

## 特集【ここまで来た再生医療】

## 幹細胞供給源としての脂肪組織の有用性

水野 博司

日本医科大学形成外科学教室

## Versatility of Adipose Tissue as a Source of Stem Cells

Hiroshi Mizuno

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Nippon Medical School

## Abstract

The stem cells are promising for future cell-based therapy such as tissue engineering or regenerative medicine. Although Embryonic Stem Cells ( ESCs ) are theoretically highly beneficial, there are various limitations on their use posed by cell regulations and ethical considerations. Therefore, adult stem cells are considered to be highly available with neither ethical nor immunoreactive considerations as long as they are of autologous tissue origin. Much of work has focused on the Mesenchymal Stem Cells ( MSCs ) isolated from bone marrow stroma, which have been shown to possess adipogenic, osteogenic, chondrogenic, myogenic and neurogenic potential *in vitro*. However bone marrow procurement is severely painful for patients and the harvested cells yields low number.

Our preliminary studies have identified a putative stem cell population isolated from human adipose tissue. This cell population, termed Processed Lipoaspirate Cells ( PLA Cells ) is found to differentiate into adipogenic, osteogenic, chondrogenic and myogenic lineage *in vitro* in lineage-specific culture media. In addition to these findings, our recent data shows that PLA cells can be induced to differentiate into neural precursors, which are of an ectodermal origin. Furthermore, PLA cells express multiple CD marker antigens similar to those observed on MSCs. Finally, some of PLA clonal cells have capabilities of differentiate into adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineage. These findings suggest that human PLA have a mesodermal stem cell population. Since human adipose tissue is ubiquitous, easily obtainable in large quantity under local anesthesia with little patient discomfort, it may be an alternative stem cell source for mesenchymal tissue regeneration and engineering.

( J Nippon Med Sch 2003; 70: 428-431 )

Key words: regenerative medicine, adipose tissue, stem cells, plasticity

## 緒言

生体が本来有する自己組織再生能をうまく引き出し、新しい組織構築や器官形成により疾患の治療に役立てようとする学問、すなわち再生医学とその臨床発展型である再生医療は21世紀の医学および医療として現在最も期待されている。この再生医療に用いられる細胞には分化の段階に応じていくつかの細胞が利用

可能であるが、その中でも種々の成熟細胞に分化能を有する細胞、すなわち幹細胞の有用性が指摘されている。

幹細胞には胎生期胚盤胞の内部細胞塊より抽出され、生命個体のすべての細胞に分化しうる能力を有する胚性幹細胞 ( Embryonic Stem Cells, 以下 ES 細胞と略す ) と出生後の生命個体の組織中に存在し、三胚葉系譜の定まった成熟細胞に分化可能な体性幹細胞 ( Adult Stem Cells ) に分類され、いずれの細胞も極めて有用であることは異論ない。しかしながら ES 細胞の使用に関しては未だ倫理的、社会的問題を残しており、かつ免疫拒絶の問題も存在しているために、現

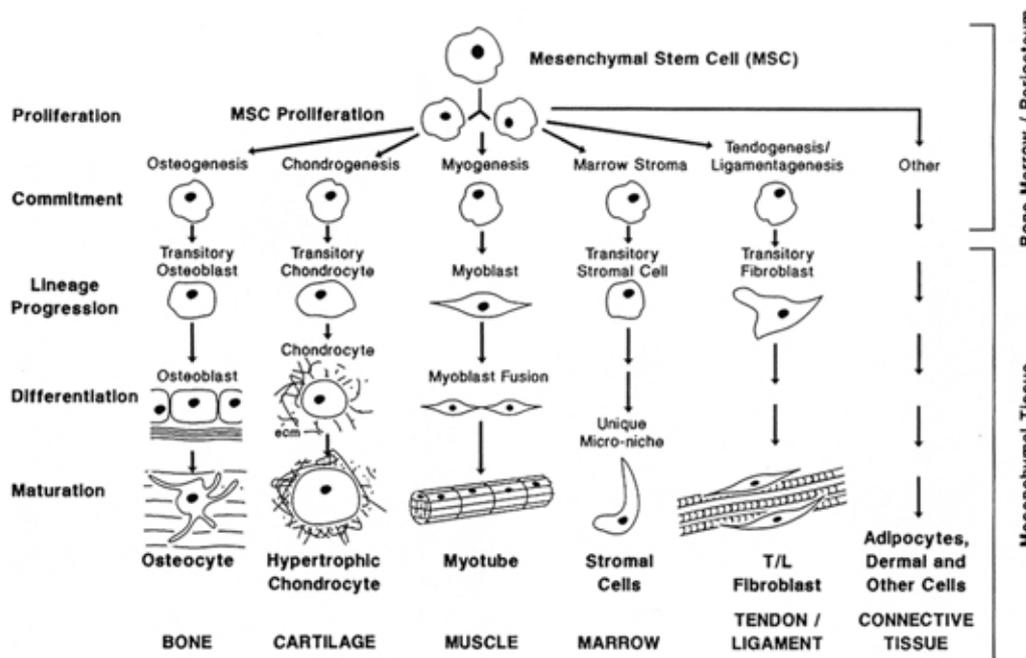


Fig. 1 “ Mesenchymal Process ” ( Cited from Caplan AI, Clin Plast Surg 21: 429, 1994 )

	CD29	CD31	CD34	CD44	CD45	CD49	CD71	CD90	CD105	CD106	SH3
PLA	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
MSC	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+

Fig. 2 Comparison of CD antigens between PLA cells and MSCs

時点では自己由来の体性幹細胞を用いることが両者の問題点を克服可能な点で有用と考えられる。

1991年 Caplan によりラットの骨髄中に<sup>1</sup>, 更には1999年 Pittenger らによりヒトの骨髄中に脂肪, 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 (Mesenchymal Stem Cells, 以下 MSCs と略す.) が存在することが証明された<sup>2</sup> (Fig. 1). 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臨床試験が開始されている. 更に最近ではこのような細胞が骨髄間質以外にも中枢神経, 網膜, 骨格筋, 肝臓などに存在するという報告も散見されている.

一方ヒトの脂肪組織は体重の10%以上を占める人体最大の組織であるが, 近年筆者が所属していた研究グループは, このヒト皮下脂肪組織から MSCs に極めて類似した細胞集団が存在することを実験的に証明し, この細胞を Processed Lipoaspirate Cells (以下 PLA 細胞と略す) と命名した<sup>3,4</sup>. 本稿においてはこれまでの PLA 細胞に関する研究成果に加えて最新の知見を一部紹介しつつ, 併せて将来の臨床展望について述べてみたい.

### 1. PLA 細胞とは

PLA 細胞という言葉は, そもそも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) より分離精製 (Processed) した細胞という意味で命名された. PLA 細胞の分離精製プロトコールについては既に紙上発表しているのここでは割愛する<sup>3</sup>. 通常約 100 ml の脂肪組織からおおよそ  $4 \times 10^7$  個の細胞が得られ, 特別な増殖因子などを必要とせずコントロール培地で容易に増殖する性質を有する.

### 2. PLA 細胞の構成細胞

皮下脂肪組織には成熟した脂肪細胞のみならず, 周囲の血管組織や間質が存在することから, PLA 細胞は単一の細胞で構成されているわけではなく数種類の細胞が混在していることはある程度容易に想像されるであろう. これらの構成細胞を特定するため以前我々は第 8 因子 (血管内皮細胞を同定), Smooth Muscle Actin (平滑筋細胞を同定) および ASO 2 (間葉系由来細胞を同定) に対する免疫染色を施した結果, PLA 細胞の大多数が間葉系由来細胞であり一部に血管内皮細胞と平滑筋細胞を含んでいることを証明している<sup>3</sup>. 更に細胞表面マーカーである各種 CD マーカー

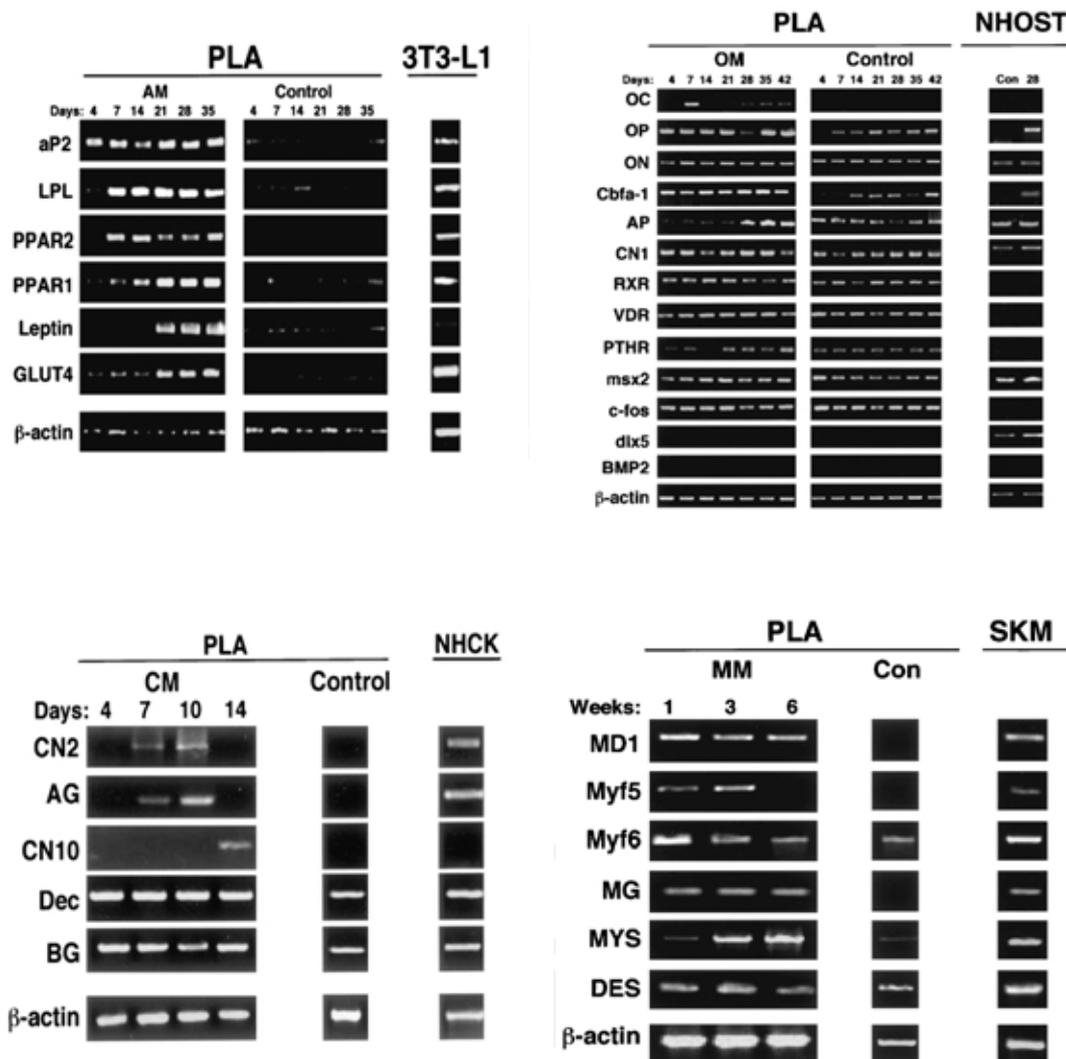


Fig. 3 RT-PCR analysis reveals that several gene expression was noted in differentiated PLA cells into various mesodermal lineages. < left above > : Adipogenic differentiation, < right above > : Osteogenic differentiation, < left below > : Chondrogenic differentiation, < right below > : Myogenic differentiation ( Cited from Zuk PA et al, Mol Biol Cell 13: 4279, 2003 )

に対する免疫染色を行ったところ、MSCsのそれと比較し殆どにおいて極めて類似していることが分かった ( Fig. 2 ) . 特に血球由来細胞のマーカである CD 31 , CD 34 および CD 45 はいずれにおいても陰性を示した . これらの結果から PLA 細胞を構成する細胞は骨髄間質由来の細胞集団と組成が極めて似たものであることが示唆された .

### 3 . PLA 細胞の分化能

*in vitro* において PLA 細胞を脂肪 , 骨 , 軟骨および骨格筋に分化誘導する培地内で培養を行い , 各種染色法にて分化能を確認したところ , 上記 4 つのすべての成熟細胞に分化可能であることが証明された<sup>35</sup> . この結果を更に裏付けるために分化誘導培地内で 2 ~ 6 週間培養された細胞より mRNA を抽出し , 各成熟細胞に特異的な遺伝子を含む種々の遺伝子発現を RT-PCR

で確認した . すると Fig. 3 に示すごとく , PPAR- $\gamma$  2 ( 脂肪 ) , Cbfa-1 ( 骨 ) , MyoD ファミリー ( 骨格筋 ) のような各成熟細胞への分化に必須の転写因子をはじめとする多くの関連遺伝子の発現が分化の各時期において確認された<sup>4</sup> . これらのことから PLA 細胞は中胚葉系成熟細胞に対する多分化能を有することが強く示唆された .

### 4 . PLA 細胞の可塑性

これまで体性幹細胞は , 造血幹細胞が血球細胞のみへ分化あるいは間葉系幹細胞が中胚葉系の成熟細胞へのみ分化するという具合に , 同系の成熟細胞にしか分化しないと言われてきていたが , 近年別の系の細胞に分化する可能性がいくつかの幹細胞において報告され始めた . MSCs においても 2000 年 Woodbury らによって神経細胞に分化する可能性を指摘され<sup>6</sup> , 体性幹

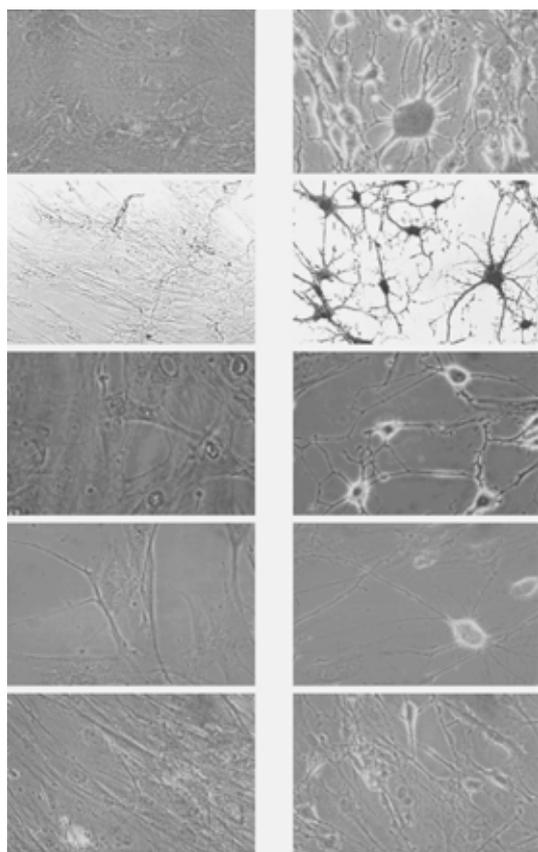


Fig. 4 Immunohistochemical analysis of neurally induced PLA cells. Control PLA cells and induced PLA cells were stained with anti-NSE (above), anti-trk-A (second row from above), anti-NeuN (third row from above), anti-MAP2 (second row from below) and anti-GFAP (below). Only induced PLA cells were stained positively with first three antibodies, indicating that PLA cells might have the differentiation potential into neurogenic precursor cells. (Cited from Ashjian PH et al, *Plast Reconstr Surg* 111: 1922, 2003)

細胞の可塑性についても現在研究が進んでいる。そこで PLA 細胞を神経分化誘導培地内で培養したところ、MSCs 同様幼弱な神経細胞に分化することが細胞形態的および免疫組織学的に証明され<sup>7</sup>、PLA 細胞も可塑性を有することが示唆された (Fig. 4)。

#### 5. Adipose-derived Stem Cells

これまで述べてきたように PLA 細胞は種々の細胞が混在する細胞集団であるがこの中に果たして本当に多分化能を有する幹細胞が存在するかどうかを検証するため、単一の細胞を取り出し増殖させていくつかの

クローン細胞を作成した。その後これらのクローンに対して各種の分化誘導培地内で培養したところ、脂肪、骨、軟骨の3種類の成熟細胞に分化可能なクローンが存在した。つまりこのクローンは多分化能を有する幹細胞である可能性が非常に高く、我々はこの細胞に対し Adipose-derived Stem Cells (ADSCs) と命名した<sup>4</sup>。

#### 6. PLA 細胞による再生医療の展望

再生医学に必要な3つの重要な要素である①細胞、②細胞の増殖に必要な足場および③細胞の増殖が効果的に行われるための増殖因子が相互に最良の環境を構築してはじめて組織、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。上述したように体性幹細胞は現時点で最も有用な細胞源のひとつであり、PLA 細胞も将来 MSCs と並んで臨床応用されていくものと期待している。とは言うものの、いくら細胞が理想的であっても足場や増殖環境が伴わない限り医療へ結びつけることは不可能である。このため今後目的とする再生組織に応じた足場の開発や増殖に必要な因子の投与方法、更にはより大きな組織再生のための血管導入の手法など多くの再生医学に関する研究が進み<sup>8</sup>、将来の臨床応用に結びついた真の再生医療が発展することを念じてやまない。

#### 文 献

1. Caplan AI: Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9: 641-650.
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
3. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al.: Multi-lineage cells from human adipose tissue: implication for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211-228.
4. Zuk PA, Zhu M, Ashjian PH, et al.: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2003; 13: 4279-4295.
5. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, et al.: Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109: 199-209.
6. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al.: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61: 364-370.
7. Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, et al.: In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111: 1922-1931.
8. Mizuno H, Hyakusoku H: Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch* 2003; 70: 300-306.