose-derived stem cells in vitro and in vivo. British Association of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgeons 2007 Summer Scientific Meeting 2007/07/03 Deauville, France, the Royal Barriere Hotel

[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

楠本健司 (KUSUMOTO KENJI)  
関西医科大学 医学部 教授  
研究者番号: 20161630

### (2) 研究分担者 (平成 21 年 2 月辞退)

大西早百合 (ONISHI SAYURI)  
関西医科大学 医学部 助教  
研究者番号: 50440970

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: