原 著

マウス大腿骨骨折モデルにおける 脱分化脂肪細胞 (DFAT) 移植による骨形成促進効果

山田 知裕¹⁾ 松本 太郎²⁾ 風間 智彦²⁾ 新井 嘉則³⁾
加野浩一郎⁴⁾ 徳橋 泰明¹⁾ 中西 一義¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部整形外科系整形外科学分野

²⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

³⁾ 日本大学歯学部歯科放射線学講座

⁴⁾ 日本大学生物資源科学部応用生物科学科

Promoting Effect of Dedifferentiated Fat Cell Transplantation on Bone Formation in a Mouse Femoral Fracture Model

Tomohiro YAMADA¹⁾, Taro MATSUMOTO²⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾, Yoshinori ARAI³⁾,
Koichiro KANO⁴⁾, Yasuaki TOKUHASHI¹⁾ and Kazuyoshi NAKANISHI¹⁾

¹⁾ Department of Orthopedic Surgery, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan

²⁾ Department of Functional Morphology, Division of Cell Transplantation and Regeneration,
Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan

³⁾ Department of Oral and Maxillofacial Radiology, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan

⁴⁾ Laboratory of Cell and Tissue Biology, Collage of Bioresource Science, Nihon University, Fujisawa, Japan

Treatment for limb fractures is well established, but severe trauma and extensive bone loss may result in inadequate bone union, even with appropriate treatment and surgery. Recently, regenerative medicine using stem cells has been applied in the field of orthopedics. Dedifferentiated fat (DFAT) cells are mature adipocyte-derived multipotent cells that have characteristics similar to mesenchymal stem cells. In this study, we examined whether DFAT cell transplantation into the fracture site promotes bone formation in a mouse femoral fracture model. As a result, we found that DFAT cell transplantation promoted callus formation and increased bone volume around the fracture site. These results suggest that DFAT cells are an attractive cell source for the treatment of refractory fracture.

Key words: dedifferentiated fat cell, cell therapy, regenerative medicine, fracture treatment

脱分化脂肪細胞, 細胞治療, 再生医療, 骨折治療

(J. Nihon Univ. Med. Ass., 2020; 79 (5): 265–273)

要旨 四肢の骨折は治療法や手術方法が確立されているが、重度の外傷、広範囲な骨欠損では、適切な治療や手術を施行しても、骨の癒合が不十分となることが多い。近年、整形外科領域においても、幹細胞などを利用した再生医療が期待されている。脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) は成熟脂肪細胞に由来する間葉系幹細胞に類似した多能性細胞である。本研究は、マウス大腿骨骨折モデルに対し、DFAT をペプチドハイドロゲルと共に骨折部位に移植し、骨形成促進効果を検討した。その結果、DFAT 移植により仮骨形成が促進され、骨折部周囲の骨量の増加が誘導されることが明らかとなった。DFAT は、難治性骨折に対する治療用細胞源として有望であることが示された。

序 文

整形外科の日常診療において、四肢の骨折は頻度の高い疾患である。現在は骨折のタイプを分類し、それぞれに合わせた治療法や手術方法が確立されつつある。しかし、重度の外傷や、広範囲な骨欠損、周囲の軟部組織や血管が損傷した場合には、骨の再生は起こらない¹⁾。大きな骨欠損に対しては、従来自家骨移植が行われてきたが、採取する量には限界がある。現在、このような根治不能な骨折に対して、幹細胞などを用いた再生医療が期待されている²⁻⁵⁾。脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cell: DFAT) は、成熟脂肪細胞を天井培養という方法で脱分化させることにより、高い増殖能と間葉系幹細胞

受付：2020 年 6 月 25 日，受理：2020 年 7 月 3 日

本論文の要旨は、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会（2012 年 10 月，名古屋）にて発表された。

(mesenchymal stem cell: MSC) に類似した多能性を獲得した細胞である⁶⁾。DFAT は少量の脂肪組織から患者年齢や基礎疾患に関係なく MSC 様細胞を大量に調製できるため、難治性骨折に対する治療用細胞として有用である可能性がある。本研究では、マウス大腿骨骨折モデルに対し、骨折部にペプチドハイドロゲルと共に DFAT を移植し、骨形成が促進されるか検討した。

研究材料および方法

1 実験動物

本実験は日本大学動物実験委員会の承認（承認番号：第 AP10M107）を得て行った。動物の飼育、実験は日本大学動物実験指針にしたがって施行した。C57BL/6 マウス（10 週齢、雄性）はオリエンタル酵母より購入し、実験に用いた。飼育条件は、実験時間以外は至適環境に保たれたケージの中で自由行動として、飲食は自由に摂取させた。

2 マウス DFAT の調製

マウス DFAT の調製は、Sugihara ら⁷⁾ の方法を改変して調製を行った。C57BL/6 マウスより、ペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg 腹腔内投与）麻酔下に鼠径部を剃毛し、1%キシロカインにて局所麻酔を行った後、皮膚切開し、皮下脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織は、1% fetal bovine serum (FBS, JRH bioscience, Lot 6G2149) 含有 phosphate-buffered saline (PBS) に保存した。PBS にて 3 回洗浄後、細切し 0.1% (W/V) コラゲナーゼ溶液 (Koken) を加えて 37℃ で 1 時間処理し、細胞を単離した。次に、孔径 250 μ m のフィルターを用いて未消化組織を 3 回濾過し、600 rpm で約 1 分間遠心分離後、最上層に遊離した成熟脂肪細胞層を採取した。採取した成熟脂肪細胞を、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に入れ、600 rpm で 5 分間遠心分離操作し、再び最上層を採取した。この同様の操作を 3 回繰り返した。最終的に採取された成熟脂肪細胞分画 (5×10^4) は、20% FBS 含有 DMEM で完全に満たした T12.5 細胞培養フラスコに播種し、37℃、5% CO₂ の条件下で培養した。培養 7 日後に培養液を交換し、細胞付着面が底になるようにフラスコを反転させ、培養を継続した。培養液の交換は 3 日毎に行い、第 5 継代以下の細胞を実験に用いた。マウス皮膚線維芽細胞は Cell Biologies より購入し、10% FBS 含有 DMEM にて継代培養を行った。培養液の交換は 3 日毎に行い、第 5 継代以下の細胞を実験に用いた。

3 in vitro における多分化能の評価

DFAT の脂肪、骨、軟骨の分化誘導実験は既報の方法を用いた⁶⁾。脂肪分化誘導実験は 30 mm ディッシュ (BD Falcon) に DFAT 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、脂肪分化誘導培地（10% FBS, 1 μ M デキサメサゾン, 0.5 mM isobutylmethylxanthine (Sigma-Aldrich), 1 $\times$ インスリン-トランスフェリン-セレンウム-X (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、Oil red-O (Sigma-Aldrich) を室温にて 15 分間作用させ、中性脂肪の細胞内蓄積を評価した。骨分化誘導実験は、30 mm ディッシュ (BD Falcon) に DFAT 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、骨分化誘導培地（10% FBS, 100 nM デキサメサゾン (Sigma-Aldrich), 10 mM β -グリセロリン酸 (Sigma-Aldrich), 0.05 mM 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%アリザリンレッド 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。軟骨分化誘導実験は既報⁸⁾ に従いペレット法を用いた。DFAT を 10 cm ディッシュ (BD Falcon) に播種し、コンフルエントになるまで 10% FBS 含有 DMEM で培養した後、トリプシン処理により回収した 2×10^6 個の細胞を 15 ml ポリプロピレンチューブ (BD Falcon) に移し、10 分間 600 rpm で遠心後、これに軟骨誘導培養液 (NH ChondroDiff MediumTM, Miltenyi Biotec) 1 ml を加え、3 週間ペレット培養を行った。培養液の交換は 3 日毎に行った。形成された軟骨用組織を実体顕微鏡 (VB-7000, Keyence) で観察した。

4 マウス骨折モデルの作成

骨折モデルの作成は、Bonnarens ら⁹⁾ の方法に準じて行った。3%イソフルラン吸入麻酔下に、マウスの左大腿部皮膚を切開後、大腿骨を露出させ、25 G 注射針 (Terumo) を大腿骨遠位端より髓腔内に刺入し、一旦引き抜いた後、マイクロチョイスオシレーティングソー (Zimmer Biomet) を使用して、膝関節より近位 10 mm の部位に大腿骨横骨折を作成した。骨折部を洗浄後、ペプチドハイドロゲル Pura MatrixTM (3-D Matrix) 50 μ l/頭を局所注射した。ペプチドハイドロゲルは使用ガイドラインに従って調整した。骨折部を整復し 25 G 注射針を髓腔内に刺入して、大腿骨近位の皮質から針が突出したところで固定し、針を大腿骨遠位で切断し、髓内釘固定した (Fig. 1)。マウス 10 頭に骨折を作成し、作成後 2 週, 3 週, 4 週, 5 週, 6 週の時点で 2 匹ずつペントバルビタールの大量投与により安楽死させた後、大腿骨を摘出し、注射針を抜去後、実験動物用 Micro CT (R-mCT, Rigaku) を用いて骨量と骨密度の測定を行った。

5 細胞移植実験

マウスの左大腿骨に上記の方法で骨折を作成後、以下

Fig. 1 Method of the femoral fracture model.

の3群に分け細胞移植を行った。骨折部にペプチドハイドロゲル 50 µl/頭を局所注射したものを Control 群 ($n = 10$)。ペプチドハイドロゲル 50 µl に DFAT 1×10^5 /頭を混合し、骨折部に局所注射したものを DFAT 群 ($n = 10$)。ペプチドハイドロゲル 50 µl に線維芽細胞 1×10^5 /頭を混合し、骨折部に局所注射したものを Fibroblast 群 ($n = 10$) とした。移植した線維芽細胞と DFAT は同一のマウスより採取したものを使用した。移植4週間後にペントバルビタール大量投与により安楽死させ、大腿骨を摘出し、注射針を抜去後、実験動物用 Micro CT を用いて骨量と骨密度の測定を行った。

6 Micro CT 評価

実験動物用 Micro CT は、90 kV、100 µA の撮影条件で撮影した。骨量と骨密度は、解析ソフトウェア i-viewR (MORITA) を使用し、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) の測定を行った。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 (Lt-Rt) を算出し、推定仮骨量とした。

7 統計学的解析

定量結果は、 $\text{mean} \pm \text{SE}$ で表した。3 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 マウス成熟脂肪細胞から DFAT の調製

初めにマウス脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離し DFAT の調製を行った。マウス皮下脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞の形態は単胞性であり、単核であることを確認した (Fig. 2, Pre)。天井培養4日目には、成熟脂肪細胞はフラスコの天井側に接着し、一部の細胞から

Fig. 2 Morphological changes of mature adipocytes during ceiling culture. Arrows indicate DFAT cells derived from mature adipocytes. Bars: 100 µm.

Fig. 3 Evaluation of in vitro differentiation potential of DFAT cells. Bars: 100 μm.

Fig. 4 Representative micro-CT images of femoral fracture sites at 4, 5, and 6 weeks after fracture. The dotted lines indicate the fracture site and the red lines indicate the existing bone cortex. The arrows indicate the measurement area for bone volume (BV) and bone mineral density (BMD).

は線維芽細胞様の形態を示す DFAT の出現が認められた (Fig.2 Day 4). 培養 7 日目には増殖した DFAT のコロニー形成が認められた (Fig. 2 Day 7). その後, フラスコを反転し, 通常の付着培養にて培養を継続すると, DFAT は

活発に増殖し, 培養 14 日目にはコンフルエントに到達した (Fig. 2 Day 14). DFAT の分裂周期は約 60 時間であり, 継代 5 代以上にわたり培養が可能であった.

Fig. 5 Micro-CT images of femoral fracture sites in each group (the sagittal section). Each image represents an individual mouse examined. The red lines indicate the existing bone cortex.

2 マウス DFAT の in vitro における分化能

次にマウス DFAT の in vitro における多分化能を検証した。マウス DFAT を脂肪分化誘導培地で3週間培養を行った結果、Oil red-O 陽性の脂肪滴を含む脂肪細胞が多数誘導されることを確認した (Fig. 3, Adipogenic)。骨分化誘導培地で3週間培養を行った結果、Alizarin-red S 染色陽性を示すカルシウム沈着を伴った骨芽細胞の誘導が認められた (Fig. 3, Osteogenic)。また DFAT を軟骨分化誘導培地を用いて3週間ペレット培養を行った結果、細胞外基質に富んだ軟骨様凝集体が誘導された (Fig. 3, Chondrogenic)。以上の結果より、マウス DFAT は脂肪、骨、軟骨への多分化能を有することが確認できた。

3 マウス骨折モデルの評価

次にマウスに大腿骨骨折を作成後、経時的に Micro CT 撮影を行い、仮骨形成の程度や骨折部の癒合の有無について検討した。その結果、骨折モデル作成2週、3週後には、仮骨形成は認められるものの、骨折部の癒

合が不十分であった。モデル作成4週後には、顕著な仮骨形成が観察され、骨折部の癒合も認められた (Fig. 4, 4w)。モデル作成5週、6週後では、骨癒合は認められるものの、除々に仮骨面積が縮小する所見が認められた (Fig. 4, 5w, 6w)。以上の結果から、本骨折モデルでは、骨折作成4週後より明確な骨融合が起これ、この時点で仮骨形成が最大となることが明らかとなった。

4 マウス骨折モデルに対する DFAT 移植の効果

仮骨形成が最大となる大腿骨骨折作成4週後に、Control 群、DFAT 群、Fibroblast 群の仮骨形成の程度を比較した。Fibroblast 群のうち1匹は骨折部の癒合が不良であり、骨内固定を抜去する際に骨折を起こした。またもう1匹は骨折部の短縮を認めたため、この2匹は評価対象から除外した。大腿骨の Micro CT 撮影を行った結果、Sagittal 面の観察において3群とも骨折作成4週間後には骨折部の癒合を認め、骨折部周囲に仮骨形成が観察された (Fig. 5)。DFAT 群では全てのマウスにおいて、

Fig. 6 Micro-CT images of femoral fracture sites in each group (the coronal section). Each image represents an individual mouse examined. The red lines indicate the existing bone cortex.

仮骨形成が著明であり、Control 群に比べ、骨形成量が上回っている傾向が認められた。Fibroblast 群は全例で仮骨の形成を認めるものの、個体差が大きい傾向があった。同様の所見は MicroCT 画像 Coronal 面でも確認できた (Fig. 6)。各群の骨折部位レベルの MicroCT 画像 Axial 面の観察において、Control 群では、仮骨形成量が比較的少なく、全周性に仮骨形成が認められない個体が数多く存在した (Fig. 7)。これに対して DFAT 群では、殆どの個体で、骨を中心に全周性に顕著な仮骨形成が認められた。一方、Fibroblast 群では全周性に仮骨形成を認める個体もあるが、その量には個体によるばらつきが認められた。

5 Micro CT による定量評価

解析ソフトを用いて、各群の BV を定量した結果、Control 群 $7.3 \pm 0.6 \text{ mm}^3$ 、DFAT 群 $8.4 \pm 1.0 \text{ mm}^3$ 、Fibroblast 群 $7.7 \pm 1.2 \text{ mm}^3$ であった (Fig. 8)。統計解析の結果、DFAT 群は Control 群に比べ有意な増大を示した ($p <$

0.05)。一方、Control 群と Fibroblast 群間および、DFAT 群と Fibroblast 群間では、統計学的有意差は認められなかった。各群の推定仮骨量 BV (Lt-Rt) は、Control 群 $2.5 \pm 0.5 \text{ mm}^3$ 、DFAT 群 $3.6 \pm 0.7 \text{ mm}^3$ 、Fibroblast 群 $3.4 \pm 0.8 \text{ mm}^3$ であり、DFAT 群は Control 群に比べ有意な推定仮骨量の増大を示した ($p < 0.05$) (Fig. 9)。一方、Control 群と Fibroblast 群間および、DFAT 群と Fibroblast 群間には統計学的有意差を認めなかった。各群の BMD を定量した結果、Control 群 $993.7 \pm 47.9 \text{ g/cm}^2$ 、DFAT 群 $922.8 \pm 57.9 \text{ g/cm}^2$ 、Fibroblast 群 $942.6 \pm 62.0 \text{ g/cm}^2$ であった (Fig. 10)。統計解析の結果、DFAT 群は Control 群に比べ有意な低下を示した ($p < 0.05$)。一方、Control 群と Fibroblast 群および、DFAT 群と Fibroblast 群の間では統計学的有意差は認められなかった。以上の結果より、骨折部位への DFAT 移植により仮骨形成が促進される結果、BV、BV (Lt-Rt) が増加し、BMD が低下することが明らかとなった。

Fig. 7 Micro-CT images of femoral fracture sites in each group (the axial section). Each image represents an individual mouse examined. The red lines indicate the existing bone cortex.

Fig. 8 Comparison of bone volume (BV) in each group. Bars: mean $\pm$ SE, *: $p < 0.05$, NS: not significant.

Fig. 9 Comparison of estimated callus volume (BV(Rt-Lt)) in each group. Bars: mean $\pm$ SE, *: $p < 0.05$, NS: not significant.

Fig. 10 Comparison of bone mineral density (BMD) in each group. Bars: mean $\pm$ SE, *: $p < 0.05$, NS: not significant.

考 察

今回、マウス大腿骨骨折モデルに対して骨折部にペプチドハイドロゲルと共にDFATを移植することにより、ペプチドハイドロゲル単独移植に比べ、仮骨形成の促進が認められることを明らかにした。本研究はDFAT移植による骨折治癒促進作用を初めて明らかにした報告である。ペプチドハイドロゲルは、自己重合によりナノメートル単位の繊維構造を形成し、ゲル内で優れた細胞の浸透性や生着性を発揮することが知られている。また骨欠損部位に充填することにより、マトリゲルに比較して明らかに高い骨形成能を有することが報告されている¹⁰⁾。骨や軟骨などの硬組織に細胞を移植する場合、効率良く細胞を生着させ、その機能を発揮させるために適切な足場となるマトリックスとともに移植する必要がある。今回用いたペプチドハイドロゲルは、MSCを長期間生着、増殖させ、骨芽細胞へ分化させるマトリックスとして有効であることが示されており¹¹⁾、DFATや線維芽細胞を移植して骨形成能を評価するマトリックスとして適していると考えられた。

DFATをペプチドハイドロゲルと共に移植したDFAT群では、ペプチドハイドロゲルのみのControl群と比較して骨折周囲部位のBVおよびBV(Rt)-BV(Lt)は有意に増加していた。この機序としては、DFATが直接骨分化した可能性や、血管新生や創傷治癒に係わる種々の液性因子分泌によるパラクライン効果によるものが推定される。実際にDFATからは血管新生や骨再生に係わるサイトカインが分泌され、骨欠損モデル動物に対して骨再生能があることが報告されている¹²⁾。一方、細胞の対

照群として検討したFibroblast群は、2個体で骨融合が認められず、解析ができなかったほか、解析ができた8個体も仮骨形成の程度に個体差が大きく、BV、BV(Rt)-BV(Lt)共にControl群との間に有意差は認められなかった。Fibroblast群で個体差が大きかった理由として、線維芽細胞には分化度の異なる多様な細胞が混在していることが影響している可能性がある。DFAT群とFibroblast群との比較では、統計学的有意差は認められなかったものの、BV、BV(Rt)-BV(Lt)共にDFAT群が高い傾向にあった。In vitro 分化誘導実験においてDFATが骨分化能を有することや、今回Fibroblast群のうち解析から除外した2個体は骨融合が認められなかったことを考慮すると、今後、検討する個体数を増やすことにより、DFAT移植による骨形成促進作用の優位性を明確にできる可能性があると思われる。

今回、骨折部位のBMDの定量解析を行った結果、Control群と比較してDFAT群でBMDが低下するという結果が得られた。これまでに報告されている類似の骨折モデルを用いた動物実験では、仮骨が最も形成される時期は、本研究と同様に骨折後4～6週であり、その仮骨のBMDが最も高くなる時期は骨折後6～8週であると報告されている¹³⁻¹⁵⁾。本研究においてDFAT群でBMD低下が認められた理由として、骨折モデル作成4週間後に評価したため、DFAT群ではBMDの低い幼若な仮骨が多く形成された結果、Control群に比べ相対的にBMDが低下したことが考えられる。一般的に仮骨形成が著明なほどモデリング後のBMDが高くなることから、モデル作成後6週日以降に評価すると、異なった結果が得られる可能性が示唆される。実際に、両側卵巣摘出による骨粗鬆症モデルウサギを用いた研究では、DFAT移植によりBMDが増加するといった報告がなされている¹²⁾。今後、DFAT移植がBMDや骨強度にどのような影響を与えるか明確にするために、移植後より長期的な経時変化について検討する必要がある。

今回の結果からDFATを移植して骨形成が促進されることが確認できたが、DFATが直接骨分化した結果、骨形成に寄与したかは明らかにできなかった。移植したDFATがどのような細胞に分化し、どのような挙動を示すかについては、蛍光ラベルを行ったDFATを移植し、in vivo イメージングシステムなどを用いて明らかにする必要がある。臨床応用を考えた場合、DFATは、ドナー年齢や基礎疾患に影響されずに均質なMSC様細胞を調製できるという利点がある。このため、DFATは骨再生能の低下した高齢者に好発する大腿骨頸部骨折や転子部骨折といった難治性骨折に対しても自家移植による骨再生効果が期待できると考えられる。今後は、偽関節を伴う難治性骨折モデル動物に対するDFAT移植の有効性を検討するなど、難治性骨折に対するDFAT細胞治療の実用化に向けた研究が望まれる。

結 論

本研究は、マウス大腿骨骨折モデルに対し、DFAT をペプチドハイドロゲルと共に骨折部位に移植し、骨形成促進効果を検討した。その結果、DFAT 移植により仮骨形成が促進され、骨折部周囲の骨量の増加が誘導されることが明らかとなった。DFAT は、難治性骨折に対する治療用細胞源として有望であることが示された。

謝 辞

本論文の主旨を含む学位総括論文は日本大学リポジトリに公開されています。

本論文に記載する COI はありません。

文 献

- 1) Soucacos PN, Dailiana Z, Beris AE, et al. Vascularised bone grafts for the management of non-union. *Injury* 2006; **37** Suppl 1: S41–50.
- 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) Granero-Molto F, Myers TJ, Weis JA, et al. Mesenchymal stem cells expressing insulin-like growth factor-I (MSCIGF) promote fracture healing and restore new bone formation in Irs1 knockout mice: analyses of MSCIGF autocrine and paracrine regenerative effects. *Stem Cells* 2011; **29**: 1537–1548.
- 4) Undale A, Fraser D, Hefferan T, et al. Induction of fracture repair by mesenchymal cells derived from human embryonic stem cells or bone marrow. *J Orthop Res* 2011; **29**: 1804–1811.
- 5) Batista MA, Leivas TP, Rodrigues CJ, et al. Comparison between the effects of platelet-rich plasma and bone marrow concentrate on defect consolidation in the rabbit tibia. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; **66**: 1787–1792.
- 6) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210–222.
- 7) Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, et al. Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. *Differentiation* 1986; **31**: 42–49.
- 8) Sakuma T, Matsumoto T, Kano K, et al. Mature, adipocyte derived, dedifferentiated fat cells can differentiate into smooth muscle-like cells and contribute to bladder tissue regeneration. *J Urol* 2009; **182**: 355–365.
- 9) Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 1984; **2**: 97–101.
- 10) Thonhoff JR, Lou DI, Jordan PM, et al. Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials in vitro. *Brain Res* 2008; **1187**: 42–51.
- 11) 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. *J Biomed Mater Res A* 2008; **84**: 128–136.
- 12) 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 Eng Part A* 2013; **19**: 1792–1802.
- 13) Wang CJ, Huang KE, Sun YC, et al. VEGF modulates angiogenesis and osteogenesis in shockwave-promoted fracture healing in rabbits. *J Surg Res* 2011; **171**: 114–119.
- 14) Li YF, Luo E, Feng G, et al. Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 2010; **21**: 1889–1897.
- 15) Shen B, Mu JX, Pei FX. Relationship among bone mineral density, collagen composition, and biomechanical properties of callus in the healing of osteoporotic fracture. *Chin J Traumatol* 2007; **10**: 360–365.