

ラット脂肪組織由来幹細胞の脂肪・骨への分化

関西医科大学 形成外科学講座

覚道 奈津子・櫛田 哲史・鈴木 健司・楠本 健司

Differentiation of rat adipose-derived stem cells into fat and bone

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Kansai Medical University

Natsuko Kakudo, Satoshi Kushida, Kenji Suzuki, Kenji Kusumoto

【要旨】

脂肪組織中に骨髄間葉系幹細胞と同様の多分化能をもつ体性幹細胞が発見され、これは脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived Stem Cells : ASCs) と呼ばれている。脂肪組織は、形成外科手術の際の余剰組織として低侵襲で採取することは容易であり、ドナーサイトの変形・欠損や採取時の侵襲も非常に少なく行える。

今回我々は、ラット脂肪組織から分離したASCsを分離調整し、脂肪・骨への分化誘導を行った。特別染色により、各誘導へ分化可能であることが証明された。ASCsは脂肪・骨の再生医療において最も有用な細胞源のひとつとなる可能性がある。

【Abstract】

Recently, somatic stem cells with the same pluripotency as bone marrow mesenchymal stem cells were identified in aspirated adipose tissue. These somatic stem cells are called adipose-derived stem cells (ASCs). Adipose tissue is a potential alternative to bone marrow as a source of stem cells. Adipose tissue is easily and less invasively collected as excess tissue during surgery. Collection can be conducted with little donor-side deformity and damage. Here, we isolated and prepared ASCs from rat adipose tissue and differentiated them into fat and bone. Their differentiation potential was demonstrated by specific staining. Thus, ASCs are potentially useful as a source of stem cells to regenerate fat and bone.

Key words : 脂肪組織由来幹細胞、分化、脂肪、骨、再生医療

Adipose-derived stem cells, differentiation, fat, bone, regenerative medicine

【緒言】

近年、吸引された脂肪組織中に骨髄間葉系幹細胞と同様の多分化能をもつ体性幹細胞が発見された。これは脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived Stem Cells : ASCs) と呼ばれ、脂肪組織は骨髄に代替する幹細胞の供給源であると考えられている^{1) 2)}。脂肪組織は、形成外科手術の際の余剰組織として低侵襲で採取することは容易で、ドナーサイトの変形・欠損も非常に少なく行える。我々はこのASCsの臨

床応用を目指し、分離・分化誘導系の基礎的研究を行ってきた。ヒトへの使用の前臨床基礎研究のひとつとして、動物由来のASCsを分離調製し、同種移植実験でその安全性について検討を行うことは必要不可欠であるが、これまでにラットやマウスにおけるASCsの分離調製・分化に関して検討を行った国内報告はほとんど認められない。

今回我々は、ラット脂肪組織から分離したASCsを分離調整し、脂肪・骨への分化誘導を行った。特別染色により、

各誘導へ分化可能であることが証明された。ASCsの分離法と分化誘導実験における臨床的意義について、文献的考察を含め報告する。

【材料と方法】

実験動物

実験には、Wistar系雄ラット（6週令）6匹を清水実験材料より購入して用いた。本研究は、関西医科大学の動物実験指針に準じて行われた。

脂肪組織由来幹細胞の分離・培養

ラット鼠径部の脂肪組織を採取後、PBS（-）で十分に洗浄し、血管、結合組織等を除去後、組織を細分化し、コラゲナーゼタイプII（Sigma, ST Louis）にて40分40℃にて震盪させ、組織を消化した。ダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's modified Eagle's medium：DMEM）に10%濃度の胎仔牛血清（fatal bovine serum：FBS）、100U/ml penicillin G、100 μg/ml streptomycin を添加したものを基礎培地とした。脂肪組織を消化終了後、基礎培地を加えて1,300rpm 3分にて遠心処理を行い、下部に沈殿した細胞ペレットを新しい基礎培地の入った遠心管に移して攪拌し、洗浄した。この作業を3回繰り返し、十分にコラゲナーゼを洗浄した。最後に細胞成分を100 μmのメッシュでろ過したのち、基礎培地にて37℃、5% CO₂の条件下で培養を行い、3継代したものをASCsとし、以下の分化誘導実験に用いた（図1）。

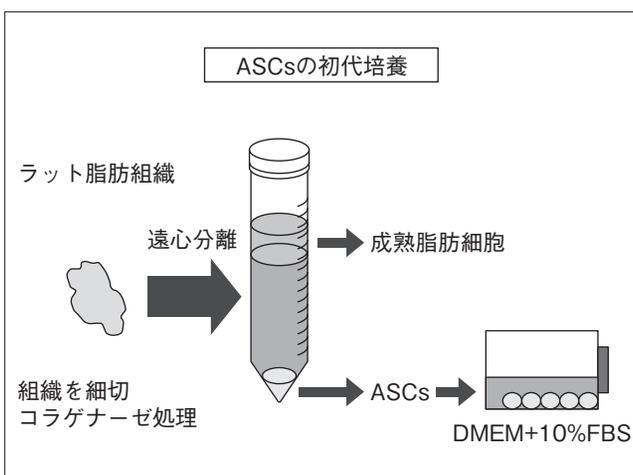


図1 脂肪組織からASCsを分離する方法

脂肪細胞への分化誘導

基礎培地に0.5 mM isobutyl-methylxanthine (IBMX)、1 μM dexamethasone、10 mM insulin、200 mM indomethacin を添加したものを脂肪分化誘導培地とした³⁾。培地交換は3日ごとに行った。サブコンフルエントになったASCsを脂肪分化誘導培地にて21日間培養し、形態的变化を位相差顕微鏡にて観察した。

骨細胞への分化誘導

基礎培地に0.1 μM dexamethasone、50 μg ascorbate-2-phosphate、10 mM β-glycerophosphateを添加したものを骨分化培地とした。培地交換は3日ごとに行い、サブコンフルエントになったASCsを骨分化誘導培地にて21日間培養した。

グリセロール3-リン酸脱水酵素（GPDH活性）の測定

分化誘導3週間後にGPDH活性の測定を行い、基礎培地で21日間培養したコントロール群と比較した。脂肪培養21日目の細胞のGPDH活性をGPDH活性測定キット（TAKARA BIO INC, Shiga, Japan）にて測定した。DNA定量キット（Cell Garage Co., Ltd., Tokyo, Japan）を用いて同一サンプルのDNAを定量し、GPDH活性を補正した。データはMann-WhitneyのU検定を用いて統計学的に評価を行い、 $p < 0.01$ を有意差ありと判定した。

Kossa染色

骨分化誘導を行った、または基礎培地で培養したASCsの石灰化沈着を染色するため、Kossa染色を行った。シャーレ内の培地を吸引し、PBS（-）で2回洗浄後、4% paraformaldehydeにて10分間固定した。その後、5% silver nitrate（Sigma, ST Louis）にて室温の暗室で10分間染色し、蒸留水で洗浄後、UVライトを1時間照射した。

【結 果】

初代培養したラット脂肪組織由来ASCsは、線維芽細胞状の形態をしており、基礎培地にて増殖した（図2A）。コンフルエントになったASCsを脂肪分化誘導培地にて培養すると、培養7日目より全体の80%程度の細胞の細胞質内に小さい脂肪滴を認め、培養8～21日目になると脂肪滴は徐々に増大した（図2B、矢印は脂肪滴を示す）。脂肪滴が大き

なるに従い、細胞の形態は線維芽細胞状より円型に変化した。

骨分化誘導培地にて21日間培養し、Kossa染色を行うと、細胞質内に黒色の石灰化沈着が認められた(図2C)。石灰化沈着がみられた細胞は全体の40%程度で、骨分化誘導培地にて培養した細胞すべてではなかった。一方、基礎培地で培養したASCsには石灰化沈着が認められなかった。

GPDH活性は、脂肪分化の際のマーカーとして汎用されている³⁾。本検討におけるGPDH活性は、コントロール群 0.0028 ± 0.001 (U/mg DNA) に対し、脂肪分化群 0.058 ± 0.00921 (U/mg DNA) と約20倍の活性を示した。

【考 察】

脂肪組織由来幹細胞 (ASCs) は、美容外科手術のひとつである脂肪吸引手術より得られた液状脂肪 (lipoaspirates) より2001年に初めて精製された¹⁾。今回我々は、ラット脂肪組織よりASCsを精製したが、既存の報告と同様に、それぞれの分化誘導培地で培養されたASCsは、脂肪・骨への分化が可能であることが明らかになった。

1990年代にラット⁴⁾ やヒト⁵⁾ の骨髄中に脂肪、骨、軟骨など中胚葉系細胞に分化可能な、いわゆる間葉系幹細胞が存在することが証明された。この細胞はすでに骨髄障害の治療や骨の再生などをターゲットに一部の施設においては

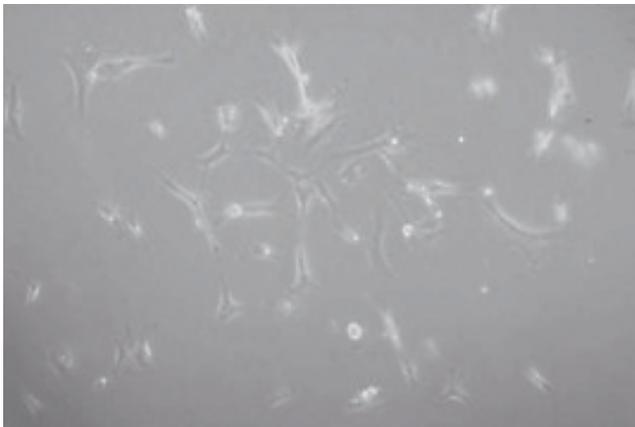


図2A 初代培養におけるラットASCsの位相差顕微鏡像。線維芽細胞状の形態をしている。

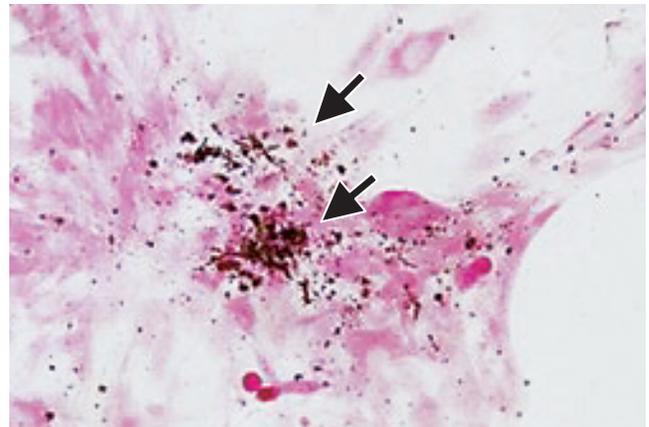


図2C 骨分化誘導後にKossa染色をおこなったASCs。石灰化沈着が黒色に染色されている(矢印)。

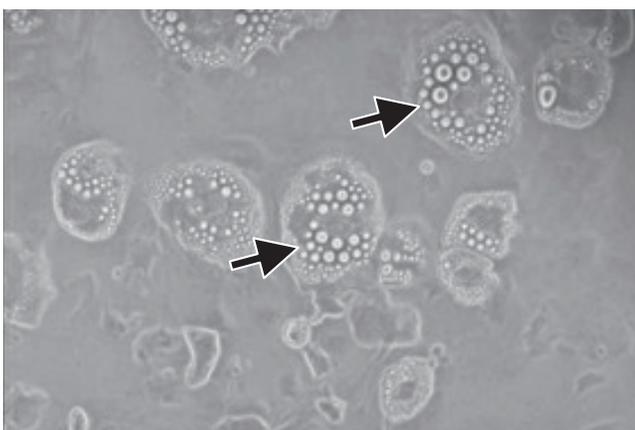


図2B 脂肪分化誘導をおこなったASCs。細胞質内に多数の脂肪滴が認められる(矢印)。

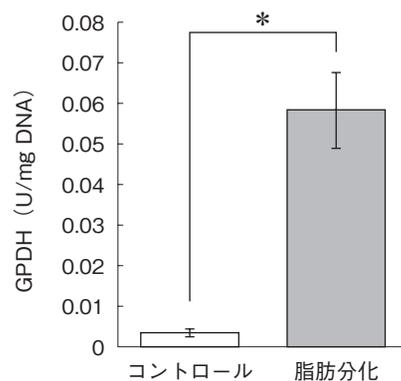


図3 脂肪分化誘導群とコントロール群のGPDH活性。脂肪分化群が有意に高いGPDH活性を示した。(* $p < 0.01$)

臨床試験が開始されている。しかしながらこの骨髄由来間葉系幹細胞は、獲得できる細胞数が非常に少なく、そのため体外培養を施さない限り一度に大量の骨髄採取を必要とする。したがって採取には全身麻酔を要する上、採取後の疼痛が不可避で、ドナーへの侵襲が大きいことが難点であった。

一方近年、この骨髄由来間葉系幹細胞と同様の性質を有する細胞が、骨髄以外の組織にも存在することが示唆され^{1) 6) 7)}、中でもZukら¹⁾は吸引脂肪組織中に間葉系幹細胞に類似した多能性幹細胞であるASCsを発見した。これらの骨髄・脂肪・真皮・血液などに微量含まれている未成熟の細胞は体性幹細胞と呼ばれ、ES細胞と比較し一定の種類の細胞に分化し、患者自身の細胞を採取するので、拒絶反応が起きないことが特徴とされている。その中でも脂肪組織は、形成外科手術の際の余剰組織として採取することが容易で、局所麻酔下でも採取が可能である。また脂肪組織採取は骨髄採取に比較して低侵襲で、採取後の疼痛や、ドナーサイトの変形・欠損も少なく行える。このため、脂肪組織が再生医療において幹細胞の普遍的な供給源となれば、理想的であると考えられる。

本研究において、脂肪分化は全体の80%程度の細胞において認められたが、骨分化は40%程度にしか認められなかった。これは、細胞の採取元が脂肪であるということが関係しているのかもしれない。今回はラットASCsを用いて検討したが、ヒトASCsの場合³⁾と比較し、細胞の形態分化の経過は類似していた。また採取組織の年齢⁸⁾、培地の種類⁹⁾等さまざまな要因により増殖・分化の効率が異なるという報告もあり、適切な増殖・分化条件のさらなる探索が必要と思われる。

再生医学に必要な要素として、細胞、足場、増殖因子の3つが重要であり、相互に最良の環境を構築して組織、器官の再生およびその臨床発展型である再生医療が成功に導かれると考えられる。我々の研究施設ではこれまでに、ASCsの臨床応用化を目指し、増殖因子がASCsに与える影響³⁾や、ASCsと足場を用いた3次元骨組織の作成¹⁰⁾を行ってきた。今後、本研究の内容を発展させ、ヒトへの使用の前臨床基礎研究のひとつとして、ラットASCsを用いた同種移植実験を計画している。体性幹細胞は現時点で再生医学において

最も有用な細胞のひとつであり、ASCsも将来骨髄由来幹細胞と並んで臨床応用されていくものと期待している。

【参考文献】

- 1) Zuk PA, et al : Multilineage cells from human adipose tissue : implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7 (2) : 211-28, 2001.
- 2) De Ugarte DA, et al : Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174 (3) : 101-9, 2003.
- 3) Kakudo N, et al : Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 359 (2) : 239-44, 2007.
- 4) Caplan AI : Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9 (5) : 641-50, 1991.
- 5) Pittenger MF, et al : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (5411) : 143-7, 1999.
- 6) Toma JG, et al : Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3(9) : 778-84, 2001.
- 7) Lee JY, et al : Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* 150 (5) : 1085-100, 2000.
- 8) de Girolamo L, et al : Human adipose-derived stem cells isolated from young and elderly women : their differentiation potential and scaffold interaction during in vitro osteoblastic differentiation. *Cytotherapy* 11 (6) : 793-803, 2009.
- 9) Lund P, et al : Effect of growth media and serum replacements on the proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells. *Cytotherapy* 11 (2) : 189-97, 2009.
- 10) Kakudo N, et al : Bone tissue engineering using human adipose-derived stem cells and honeycomb collagen scaffold. *J Biomed Mater Res A* 84 (1) : 191-7, 2008.