

ヒト脱分化脂肪細胞および間葉系幹細胞
における骨分化・再生能の比較検討

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系整形外科学専攻

澤田 浩克

2015 年

指導教員 徳橋 泰明

ヒト脱分化脂肪細胞および間葉系幹細胞
における骨分化・再生能の比較検討

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系整形外科学専攻

澤田 浩克

2015 年

指導教員 徳橋 泰明

目次

概要	・・・・・・・・・・	1
緒言		
1	はじめに	・・・・・・・・・・ 3
2	骨の機能と骨折	・・・・・・・・・・ 4
3	骨折治癒	・・・・・・・・・・ 4
4	骨折治癒とサイトカイン	・・・・・・・・・・ 7
5	骨移植	・・・・・・・・・・ 7
6	骨折治癒の影響する諸因子	・・・・・・・・・・ 8
7	骨折治癒の異常経過	・・・・・・・・・・ 9
8	再生医療（細胞治療）	・・・・・・・・・・ 11
9	脱分化脂肪細胞	・・・・・・・・・・ 13
目的	・・・・・・・・・・	14
対象と方法	・・・・・・・・・・	15
結果		
1	ヒト BM-DFAT, SC-DFAT, BM-DFAT, ASC の調製	・・・・・・・・・・ 19
2	BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSc, ASC の in vitro における骨分化能の比較	・・・・・・・・・・ 20

3	マウス骨折モデル骨折部位の経時的形態変化	20
4	マウス骨折モデルに対する DFAT 移植の効果	21
	考察	22
	まとめ	27
	謝辞	28
	図表	29
	引用文献	44
	研究業績	49

概要

【背景】高齢者の増加に伴い、骨粗鬆症性骨折が増加している。骨粗鬆症性骨折の特徴として若年者より骨癒合に時間を要することが挙げられる。骨折治癒を促進させるための治療戦略として細胞を用いた再生医療が注目されている。骨疾患に対する再生医療には高い骨分化能を有する骨髄間葉系幹細胞 (bone marrow mesenchymal stem cell: BM-MSC) や脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stromal cell: ASC) が細胞源として注目され、これらの細胞を用いた臨床研究も開始されている。成熟脂肪細胞から調製される脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) は BM-MSC や ASC に類似した特性を示し、骨再生能や骨密度増加作用を有することが報告されている。骨髄中にも脂肪細胞が存在し、皮下脂肪組織と同様に DFAT を調製することが可能である。しかし DFAT が BM-MSC や ASC と同等の骨分化能・再生能を有するか明らかになっていない。また皮下脂肪由来 DFAT (SC-DFAT) と骨髄脂肪由来 DFAT (BM-DFAT) の骨分化能に差異があるか明確ではない。

【目的】同一ヒト由来の BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC を調製し、これらの細胞の骨分化能を *in vitro* で明らかにする。さらに免疫不全マウス大腿骨骨折モデルの骨折部位にこれらの細胞を移植し、骨再生能の差異を *in vivo* で明らかにする。

【方法】人工膝関節置換術を受ける患者より事前の同意を得た上で、同一ドナーに由来するヒト BM-DFAT、SC-DFAT、BM-MSC、ASC を調製した。これらの細胞を骨分化誘導培地にて 3 週間培

養した後、Alizarin Red S 染色を行い、カルシウムの沈着を顕微鏡で観察した。また 8 週齢雄の免疫不全 (SCID) マウスに大腿骨横骨折を作成し、骨折間隙に BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC 1×10^5 個をペプチドハイドロゲル (PHG) と混合し骨折部に注入した。BM-DFAT 群、SC-DFAT 群、BM-MSC 群、ASC 群、各群 n=10、また PHG のみを注入するマウスを Control 群 n=10 とした。4 週間後に両側大腿骨を摘出し、Micro CT にて骨構造解析を行い推定仮骨量 BV(左大腿骨量-右大腿骨量) (BV(Lt-Rt))・骨密度 (BMD) を測定し 5 群間で比較検討した。

【結果】 In vitro における骨分化誘導実験では、BM-DFAT, BM-MSC は SC-DFAT, ASC に比べ高い骨分化能を示した。骨折モデルマウスに対する移植実験では、各群すべてのマウスで骨癒合が認められた。Micro CT による解析の結果、BM-DFAT 群と BM-MSC 群では Control 群に比較し骨皮質が厚くなる傾向があり、また海綿骨も密になる傾向を認めた。骨折部の BV(Lt-Rt)において BM-MSC 群は Control 群に比べ有意に低値を示した。骨折部の BMD は BM-DFAT 群と BM-MSC 群は Control 群に比べ有意に高値を示した。

【結論】 BM-DFAT は BM-MSC と類似した骨分化能と骨折治癒促進作用を認めた。BM-DFAT は特に高齢者における骨折治癒促進を目的とする細胞治療の細胞ソースとして有用である可能性が示された。

緒言

1 はじめに

現代、日本では超高齢社会であり今後も高齢者率は上昇が予測されている。整形外科領域では年齢に従い骨粗鬆症患者の増加、それに伴う骨粗鬆症性骨折数の上昇が予想される。中でも大腿骨頸部骨折・大腿骨転子部骨折は患者のADLやQOLを大幅に低下させる原因となり、介護を必要とする人の増加など社会的負担にもなり得る。高齢者骨折の特徴としては骨癒合能が低く、若年者より骨癒合に時間を要する特徴がある。また骨折遷延治癒、偽関節においても同様であり治療に難渋することも少なくない。骨癒合能を高めることで現在よりも早期離床でき、痛みも早く改善し、よりADL・QOLの低下を防ぐ効果が期待できる。またより低侵襲な治療へと変化し、複数回にわたる手術を減らすことができる可能性がある。

骨癒合を早める有効な治療はまだ確立していない。現在盛んに研究が行われており、特に再生医療の分野は注目されている。現在、骨髄間葉系幹細胞(bone marrow mesenchymal stem cell: BM-MSC)¹⁾²⁾³⁾、脂肪組織由来間葉細胞(adipose-derived stromal cell: ASC)が多く扱われており⁴⁾⁵⁾、それによる骨癒合促進効果が示され、徐々に臨床応用されてきている⁶⁾。Matsumotoらは新しい細胞ソースとして成熟脂肪細胞を脱分化させることにより⁷⁾、高い増殖能と骨髄間葉系幹細胞(MSC)と同等の多分化能を示す細胞群である脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)を調製する培養法を確立している。本研究で

は高齢者からでも簡便に採取できる DFAT を利用し、骨折に対する治癒の促進効果を目的とした細胞治療の可能性を検討した。

2 骨の機能と骨折

骨は、身体の支持、内臓の保護、ミネラルの貯蔵、造血組織としての機能を有する。また、生体に必須のカルシウムやリンの貯蔵庫として機能し、各種ホルモンの制御により、血中ミネラルの恒常性を保つ働きがある。骨は海綿骨と皮質骨からなる。骨の力学的強度は、主として石灰化した骨基質により保たれている。骨基質は骨芽細胞により合成されたコラーゲンを主成分とした有機基質にヒドロキシアパタイトを主成分とした無機基質（骨塩）が沈着して形成されている。コラーゲンは弾性を、骨塩は剛性を付与している。したがって、骨は弾性と剛性を有した複合材料と考えられる。この複合材料が、外力などにより破綻し、骨の連続性が一部または全部が絶たれたものを骨折という。重度の骨折では、骨片が粉碎し、骨の欠損が生じることがある。

3 骨折治癒

骨折と同時に骨髄、骨折面、骨膜下、骨周囲軟部組織に出血が起こる。次に外傷による組織の挫滅・壊死、毛細血管やリンパ管の循環障害によって骨折部周辺に浮腫、充血、細胞浸潤などの外傷性炎症が広がる。出血により骨折部に血腫を形成し、

血腫は線維素や血液凝固因子の融出によって凝固が促進され凝血塊を形成する。このようにして両骨折端の間隙が血液凝塊にて満たされる。この血腫の中に線維芽細胞が増殖し、毛細血管新生を促し数日後に血腫は肉芽組織に変化する。さらに肉芽組織は器質化が進行し線維網が豊富となって両骨折端を連結する。この段階では石灰化は起こっておらず結合織性仮骨と呼ばれる。この肉芽組織に骨塩の沈着が始まり、仮骨(callus)を形成する。仮骨は線維性組織、線維軟骨、幼若骨組織よりなる。仮骨が骨化する際、骨膜、内骨膜、血管内皮細胞に由来する骨芽細胞や、軟骨細胞が重要な働きを担う。まず結合組織及び軟骨組織の器質に石灰化が起こり、結合織性骨化、および軟骨内骨化によって幼若骨が形成される。初期に仮骨は血管に富み網状であるが、その後の骨吸収と骨添加の改変が繰り返され海綿骨を持つ成熟骨へと変化する。骨折後 4~5 週間で仮骨が過剰に形成され、7 から 12 週間になると完全に骨化する。このように仮骨が骨化して両骨折端が硬く癒合することを硬化と呼ぶが、外力に対してはもともとの強度よりも弱い。骨は自己矯正力が働き、元々の形状・機能に戻ろうとする働きがありこれをリモデリングと言う。変形の凸側は吸収され、凹側は骨添加が起こる。徐々にリモデリングが進行し長期間のうちに両骨片の骨髓腔は互いに交通し、海綿骨を形成し、骨皮質も復元される。実験的には間葉系細胞が線維細胞、軟骨細胞、骨芽細胞のどの方向に分化するかは、骨折局所の力学的、生理的影響を受ける。骨折端に働く引っ張り力は線維性結合を形成し遷延癒合また

は偽関節の方向に進む、反対に圧縮力は軟骨組織を形成し、これから軟骨内骨化により骨組織形成に向かう。さらに過剰な圧縮力が加わった場合には軟骨内骨化は衰退し、遷延癒合または偽関節形成の方向に進む。

骨折部の固定が完全で動揺性がなく、引っ張り力が働かず圧縮力が軽微な場合には肉芽組織の線維細胞を経て骨組織に移行する。また細胞分化の方向づけは血流の豊富さや局所の酸素分圧の高低にも左右される。血流が豊富で酸素分圧が高いときには骨形成に向かい、血流が悪いか酸素分圧が低いときには軟骨や結合組織へ向かうといわれている。

仮骨の量は正常範囲内のものでもかなりの差があり、骨膜下骨折や骨膜の裂傷が少ないものでは仮骨量も少ないが、転位や骨膜剥離が大きいもの、粉碎骨折、斜骨折では仮骨が非常に大きくなることがある。あまりに多い仮骨形成は過剰仮骨という。関節近傍の骨折では仮骨は過剰になりやすい傾向がある。短小骨、扁平骨では仮骨は一般的に少ない。

骨折治癒には一次的骨折治癒と二次的骨折治癒の2つの形式がある。一次的骨折治癒は骨折転位がまったくなく絶対的に強固な骨接合術が行われた場合のみ見られるもので、仮骨を形成することなく直接骨癒合する。骨折間隙は直接骨で結合する。骨折端にはハバース間の強い再生が起こり縦方向に延び骨を貫通し直接ハバース管の再生により骨癒合が起こる。この場合レントゲンなど検査で骨癒合の程度を評価することが困難であり、強度が弱く再骨折を起こすことがある。一方、二次的骨

折治癒は通常の骨折治癒過程で仮骨を形成し、癒痕を伴って治癒する。

4 骨折治癒とサイトカイン

骨折の修復には、骨折部における細胞の増殖と軟骨細胞や骨芽細胞への分化の両者が必要である。この過程での細胞機能の制御には、局所因子としての増殖因子やサイトカインが重要な役割を担っている。骨折初期では未分化間葉系細胞の増殖に Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) や Transforming Growth Factor β (TGF- β) が関与し、骨基質に多く含まれる Insulin-like Growth Factor (IGF) は前骨芽細胞の増殖や軟骨細胞の基質合成に関与している。BMP は、骨折初期に骨折部近傍の骨膜や骨髄内に一過性に発現が亢進し、未分化間葉系細胞を軟骨細胞や骨芽細胞に分化させ、仮骨形成に関与する。炎症性サイトカインである Interleukin-1 (IL-1) や Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) は、骨折による炎症の場で産生・分泌され、血管新生促進や、貪食反応、骨吸収に作用する。

5 骨移植

骨移植 (bone graft) には自家骨移植、同種骨移植、人工骨移植がある。骨移植の目的は、骨腫瘍や感染による骨欠損の補填、難治性骨折や偽関節などの修復促進、関節固定や脊椎固定の骨性架橋、人工関節の弛みによる母床骨の補填などに用いられる。従来から、患者自身の腸骨、腓骨などから移植骨を採取し、患

部に移植するという自家骨移植が広く施行されてきた。自家骨移植は、さらに海綿骨移植、皮質骨移植、血管柄付き骨移植に分類される。一般に、自家骨移植片は、いったん吸収され、後に新生骨に置換される。海綿骨移植では、骨形成細胞が存在し骨を形成するため、骨再生効果に優れる。血管柄付き骨移植では、移植骨は壊死に陥らないため、骨再生効果は大きい。一方、自家骨のみでは量的に不十分な場合や、自家骨採取の侵襲を避けたい場合などに、同種保存骨が用いられる。同種保存骨の問題点としては、生きた骨形成細胞が存在しないことから骨再生作用は低いこと、また、抗原抗体反応や疾患感染の危険性などが挙げられる。近年、自家骨移植に代わり、セラミックなどの人工骨が開発され、臨床で広く使用されている。一般的には自家骨移植が最も骨癒合効果は高く、骨折遷延治癒や偽関節の治療に用いられる。一方同種骨移植、人工骨移植では偽関節の治療には骨癒合効果は少なく行われなことが多い。

6 骨折治療に影響する諸因子

骨折癒合に要する期間は全身的には年齢、全身状態、個人差があり、局所的には骨折型、骨折部位、感染の有無、あるいは治療法など多数の因子に左右される。部位による癒合期間は中手骨 2 週、肋骨 3 週、鎖骨 4 週、前腕骨 5 週、上腕骨骨幹部 6 週、脛骨、上腕骨頸部 7 週、両下腿骨・大腿骨 8 週、大腿骨頸部 12 週と言われている。

骨折の癒合に影響する全身的条件には栄養不良、悪液質、糖

尿病、骨代謝疾患などがある。成人は小児より約 30% 骨癒合期間が多く必要とされる。

局所条件としては骨折型、固定性の問題、骨折の部位、感染の有無、不適當な手術などがある。横骨折は斜骨折より治癒に多くの日数を要する。大きな骨欠損、軟部組織の介在では癒合が難しくなる。また転位が大きく固定性が不十分な場合、より長期の期間を要する。骨折部位に悪影響を及ぼすのは骨折部の屈折運動、牽引力、剪力である。癒合を促進させるのは観血的な圧迫力である。

骨折した骨によって癒合期間は異なり、同一骨の中でも部位により異なる。これは血流量と関係があるといわれており、上腕骨遠位端や大腿骨遠位端は血流が豊富であり癒合しやすい。一方で大腿骨頸部や、舟状骨は血流が少なく癒合期間が長くなるうえ、偽関節となりやすい骨の代表骨折である。また開放骨折、骨欠損を伴う場合や感染を伴った場合、骨癒合しにくい。

7 骨折治癒の異常経過

骨折の治癒には整復と固定が必要であるが、この 2 つの条件だけで、常によく癒合するとは限らない。前述の種々の因子によって治癒過程が影響を受けて異常な過程をたどることがある。

(1) 変形癒合 malunion

解剖学的な形態と異なった異常な形態で癒合が完成した状態である。整復位不良のまま固定が行われた場合や、整復位が

保持できなかつた場合などに角状変形（内反・外反、あるいは屈曲など）、回旋、短縮変形などが起こることがある。

著しい変形はたとえ自家矯正力があっても隣接関節の機能に影響するので、可能なかぎり良好な整復位を得る必要がある。特に回旋変形は自家矯正されない。

(2) 遷延癒合 delayed union

骨折治癒に必要と予測される期間を過ぎても骨癒着がみられない状態で、骨折部の癒合過程は緩慢ではあるが残存しているものをいう。したがって、骨癒合を妨げている因子があれば、これを解決することによって再び骨癒合は進行する。一般に、骨折後 3～4 か月たっても癒合しない場合を遷延癒合という。不十分な固定が原因であることが最も多い。

(3) 骨癒合不全 nonunion

骨折部の癒合過程が止まってしまった状態である。骨折端は丸みを帯び委縮し、骨髓腔は硬化した骨で閉鎖される。骨折間隙は線維状の癒痕組織で充満され、異常可動性を認める。骨癒合不全のうち骨折間隙に関節液様の粘液性組織液がみられるものを偽関節(pseudo-arthrosis) という(ただし骨癒合不全すべてを偽関節と呼ぶことも多い)。骨癒合不全の原因は不十分な固定、感染、骨欠損などである。一般的な治療としては硬化あるいは委縮した骨折端を切除し、骨髓腔を開通させ、十分な自家骨を移植するとともに、安定した固定を施す。遷延癒合と骨癒合不全は、通常、受傷後の期間と X 線像によって判定される。一般に、6～8 か月たっても癒合しない場合を骨癒合不

全とよぶ。また、X線像で骨折端に骨硬化、骨萎縮などが明らかであれば骨癒合不全とする。しかし両者を鑑別することは必ずしも容易ではない。1つの補助診断法としては $^{99m}\text{TcMDP}$ による骨シンチグラフィーがある。骨折端に集積が認められれば骨への血流があることを示し、ある程度の骨折修復能が残存すると予測できる。

8 再生医療（細胞治療）

分子生物学や細胞工学の進歩により、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いる。整形外科領域においても、骨、軟骨、腱、靭帯、神経、脊髄など、運動器における広い分野で再生医療に関する基礎研究が行われ、一部では臨床応用も開始されており、今後の進展が期待されている。骨組織は元来自己治癒能力に優れた組織であるが、骨再生能力にも限界があり、大きな骨欠損や骨欠損を伴う骨折は自然には修復されない。骨に関する臨床上の問題点として、骨折後の偽関節、骨腫瘍切除後などの広範囲な骨欠損、高齢者における骨癒合能の低下などが挙げられる。従来の自家骨移植や同種骨では対応しきれない場合などでは、再生医学を応用した骨再生が期待されている。現在、再生医療に用いられる細胞源として胚性幹細胞(embryonic stem cells: ES細胞)、人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells: iPS細胞)がある。全ての細胞への分化能を有するが、免疫拒絶反応、奇形腫の問題⁸⁾、さらに、宗教、倫理的問題が残存して

いる。一方、生体内に微量に存在する体性幹細胞は、倫理的問題が少ないこと、腫瘍原性が非常に少ないと考えられていることから、再生医療用ドナー細胞として有望視されている。骨再生に関しては、骨髄細胞を付着培養することにより得られる細胞群である骨髄間葉系幹細胞 (bone marrow mesenchymal stem cell: BM-MSC) を中心に多くの基礎研究、そして現在では少しずつ臨床治験が開始されている。しかし BM-MSC は細胞採取に伴う侵襲が高く、特に骨粗鬆症を有するような高齢者では、骨髄が枯渇しているため骨髄細胞の採取が困難であり、また骨髄中に存在する幹細胞数が極端に少ないといった問題点がある。そのため、骨粗鬆症における自己 BM-MSC を用いた細胞治療は、困難な可能性がある。

最近の研究で、脂肪組織には多種類の細胞が存在し、その 1 つに間葉系幹細胞に類似した細胞が含まれていることが明らかになった。Zuk らはこの細胞が多分化能を有することを見出した⁹⁾¹⁰⁾。この細胞は、脂肪組織由来間葉細胞 (adipose-derived stromal cell: ASC) と呼ばれ、BM-MSC に代わる細胞治療として注目されている¹¹⁾¹²⁾。骨再生に関する研究も盛んに行われ¹³⁾¹⁴⁾、臨床応用もされている⁶⁾。ASC は脂肪組織からコラゲナーゼ処理により単離した多種類の細胞群を含む stromal vascular fraction (SVF) 分画を付着培養することにより得られるため、純度の高い細胞を獲得することは困難であり他細胞の混入してしまうといった問題点がある¹⁵⁾。また BM-MSC と比較し骨形成能は劣る可能性も示唆されている¹⁶⁾¹⁷⁾。

9 脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell : DFAT)

現在、骨・軟骨領域における再生医療での早期臨床応用可能な細胞ソースとして注目されているのは BM-MSC と ASC であり、骨癒合促進効果も示されている。しかし実際の臨床において高齢者では骨髄は脂肪髄となり、採取可能な BM-MSC が非常に少ない状態であり、必要量の細胞数が得られないといった問題点が残る。実際に臨床応用していく上での必要項目としては低侵襲に安全かつ簡便に採取でき、少量の採取で可能であり、さらに純度の高い細胞を大量調製できる必要がある。

Matsumoto らはこれらの問題点を解決する新規再生医療用ドナー細胞として成熟脂肪細胞に注目し、ヒトを含む哺乳類の脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を、天井培養という方法で体外培養することにより生じてくる線維芽細胞様の形態をした細胞群が高い増殖能と多分化能を獲得することを明らかにした⁷⁾。一度終末分化した細胞でも適切な環境下で培養すれば、人工的に未分化な細胞へと脱分化可能である。この成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞は、脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell : DFAT) と呼ばれる。DFAT は培養 BM-MSC や ASC のように生体組織に微量に存在する幹細胞を付着培養後、増殖させ得られる細胞群に比べ①成熟脂肪細胞分画から調節される細胞であることから、煩雑な選別操作なしで純度の高い細胞が得られる、②組織採取量が微量 (1g 以下) ですむことから、全身状態が不良な患者や高齢者からも調整できる、と

いった優位性がある。また、DFATはiPS細胞やES細胞のような全能性は有さないが、遺伝子操作やウイルスベクターなどを用いない簡便な方法で短期間に大量調整が可能であり、また腫瘍化の可能性が低いことなど再生医療用ドナー細胞として早期の臨床応用が期待できる。さらには、外科手術時に廃棄される脂肪組織を利用できれば、バンキングシステムの構築も容易であると考えられる。こういった利点も含め、骨再生用ドナー細胞としても有用であると考えられる。

目的

骨疾患に対する再生医療では高い骨分化能を有するBM-MSCやASCが細胞源として注目され、これらの細胞を用いた臨床研究も開始されている。DFATはBM-MSCやASCに類似した特性を示し、骨再生能や骨密度増加作用を有することが報告されている¹⁸⁾。骨髄中にも脂肪細胞が存在し、皮下脂肪組織と同様にDFATを調製することが可能である。しかしDFATがBM-MSCやASCと同等の骨分化能・再生能を有するか明らかになっていない。また皮下脂肪由来DFAT(SC-DFAT)と骨髄脂肪由来DFAT(BM-DFAT)の骨分化能に差異があるか明確ではない。今回、同一ヒト由来のBM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASCを調製し、これらの細胞の骨分化能を*in vitro*で明らかにする。さらに免疫不全マウス大腿骨骨折モデルの骨折部位にこれらの細胞を移植し、骨再生能の差異を*in vivo*で明らかにする。

対象と方法

1 実験動物

実験動物として日本チャールズリバー社より購入した免疫不全マウス（SCID マウス）8 週齢雄を用いた。飼育条件は至適環境に保たれたケージ内で飲食制限なく飼育した。本実験は日本大学医学部動物実験委員会の承認を得て行い（承認番号：AP12M033）、動物の飼育・実験は日本大学医学部動物実験指針にしたがって施行した。

2 脱分化脂肪細胞（DFAT）調製方法

皮下脂肪 1～2g をコラゲナーゼ処理し、低速度遠心分離することで単離される成熟脂肪細胞を 20% ウシ胎児血清 (FBS) 含有 Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM) 培地で満たしたフラスコ内で天井培養を行う。成熟脂肪細胞はフラスコ天井面で脱分化し DFAT が産生される。1 週間後にフラスコを反転させ付着培養を行うことにより脱分化脂肪細胞 DFAT を増殖させることができる (図 1)。

3 SC-DFAT, ASC, BM-DFAT, BM-MSc の調製法

日本大学医学部附属板橋病院にて人工膝関節置換術を受ける 63 歳女性の患者より事前の同意を得た上で、手術時に切除され破棄される予定の大腿骨と皮下脂肪組織の提供を受けた。なお、日本大学臨床研究審査委員会の承認を得て実施している（承認番号 RK-121012-3）。

SC-DFAT は既報に従い⁷⁾、皮下脂肪組織をコラゲナーゼ処理後、遠心分離し、浮遊分画より単離した成熟脂肪細胞を、20% FBS 含有 DMEM 培地で満たされたフラスコにて天井培養を行うことにより調製した。DFAT 調製方法の概略を図 1 に示す。

ASC は既報に従い⁹⁾、コラゲナーゼ処理した脂肪組織を遠心分離し得られた沈降分画を 20% FBS 含有 DMEM 培地にて付着培養を行い調製した。

BM-DFAT は大腿骨よりシリンジにて骨髓液を採取し、遠心分離後、浮遊分画から単離した成熟脂肪細胞を天井培養することにより調製した。

BM-MSC は既報に従い¹⁾、骨髓液を遠心分離後、沈降分画を付着培養し調製した。それぞれの細胞は 3 日ごとに培地交換を行い、80% コンフルエントに到達後トリプシン・EDTA を用いて継代した。それぞれの細胞は第 2 継代 (P2) で実験に用いた。SC-DFAT, ASC, BM-DFAT, BM-MSC の調整法の概略を図 2 に示す。

4 In vitro における骨分化能の評価

骨分化誘導実験は既報の方法を用いた⁷⁾。骨分化誘導実験は 30 mm ディッシュ (BD Falcon) に BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC を 5×10^4 個播種し、コンフルエントになるまで 10% FBS 含有 DMEM で培養した後 (第 1 継代)、10% FBS, 100nM デキサメサゾン (Sigma-Aldrich), 10mM β -グリセロリン酸 (Sigma-Aldrich), 0.05mM L-アスコルビン (Sigma-Aldrich) 含有 DMEM にて 3 週間培養した。培養液の交換は 3 日毎に行った。細胞を 4% パラホ

ルムアルデヒドで固定後、1% Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) を室温にて 3 分作用させ、カルシウムの沈着を顕微鏡 (BX51 OLYMPUS) で観察した。

5 大腿骨骨折モデル作成法

骨折モデルの作成は、Bonnarens らによって報告された実験的骨折モデルの作成法に準じて行った¹⁹⁾。実験には 8 週齢雄の免疫不全 (SCID) マウスを使用した。イソフルランによる吸入麻酔下に、マウスの左後肢を剃毛し、大腿部にキシロカインを局所注射し皮膚を切開した。筋を繊維方向に損傷しないように分け、大腿骨を露出させ、大腿骨遠位より 25G 注射針 (TERUMO) を大腿骨の髓腔内に刺入し、一旦引き抜いた後、膝関節より近位 10 mm の部位で、マイクロボーンソー (Zimmer) を使用して、大腿骨横骨折を作成した。ペプチドハイドロゲル (PHG) Pura Matrix™ (3-D Matrix) 50 μ l を骨折間隙に局所注射した。PHG は標準アミノ酸と 99% の水から構成され、生体内に入ることによってペプチドが自己重合し、三次元ハイドロゲルを形成し、ここに移植細胞が保持される効果が示されており、スキャフォールドとして実験に使用した。なお PHG はマニュアルに従って調整した。骨折部を整復し 25G 注射針を再び髓腔内に刺入し髓内釘固定した。固定力を上げるために大腿骨近位の皮質まで固定した。針を大腿骨遠位で切断しマウスの動きに影響しないようにした。筋膜、皮膚を 6-0 ナイロン糸にて縫合した。

6 頭のマウスに対し骨折モデル作成後 4、6、8 週間後に各 2

頭ずつペントバルビタール 100 ml/kg 投与により安楽死させた後、両側大腿骨を摘出した。注射針を抜去後、実験動物用 Micro CT, R-mCT (Rigaku)を用いて 90 kV, 100 μ A の条件で撮影し、骨折治癒過程を X 線学的に評価した。

同骨折モデルにおける 2 週、3 週後では骨癒合が得られず、CT による骨構造解析が不可能であり²⁰⁾、このため 4 週以降で実験を行った。実験プロトコールの概略を図 3 に示す。

6 細胞移植実験

マウス骨折モデル骨折部位の経時的形態変化実験結果をもとに 4 週が最も仮骨形成される時期であり、また 2 週、3 週では骨癒合が得られないことを踏まえ²⁰⁾、移植 4 週にて評価時期とした。

8 週齢雄の SCID マウスを BM-DFAT 群, SC-DFAT 群, BM-MSC 群, ASC 群, Control 群の 5 群に分け、左大腿骨に上記の方法を用いて骨折モデルを作成した (各群 n=10)。BM-DFAT 群, SC-DFAT 群, BM-MSC 群, ASC 群はそれぞれ BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC 1×10^5 個と PHG 50 μ l を混和し、直ちに骨折間隙に注入した。Control 群は PHG 50 μ l のみを骨折間隙に注入した。モデル作成 4 週間後にペントバルビタール 100 ml/kg 投与により安楽死させた後、両側大腿骨を摘出した。注射針を抜去後、実験動物用 Micro CT で撮影し、骨折治癒過程における細胞移植の効果を X 線学的に評価した。実験プロトコールの概略を図 4 に示す。骨折モデル作成時点で完全な横骨折とならず、斜骨折に

なってしまった個体は実験結果から除外した。

7 骨構造解析法

Micro CT 画像は画像解析ソフトウェア i-viewR (MORITA) を使用し骨構造解析を行った。左大腿骨の骨折作成部を中心とした $4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$ のエリア内における大腿骨の骨量 (Bone Volume: BV) および骨密度 (Bone Mineral Density: BMD) 測定を行った。また骨折部位に形成された仮骨量を定量評価するために、左大腿骨の骨折作成部を中心とした $4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$ のエリア内における BV から、右大腿骨の対側骨折部位に相当する正常骨組織 ($4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$) の BV の差 $BV(\text{左大腿骨量} - \text{右大腿骨量})$ ($BV(\text{Lt-Rt})$) を算出し、推定仮骨量とした²⁰⁾。評価法の概略を図 5 に示す。

8 統計学的解析

定量結果は、 $\text{mean} \pm \text{SE}$ で表した。5 群間の比較は、One-way analysis of variance (ANOVA) および Turkey-Kramer multiple comparison test により有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。統計解析は GraphPad Prism ソフトウェア (Ver5.0a) を用いて行った。

結果

1 ヒト BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSc, ASC の調製

皮下脂肪組織より単離した脂肪細胞に比べ骨髄より単離し

た脂肪細胞は脂肪滴が少なく小型を示していた（図 6）。天井培養の結果、13 日後にはほぼ同じ繊維芽細胞様の形態を示す DFAT のコロニー形成が観察された。骨髄および皮下脂肪のストローマ分画よりそれぞれ既報に従い BM-MSC と ASC を調製した。

BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC の各細胞はいずれも同様の細胞形態を呈し、8 代以上の継代培養が可能であった（図 7）。細胞増殖速度も各細胞間に明らかな差はなく細胞倍加時間は約 65 時間であった。

2 BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC の *in vitro* における骨分化能の比較

分化誘導 14 日目で BM-DAFT と BM-MSC において Alizarin Red S 染色陽性のカルシウム沈着が観察され、21 日後にはより増強する所見が認められた（図 8）。一方 SC-DFAT, ASC では 14 日目までには Alizarin Red S 陽性所見は認められなかった。21 日後には ASC で Alizarin Red S 陽性像が観察されたが BM-DFAT や BM-MSC に比べ明らかに弱かった。以上の結果より BM-DFAT, BM-MSC は SC-DFAT, ASC に比べ高い骨分化能を持つことが明らかになった。

3 マウス骨折モデル骨折部位の経時的形態変化

骨折作成後 4 週の時点で著明な仮骨形成と共に骨癒合が認められた（図 9）。骨折作成後 6 週、8 週では徐々に仮骨量が減少し、皮質骨が厚みを増し、元の骨皮質が吸収される変化が観察

された。

解析ソフトウェアにより定量した平均推定仮骨量は、骨折作成後 4 週、6 週、8 週でそれぞれ 121 mm^3 、 68 mm^3 、 49 mm^3 であり、4 週以後低下する傾向を示した。平均骨密度は 4 週、6 週、8 週でそれぞれ 785 g/cm^2 、 823 g/cm^2 、 837 g/cm^2 であり、4 週以後増加する傾向を示した (図 10)。

全例骨癒合していたこと、CT による皮質骨の肥厚、海綿骨の再建など骨構造の変化より、骨折後 4 週までに仮骨形成と骨癒合をきたし、その後、骨リモデリングが起こる骨折モデルが再現性よく作成されることが確認できた。また 8 週以降はリモデリングの進行と骨折治癒過程の終了が予測された。

4 マウス骨折モデルに対する DFAT 移植の効果

各群の典型的な Micro CT Coronal 像、Sagittal 像、Axial 像をそれぞれ図 10, 11, 12 に示す。BM-DFAT 群、SC-DFAT 群、BM-MSc 群、ASC 群、Control 群すべてのマウスで著明な仮骨形成と共に骨癒合が認められた。Coronal 像、Sagittal 像では Control 群に比べ BM-MSc 群で骨折部仮骨量が少ない傾向を認めた (図 10, 11)。Axial 像では Control 群に比較し BM-DFAT 群と BM-MSc 群では骨皮質が厚く、海綿骨も密になる傾向を認めた (図 12)。

解析ソフトウェアを用いて定量した骨折部の推定仮骨量 $BV(Lt-Rt)$ は BM-DFAT 群で $85.5 \pm 17.3 \text{ mm}^3$ 、SC-DFAT 群で $85.2 \pm 22.4 \text{ mm}^3$ 、BM-MSc 群で $72.8 \pm 22.0 \text{ mm}^3$ 、ASC 群で $92.5 \pm 17.9 \text{ mm}^3$ 、

Control 群で $96.4 \pm 11.5 \text{ mm}^3$ であった (図 13)。細胞移植群 (BM-DFAT 群, SC-DFAT 群, BM-MSC 群, ASC 群) は Control 群と比べて $BV(Lt-Rt)$ が低い傾向にあった。特に BM-MSC 群は Control 群に比べ有意に $BV(Lt-Rt)$ が低値を示した ($P > 0.05$)。

骨折部の BMD は BM-DFAT 群で $832 \pm 28 \text{ g/cm}^2$ 、SC-DFAT 群で $822 \pm 30 \text{ g/cm}^2$ 、BM-MSC 群で $825 \pm 30 \text{ g/cm}^2$ 、ASC 群で $805 \pm 27 \text{ g/cm}^2$ 、Control 群で $787 \pm 12 \text{ g/cm}^2$ であった (図 14)。細胞移植群 (BM-DFAT 群, SC-DFAT 群, BM-MSC 群, ASC 群) は Control 群と比べて BMD が高い傾向にあった。特に BM-MSC 群と BM-DFAT 群は Control 群に比べ有意に BMD が高値を示した ($P > 0.05$)。以上の結果とマウス骨折モデル骨折部位の経時的形態変化の結果、CT による骨皮質・海綿骨の変化を併せ、BM-MSC 群、BM-DFAT 群では Control 群に比べ骨折リモデリングが促進されたと考えられた。一方で SC-DFAT 群、ASC 群と Control 群間では有意差を認めなかった。

考察

以前より整形外科領域では骨癒合不全・偽関節、高齢者 (骨粗鬆症) の骨折が治療上、大きな問題であり、骨癒合を促進させる薬剤・機器・移植法などが研究されてきた。現在の移植法においては骨盤骨からの自家骨移植術が中心であるが、正常部位である骨盤部に切開し骨採取しなくてはならず、長期間に及ぶ痛みの継続や感染など、採骨による合併症も決して少なくない²¹⁾²²⁾。また同種間骨移植も徐々に行われているが、移植骨骨

髄中の細胞は死滅しており架橋構造としてしか期待できず、またウイルス感染などの危険性も否定できない。そこで現在期待されているのが再生医療である。iPS細胞、ES細胞が特に脚光を浴びているが、倫理的問題、腫瘍化の可能性、宗教上の問題など問題点も多く、臨床応用という点では課題が多い。より利用しやすい細胞ソースとして体性幹細胞が注目されている。体性幹細胞は、腫瘍化を認めないことや倫理的な問題点が少ないことから臨床応用しやすく、特に BM-MSC, ASC は世界中で臨床試験が行われている。しかし BM-MSC は高齢者骨髄からの採取できる量が少ないこと、他細胞が混入しやすいことなど問題点も多く残っている。そこで本研究では、高齢者でも比較的簡便に採取でき、より均質な多能性細胞である DFAT に注目し、BM-MSC, ASC と骨再生能を比較検討した。また局在の異なる脂肪組織から調製した DFAT は分化指向性が異なり、骨再生能にも差異があるという仮説を立て、皮下脂肪に由来する SC-DFAT と骨髄脂肪に由来する BM-DFAT の比較検討も同時に行った。細胞種による機能比較を行う場合、同一ドナーから同一の条件で調製した細胞を用いることが望まれる。今回、人工膝関節置換術を受ける患者から皮下脂肪組織と大腿骨の骨髄組織を同時に採取し、同一患者に由来する BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC を共通の培養液（20%FBS 含有 DMEM）を用いて調製した。この方法により、これらの細胞の正確な機能比較が可能となると思われた。ヒト同一個体から4種類の MSC 様細胞を調製して機能比較した研究は今までに報告がなく、新規性が高い研究である

といえる。まず BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC の *in vitro* における骨分化能を検討した。その結果、骨髄に由来する BM-MSC と BM-DFAT は、皮下脂肪に由来する ASC, SC-DFAT に比べ骨分化能が高いことが示された。BM-MSC は ASC に比べ骨分化能が高いことはすでに報告があり²³⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾、この結果は以前の報告を支持するものであった。一方、DFAT の中でも骨分化能に差異があるということは、今回初めて明らかになった所見である。脂肪細胞はその局在部位により起源が異なることが知られている。骨髄脂肪細胞は皮下脂肪細胞より骨分化指向性が高い骨芽細胞に近い形質を持った細胞に起源している可能性が示唆された。また既報の文献では SC-DFAT は骨分化誘導されるが⁷⁾、今回の結果では骨分化誘導されなかった。誘導時間を延長する、または誘導条件を調節することで骨分化誘導される可能性が考えられた。

次に *in vivo* でも同様の結果が出るかを検討するために、免疫不全マウスに大腿骨骨折モデルを作成し、PHG と共に BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC を移植することにより、その骨再生能を比較検討した。今回、スキャフォールドとして用いた PHG は、生理的環境下で体内に存在する無機塩と接触することで早急に液体から三次元ゲル構造へと変化する性質を持つことから、骨折隙間に移植細胞を保持するのに有効であった。Hamada らは PHG が MSC を移植部位に長期間生着させ、骨芽細胞へ分化させることを報告している²⁷⁾。また PHG 単独でも骨折部位に注入することで骨折癒合を促進することが報告されている²⁸⁾。今回の

検討では、PHGのみを骨折部に移植したコントロール群では4週後までに全例で骨癒合が起こり、この時点で仮骨形成が最大となり、その後徐々に仮骨量が減少し、皮質骨が厚みを増していく変化が観察された。また骨密度も4週以後徐々に増加を認めた。この結果は、骨折4週の時点で骨折治癒過程における修復期から骨リモデリング期に移行したことを示唆している。細胞移植群との比較において、BM-DFAT群およびBM-MSC群では、Control群に比べ有意に骨折部の骨密度が高く、推定仮骨量はBM-MSC群で有意に低く、BM-DFAT群では低くなる傾向は認めたが有意差は出なかった。この結果は、BM-DFATまたはBM-MSCを骨折部に移植することにより、骨リモデリングが促進することを意味している。In vitroの実験と同様に、BM-DFAT、BM-MSCは優れた骨再生能を有することが示唆された。BM-MSCによる骨再生効果および骨癒合促進効果はin vitroおよびin vivoの実験で明らかとなっており²⁾³⁾²⁹⁾、現在複数の臨床研究が進行している。一方BM-DFATがBM-MSCに類似した骨再生能を持つことは、今回初めて明らかになった所見である。これはBM-MSCに比べBM-DFATは少量の骨髄液で採取可能であることを考えると大きな利点と言える。また今回BM-DFAT群における推定仮骨量でControl群との有意差が得られなかった。SC-DFAT群やASC群において骨折部の骨密度が高く、推定仮骨量が低くなる傾向を認めたが、Control群との間に有意差は認められなかった。既報では、SC-DFAT、ASC共にin vitroおよびin vivoにおいて骨再生能や骨密度増加作用を示すことが報告されている

4)¹⁸⁾30)。今回、SC-DFAT および ASC にて明らかな骨再生効果が認められず、また BM-DFAT で推定仮骨量において有意差が得られなかった理由として、①マウスにヒト由来細胞を移植しているため、同種間移植に比較して細胞が生着しにくく、骨芽細胞への分化能や骨再生効果が減弱した可能性。②PHG 自体にも骨折治癒促進作用があるため、PHG のみを注入した Control 群との差が明確にならなかった可能性などが考えられる。また移植する細胞数の増加や異なった骨折モデルを用いた方法などで、有意差が得られる可能性が考えられる。今後さらに骨強度試験など異なった評価法を用いることにより、これらの細胞の骨再生能の差異をより明確にしていく必要がある。

今回 BM-MSc, BM-DFAT 移植により骨折治癒が促進されたメカニズムとして、移植細胞が移植部位で骨芽細胞に分化し、直接的に骨形成に寄与した可能性と、BM-DFAT から分泌されたサイトカインがパラクライン的に周囲組織に作用し、骨折治癒を促進した可能性などが考えられる。Kikuta らは、SC-DFAT, ASC, BM-DFAT から glycoprotein 130 シグナルサイトカインである Oncostatin M, Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Interleukin-6 や Receptor Activator of Nuclear Factor (RANKL) のデコイレセプターである osteoprotegerin が豊富に分泌されることを報告している¹⁸⁾。これらのサイトカインは骨芽細胞や破骨細胞に作用し、骨形成や骨リモデリングを促進することが知られている。このような液性因子を介した骨芽細胞や破骨細胞に対する間接作用も、骨折治癒促進作用に寄与して

いることが考えられる。SC-DFAT, ASC からもサイトカインは放出されているが、結果としては有意差を認めなかった。これは放出されるサイトカイン量が移植細胞の採取部位による違いがある可能性が考えられ、今後サイトカインにおいても検討が必要と思われた。

高齢者や骨粗鬆症患者では BM-MSC の細胞数が減少している一方で骨髄中の脂肪細胞は増加していることが知られている。このため、高齢者や骨粗鬆症患者では、BM-MSC の調製は困難である場合があるが、BM-DFAT は容易に調製が可能であることが予想される。このような患者における BM-DFAT と BM-MSC の調製の容易さや効率の比較は今後の検討課題である。以上の結果より、BM-DFAT は BM-MSC と類似した骨再生能を有することが明らかになった。骨粗鬆症に伴う難治性骨折などに対する細胞治療を考えた場合、その細胞ソースとして BM-DFAT は有望であると思われる。

まとめ

同一ヒト由来 BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC を免疫不全マウス大腿骨骨折モデルの骨折部に移植し、骨折部の仮骨量・骨密度を比較検討した。BM-DFAT 群は BM-MSC 群と同様に骨密度が上昇することが示され、リモデリングが早まり骨癒合を促進させることが示唆された。BM-DFAT は骨折治癒促進を目的とする細胞治療の細胞ソースとして有用である可能性が示された。

謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った日本大学医学部整形外科学講座 徳橋泰明教授に心より厚く御礼申し上げるとともに、また研究に際し適切な御指導を頂いた日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 松本太郎教授、スタッフの方々、日本大学歯学部解剖学教室 本田雅規教授、日本大学歯学部 新井嘉則特任教授に心より深謝いたします。

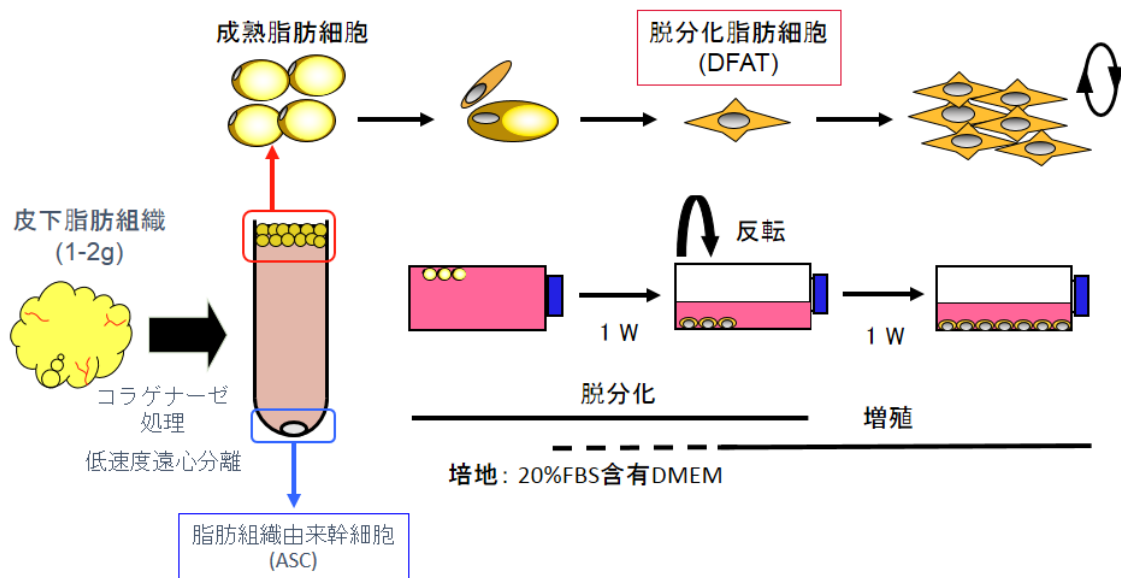


図 1. 脱分化脂肪細胞 (DFAT) 調製方法

皮下脂肪組織 1～2g をコラーゲナーゼ処理し、低速度遠心分離することで単離される成熟脂肪細胞を培地で満たしたフラスコ内で天井培養を行う。成熟脂肪細胞はフラスコ天井面で脱分化する。これが DFAT であり、1 週間後にフラスコを反転させ付着培養を行うことにより DFAT を増殖させることができる。

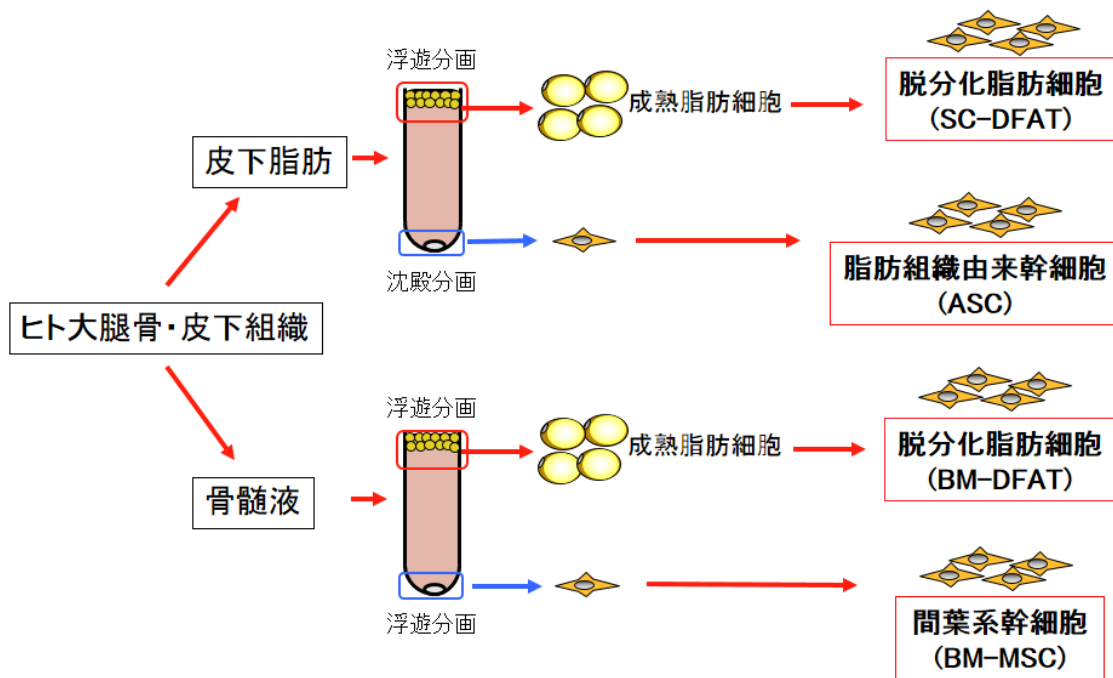


図 2. 皮下脂肪由来 DFAT (SC-DFAT)、脂肪組織由来幹細胞 (ASC)、骨髄脂肪由来 DFAT (BM-DFAT)、骨髄間葉系幹細胞 (BM-MSC) の調製法

皮下脂肪組織はコラゲナーゼ処理後、遠心分離し、浮遊分画より成熟脂肪細胞を採取し天井培養を行い SC-DFAT を調製した。また沈殿分画を採取し付着培養を行い、ASC を調製した。

大腿骨骨髄液から遠心分離後の浮遊分画から成熟脂肪細胞を採取し、天井培養にて BM-DFAT を調製、また沈殿分画を付着培養し BM-MSC を調製した。

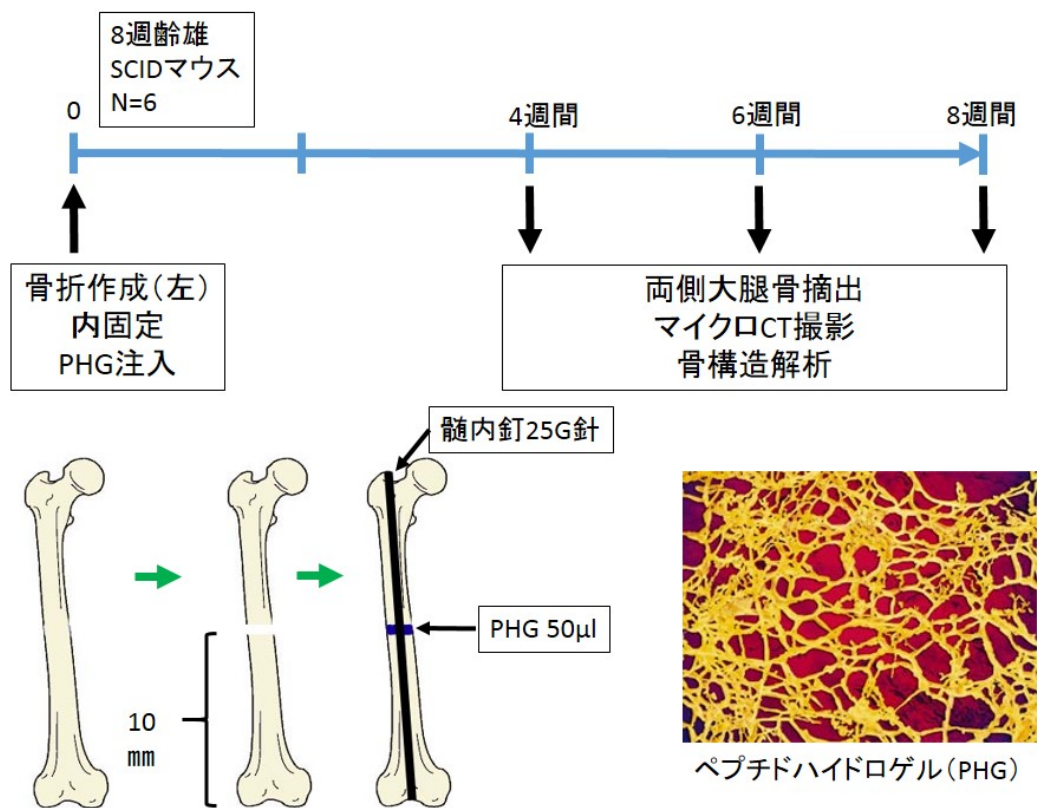


図 3. 免疫不全マウス大腿骨骨折モデル作成法

8週齢雄の免疫不全(SCID)マウスの膝関節より近位10 mmの部位で大腿骨横骨折を作成した。ペプチドハイドロゲル(PHG) Pura Matrix™ 50 μ lを骨折部に局所注射した。骨折部を整復後、25G注射針を髓腔内に刺入し髓内釘固定した。

骨折作成4週、6週、8週後に両側大腿骨を摘出し、Micro CT撮影を行い、骨構造解析を行った。

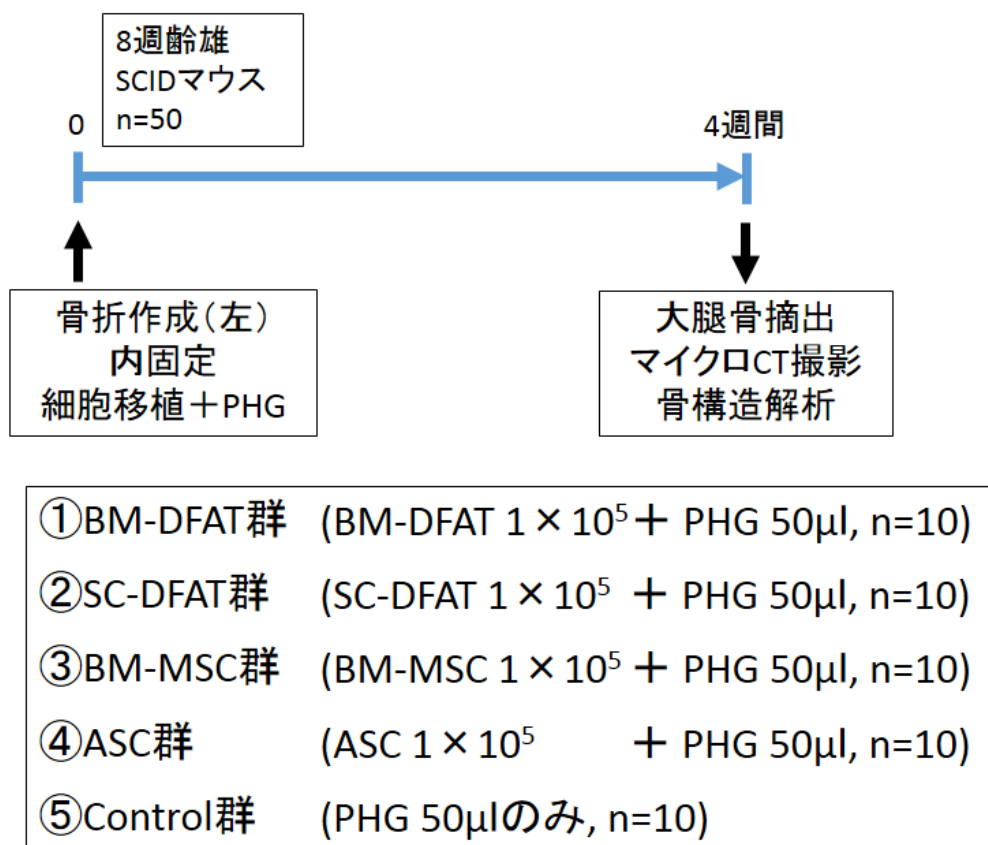


図 4. 細胞移植実験プロトコール

8週齢雄のSCIDマウスをBM-DFAT群、SC-DFAT群、BM-MSC群、ASC群、Control群の5群に分け、左大腿骨に横骨折を作成した。各群移植細胞 1×10^5 個とPHG $50 \mu\text{l}$ を混和し、直ちに骨折部に注入した。

移植4週間後に両側大腿骨を摘出し、Micro CT撮影を行い、骨構造解析を行った。

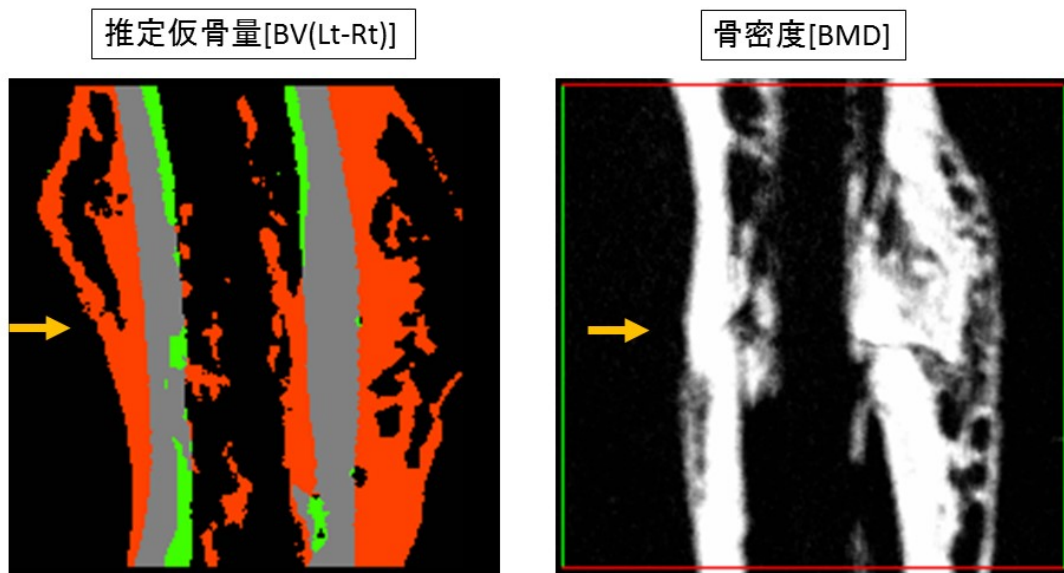


図 5. 骨折治癒評価法

Micro CT 画像による骨構造解析として大腿骨骨折部位の推定仮骨量および骨密度の測定を行った。

左大腿骨の骨折作成部を中心とした $4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$ のエリア内における BV(赤色 + グレー) から左大腿骨の対側骨折部位に相当する正常骨組織 $4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$ の BV(緑 + グレー) の差 BV(Lt-Rt) を算出し、推定仮骨量とした。また骨折作成部位を中心とした $4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$ のエリア内における骨密度 (BMD) を、解析ソフトウェアを使用して定量した。図の矢印は骨折部を示す。

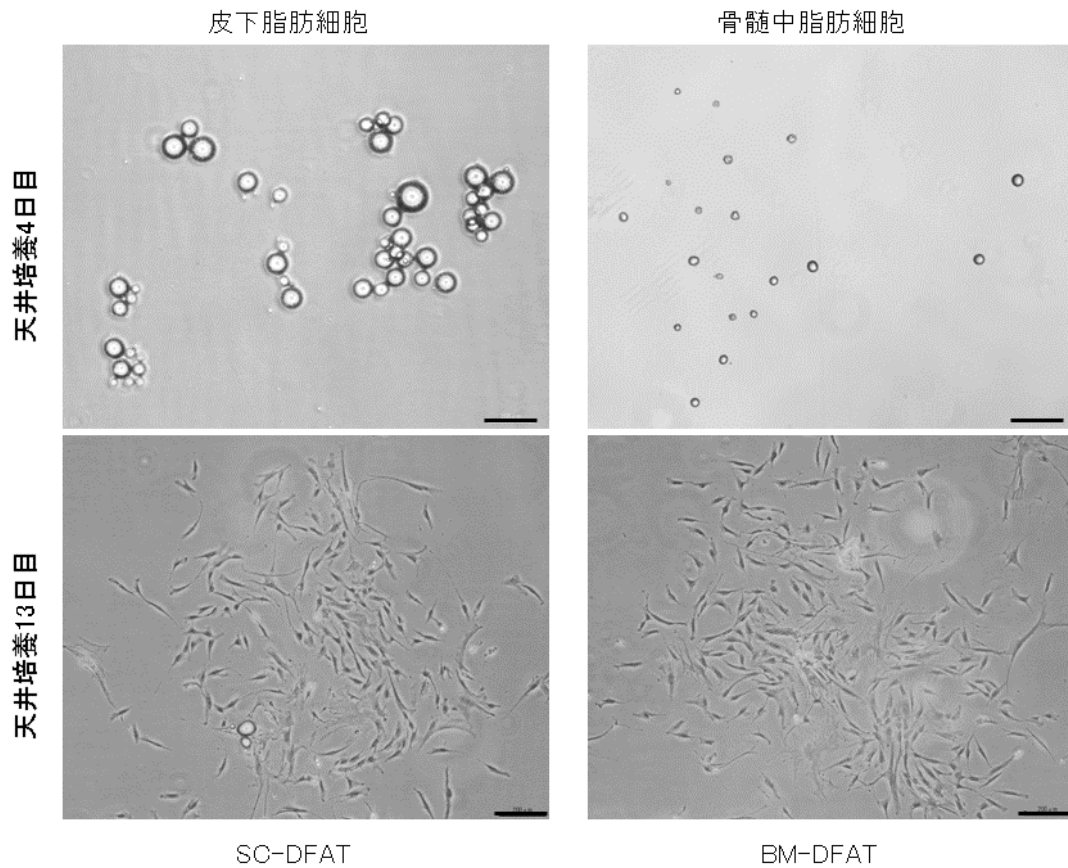


図 6. 天井培養による成熟脂肪細胞の形態変化

同一ドナーに由来する皮下脂肪と骨髓脂肪から成熟脂肪細胞を単離し、天井培養を行った。皮下脂肪組織より単離した脂肪細胞に比べ骨髓より単離した脂肪細胞は脂肪滴が少なく小型を示した。天井培養 13 日目にはほぼ同じ形態を示す DFAT のコロニーが形成された。(scale bar : 200 μ m)

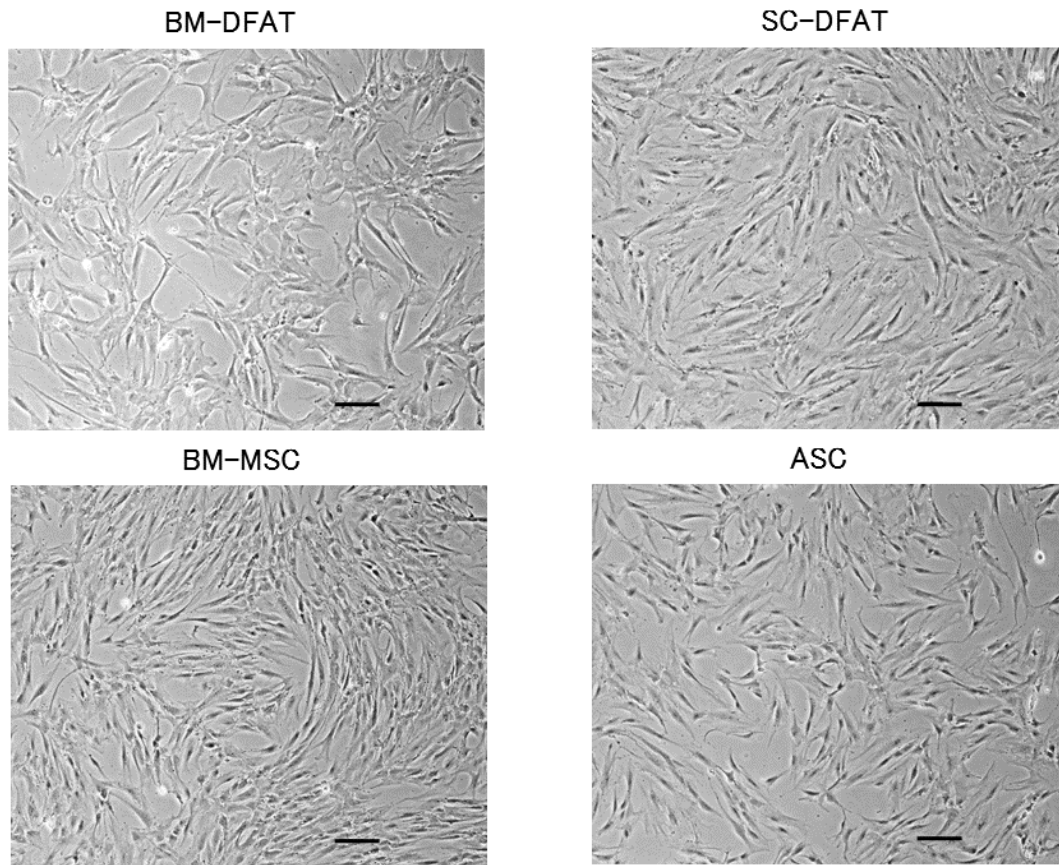


図 7. BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC の細胞形態

同一ヒト由来 BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC を付着培養させ 14 日目の写真。いずれの細胞も同様な増殖過程を認めた。同一ドナーに由来するヒト BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC を調製し、継代培養を行った。写真は第 2 継代の各細胞の形態を示す。(scale bar : 200 μ m)

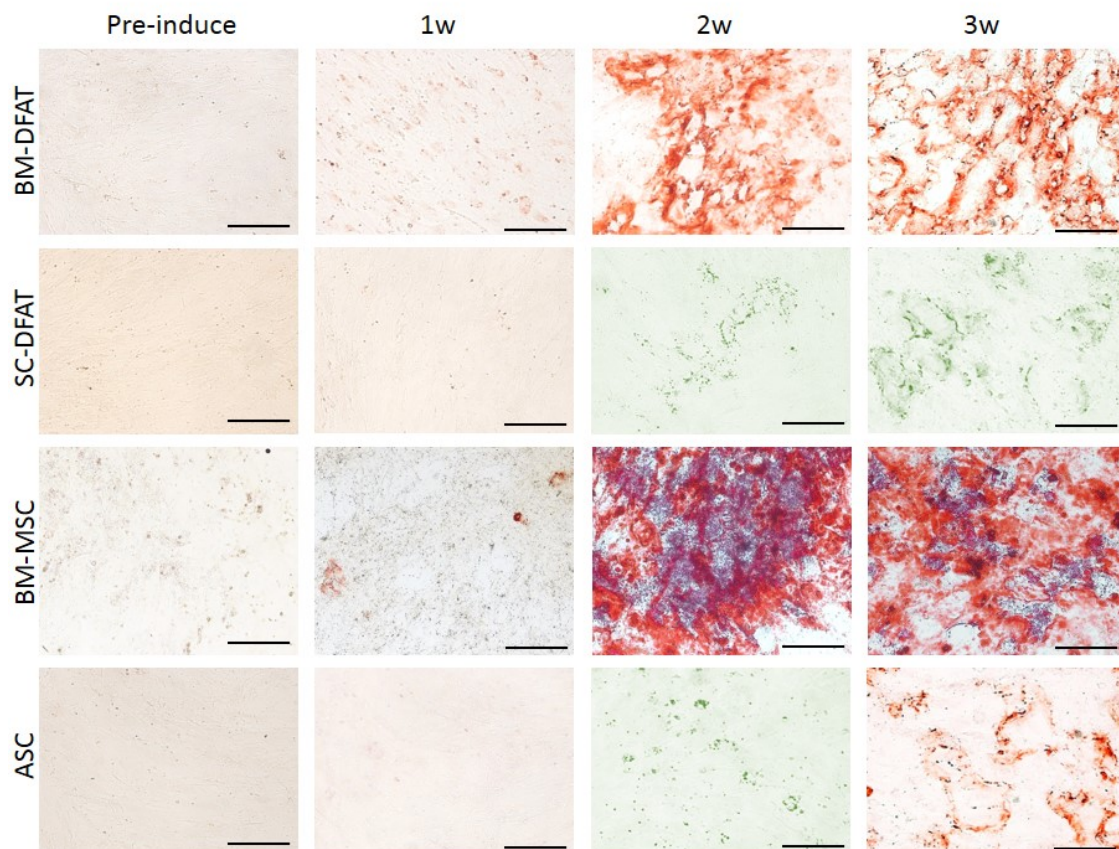


図 8. BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC の *in vitro* における骨分化能の比較 (Alizarin Red S 染色)

BM-DFAT, SC-DFAT, BM-MSC, ASC (第 1 継代) を骨分化誘導した。培養 7 日目で BM-DFAT と BM-MSC で Alizarin Red S 染色された。14 日目以降では BM-DFAT, BM-MSC で強く Alizarin Red S 染色された。21 日目で ASC も染色された。

(scale bar : 100 μ m)

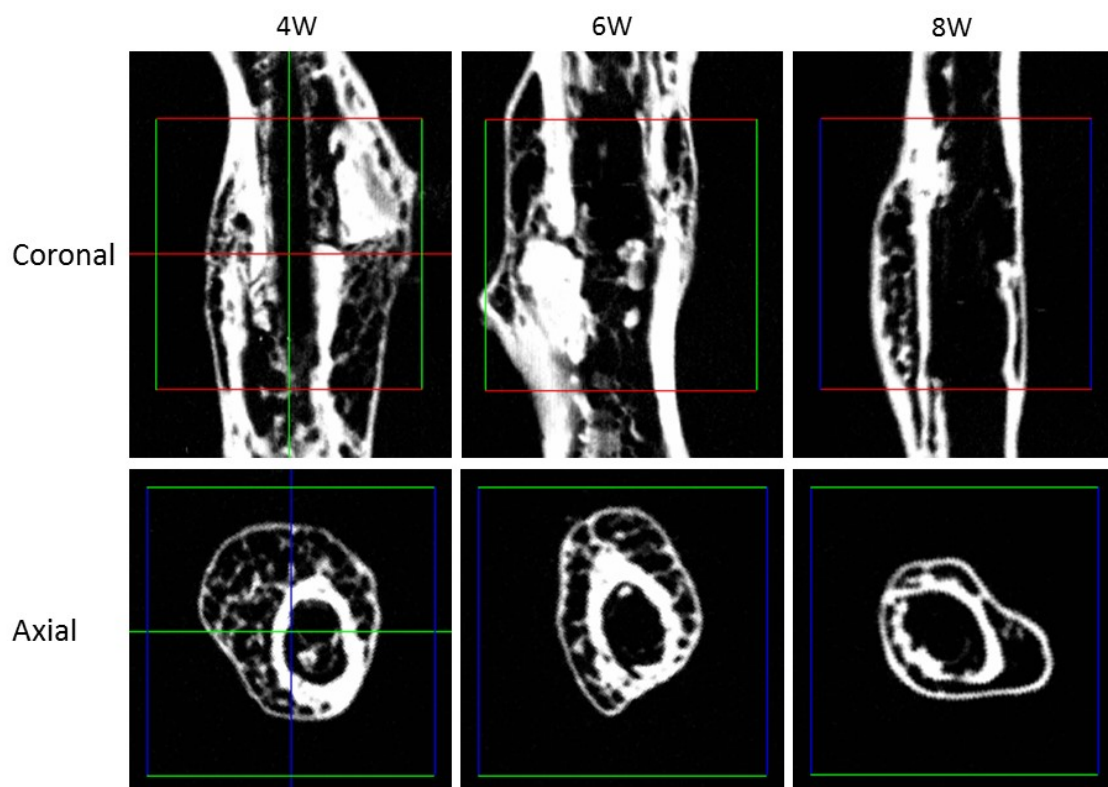


図 9. マウス骨折モデル骨折部位の経時的形態変化

SCID マウス骨折モデルを作成し、4 週、6 週、8 週後の Micro CT における Coronal 像と Axial 像を示す。モデル作成 4 週でしっかりと仮骨形成され、6 週、8 週では徐々に仮骨量が減少し、皮質骨が厚みを増しており、元の皮質骨が吸収されていく変化が観察された。

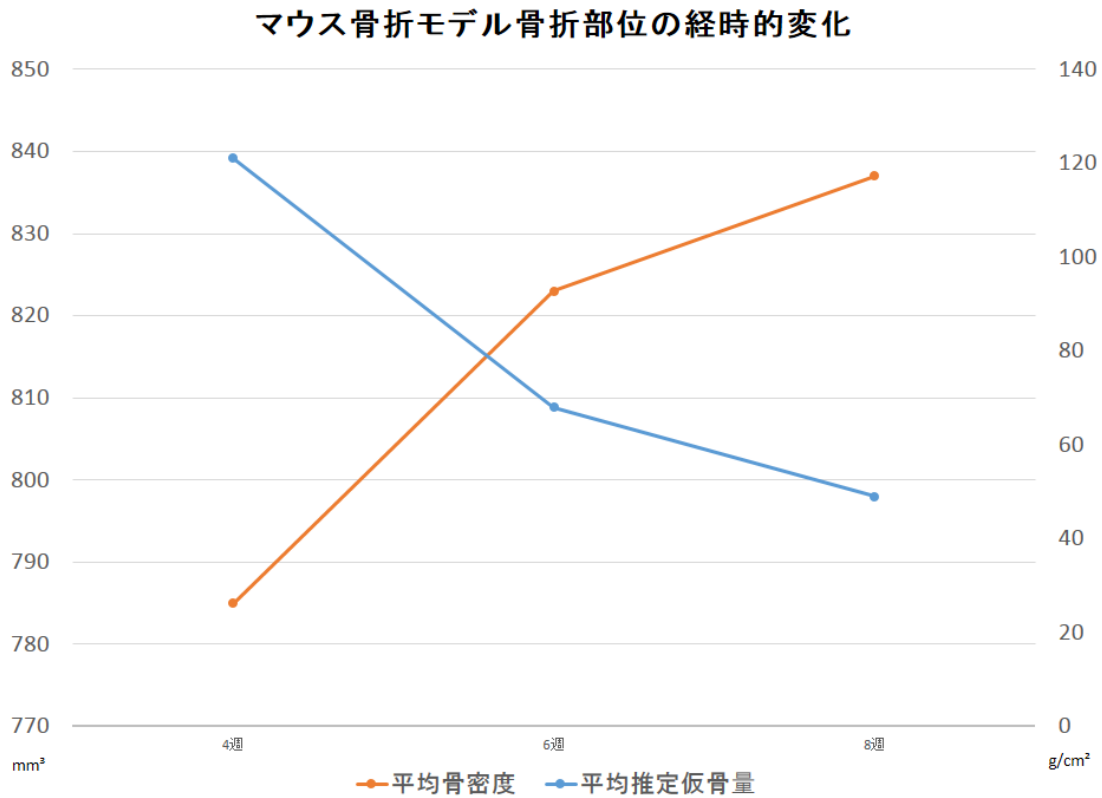


図 10. マウス骨折モデル骨折部位の経時的な骨密度・推定仮骨量変化

SCID マウス骨折モデルを作成し、4 週、6 週、8 週後の Micro CT でのソフトウェア解析による平均骨密度・平均推定仮骨量のグラフ。骨密度は 4 週から 8 週にかけて上昇傾向を認め、推定仮骨量は経時的に低下を認めた。

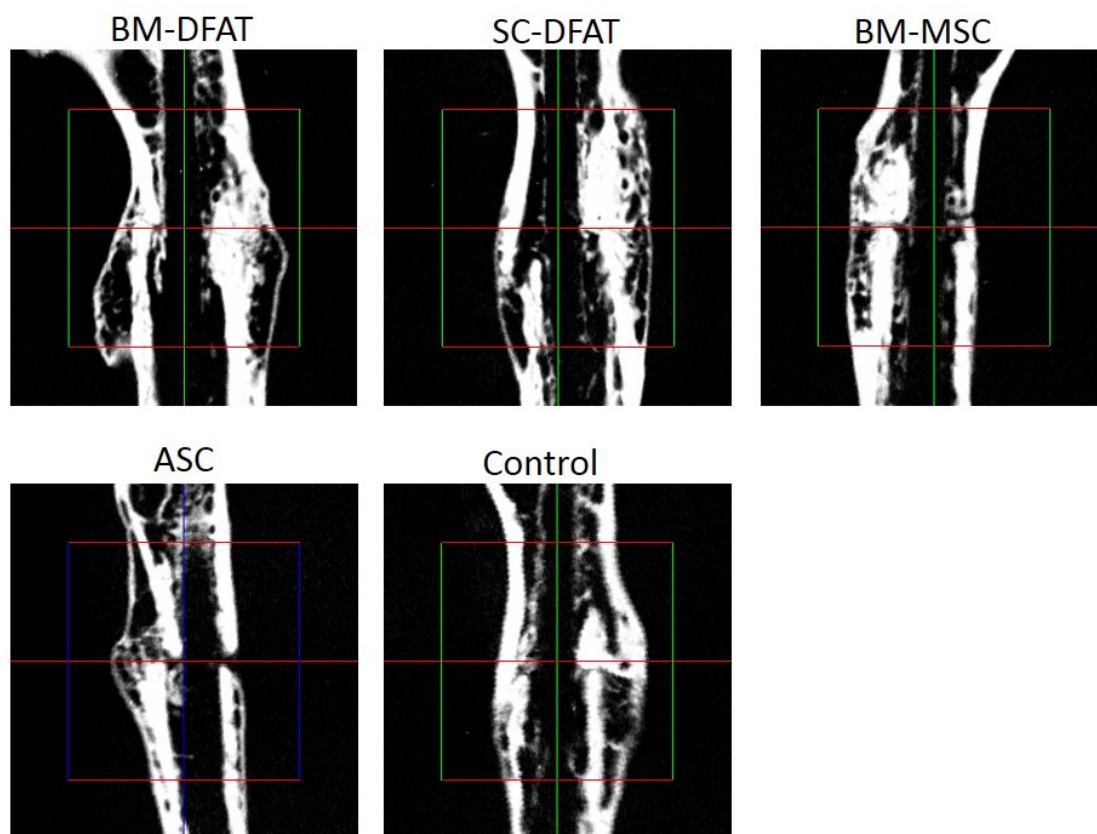


図 11. マウス骨折モデルに対する各種細胞移植の効果 (Coronal 像)

Micro CT を用いて各群を X 線学的に比較検討した。移植 4 週後における各群の骨折作成部位 Micro CT 像 (Coronal 像) を示す推定仮骨量 $BV(Lt-Rt)$ を測定し、各群の中央値に最も近いものを典型例として提示した。

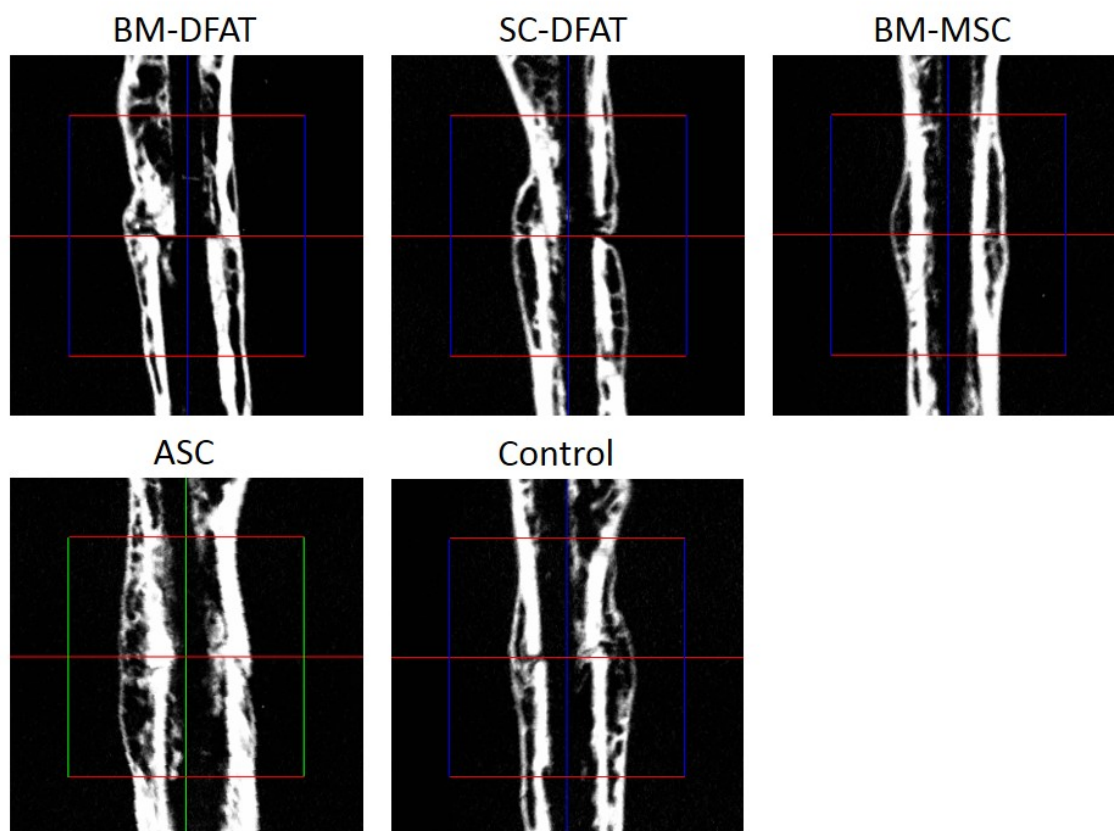


図 12. マウス骨折モデルに対する各種細胞移植の効果 (Sagittal 像)

移植 4 週後における各群の骨折作成部位 Micro CT 像 (Sagittal 像) を示す、図は推定仮骨量 BV(Lt-Rt) を測定し各群の中央値に最も近いものを典型例として提示した。

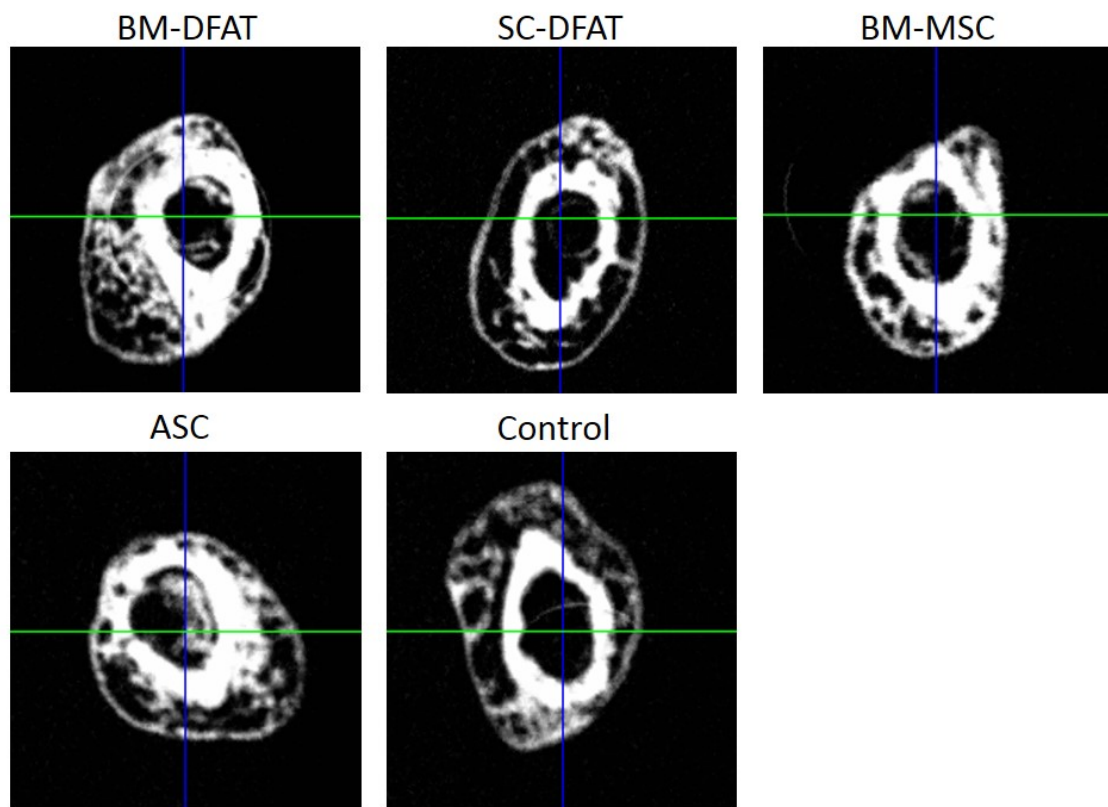


図 13. マウス骨折モデルに対する各種細胞移植の効果 (Axial 像)

移植 4 週後における各群の骨折作成部位 Micro CT 像 (Axial 像) を示す、図は推定仮骨量 BV (Lt-Rt) を測定し各群の中央値に最も近いものを典型例として提示した。

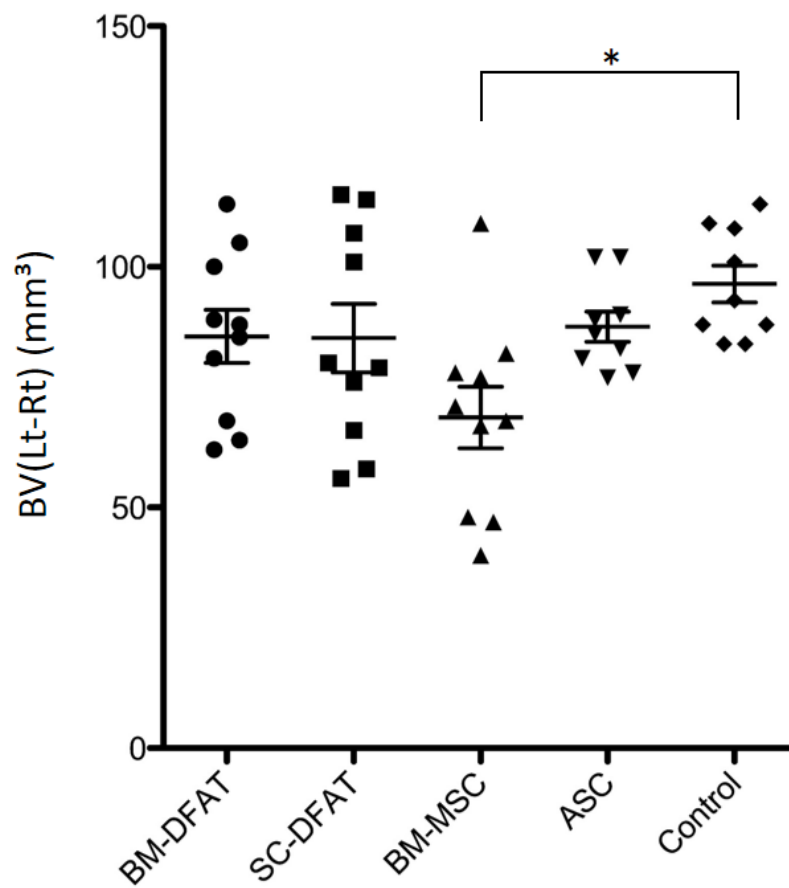


図 14. 各群における大腿骨の推定仮骨量 [BV(Lt-Rt)] 変化

BV(Lt-Rt)は Control 群に比べ細胞移植群で低い傾向にあった。BM-MSC 群は Control 群に比べ有意に BV(Lt-Rt)が低値を示した。BM-DFAT 群と SC-DFAT 群は Control 群と比べ有意差を認めなかった。

Bar: Mean ± SE, *: p < 0.05 One-way ANOVA, Tukey's Multiple comparison test.

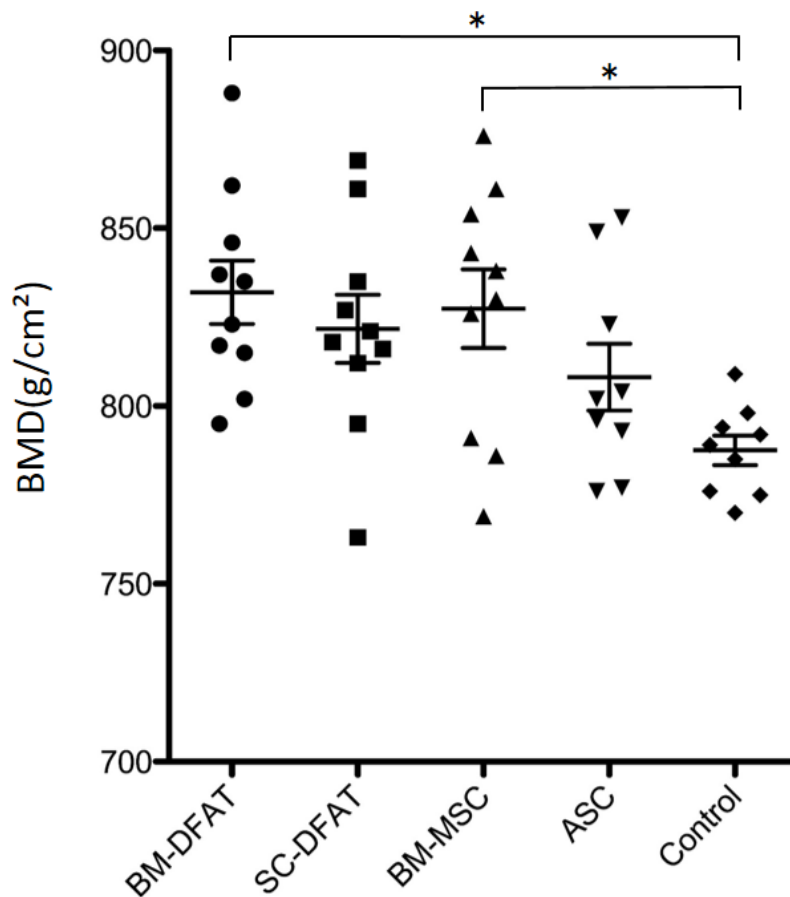


図 15. 各群における大腿骨の骨密度 (BMD) 変化

BMD は Control 群に比べ細胞移植群で高い傾向を示した。BM-DFAT 群と BM-MSC 群は Control 群に比べ有意に BMD が高値を示したが、SC-DFAT 群は Control 群と比べ有意差を認めなかった。Bar: Mean \pm SE, *: $p < 0.05$ One-way ANOVA, Tukey's Multiple comparison test.

引用文献

- 1) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**:143-147.
- 2) Kumar S, Ponnazhagan S. Mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells in vivo augments bone healing in a mouse model of segmental bone defect. *Bone* 2012; **50**:1012-1018.
- 3) Qi Y, Zhao T, Yan W *et al.* Mesenchymal stem cell sheet transplantation combined with locally released simvastatin enhances bone formation in a rat tibia osteotomy model. *Cytotherapy* 2013; **15**:44-56.
- 4) Cowan CM, Shi YY, Aalami OO *et al.* Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004; **22**:560-567.
- 5) Giannotti S, Bottai V, Ghilardi M *et al.* Treatment of pseudoarthrosis of the upper limb using expanded mesenchymal stem cells: a pilot study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; **17**:224-227.
- 6) Pak J. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. *Journal of medical case reports* 2011; **5**:296.

- 7) Matsumoto T, Kano K, Kondo D *et al.* Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**:210-222.
- 8) Hayashi T, Misawa H, Nakahara H *et al.* Transplantation of osteogenically differentiated mouse iPS cells for bone repair. *Cell Transplant* 2012; **21**:591-600.
- 9) Zuk PA, Zhu M, Ashjian P *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; **13**:4279-4295.
- 10) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; **7**:211-228.
- 11) Kang BJ, Ryu HH, Park SS *et al.* Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *Journal of veterinary science* 2012; **13**:299-310.
- 12) Izadpanah R, Trygg C, Patel B *et al.* Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2006; **99**:1285-1297.
- 13) Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A *et al.* Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived

- versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem cells and development* 2012; **21**:2724-2752.
- 14) Streckbein P, Jackel S, Malik CY *et al.* Reconstruction of critical-size mandibular defects in immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. *J Craniomaxillofac Surg* 2013; **41**:496-503.
- 15) McIntosh K, Zvonic S, Garrett S *et al.* The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 2006; **24**:1246-1253.
- 16) Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 2005; **13**:845-853.
- 17) Shafiee A, Seyedjafari E, Soleimani M *et al.* A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnology letters* 2011; **33**:1257-1264.
- 18) Kikuta S, Tanaka N, Kazama T *et al.* Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced

- osteoporosis. *Tissue Engineering Part A* 2013; **19**:1792-1802.
- 19) Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 1984; **2**:97-101.
- 20) 山田 知裕. マウス大腿骨骨折モデルにおける脱分化脂肪細胞 (DFAT) の骨形成促進効果の検討. 日本大学大学院医学研究科博士課程. 2013; 20-22.
- 21) Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989; **3**:192-195.
- 22) Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine (Phila Pa 1976)* 1995; **20**:1055-1060.
- 23) Park SH, Sim WY, Min BH *et al.* Chip-based comparison of the osteogenesis of human bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells under mechanical stimulation. *PLoS one* 2012; **7**:e46689.
- 24) Vishnubalaji R, Al-Nbaheen M, Kadalmani B *et al.* Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. *Cell Tissue Res* 2012; **347**:419-427.
- 25) Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS *et al.* Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared

- with perinatal and adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2009; **27**:126-137.
- 26) Hayashi O, Katsube Y, Hirose M *et al.* Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int* 2008; **82**:238-247.
- 27) Hamada K, Hirose M, Yamashita T *et al.* Spatial distribution of mineralized bone matrix produced by marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide hydrogel scaffold. *Journal of biomedical materials research Part A* 2008; **84**:128-136.
- 28) Bokhari MA, Akay G, Zhang S *et al.* The enhancement of osteoblast growth and differentiation in vitro on a peptide hydrogel-polyHIPE polymer hybrid material. *Biomaterials* 2005; **26**:5198-5208.
- 29) Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS *et al.* Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 1998:S247-256.
- 30) Liao HT, Chen CT. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World journal of stem cells* 2014; **6**:288-295.

研究業績目録

澤田 浩克

I	発表	① 一般発表	7	
		② 特別発表	なし	
II	論文	① 原著論文	2 (共	2)
		② 症例報告	1 (単	1)
		③ 総説	1 (単	1)
III	著書		なし	
	以上			

I 発表

① 一般発表

1. 澤田浩克，龍順之助，齊藤修，石井隆雄，西郷嘉一郎，榮春人，龍啓之助，鈴木元．THA 後骨盤に insufficiency fracture を呈した 4 例．関東整形災害外科学会 例会．東京，2008 年 4 月
2. 植松義直，徳橋泰明，大幸俊三，清水一郎，小川剛史，大幸英至，根本菜穂，澤田浩克，龍順之助．頸椎椎弓形成術後 C5 髄節麻痺の発生原因と術中予防効果．第 49 回関東整形外科学会．東京，2009 年 3 月
3. 澤田浩克，松崎英剛，立川裕一郎，大瀧宗典，後藤英聖，糸川牧夫．Os odontoideum の 2 例．第 497 回日本大学医学会．東京．2010 年 5 月
4. 長谷川太志，植松義直，網代泰充，長尾聡哉，豊泉泰洋，澤田浩克，宮方啓行，長岡正宏．妊娠後骨粗鬆症の 1 例．関東整形災害外科学会月例会第 665 回整形外科集団会東京地方会．東京．2012 年 11 月
5. 三嶋信太郎，間世田優文，上井浩，大島正史，永井悠，小島敏雄，澤田浩克，宮方啓行，矢作善之，徳橋泰明．腰椎に発生した MTX 関連リンパ増殖性疾患 (MTX-LPD) の 1 例．関東整形災害外科学会月例会第 669 回整形外科集団会東京地方会．東京．2013 年 9 月
6. 澤田浩克，松本太郎，風間智彦，新井嘉則，徳橋泰明．マウス大腿骨骨折モデルに対するヒト脱分化脂肪細胞移

植の効果．第 13 回日本再生医療学会総会．京都．2014 年 3 月

7. 澤田浩克，風間智彦，新井嘉則，本田雅規，加野浩一郎，徳橋泰明，松本太郎．免疫不全マウス大腿骨骨折モデルにおけるヒト脱分化脂肪細胞の骨再生能効果検討．第 35 回日本炎症・再生医学会．沖縄．2014 年 7 月

② 特別発表 なし

II 論文

① 原著論文

1. 糸川牧夫，松崎英剛，立川裕一郎，大滝宗典，後藤英聖，澤田浩克．術後肺血栓塞栓症の予防に間歇的空気圧迫法と fondaparinux sodium を使用した股関節手術 120 例の検討．東日本整形災害外科学会雑誌．22, 2 ; 158-162、2010.
2. 矢作宏，久保村達也，澤田浩克，秋田護，萩原秀彦，萩原大士．大腿骨転子部骨折の手術体位と手技の工夫．骨折．34, 3、574-577、2012.

② 症例報告

1. 澤田浩克，斉藤修，石井隆雄，森聖，穂坂邦大，徳橋泰明．THA 後、骨盤に insufficiency fracture を呈した 4 例．東日本整形外科学会雑誌．23 ; 133-136、2011.

③ 総説

1. 澤田浩克，穂坂邦大，徳橋泰明．大腿骨顆部骨壊死．日大医学雑誌．69:335-337，2010.

III 著書 なし