

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11648

研究課題名(和文) 頬脂肪体由来幹細胞と単球を利用した自己移植材の開発

研究課題名(英文) Autologous graft using adipose-derived stem cells and monocyte-macrophage lineages

研究代表者

中田 秀美(Nakata, Hidemi)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：30451967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は脂肪組織由来幹細胞：Adipose-derived stem cells (ASC)に着目し、骨芽細胞への分化能や、立体培養、また、ASC スフェロイドの単球・マクロファージ系細胞との共培養による立体的分化誘導と組織再生の可能性を検討し、ビスホスホネート系薬剤の単球・マクロファージ系に対する影響とその骨再生への応用、口腔内から採取できる他の組織幹細胞に対する影響についての検討を行った。さらに、マウス頬脂肪体由来ASCと腹部皮下脂肪由来ASCを採取し、骨芽細胞への分化能や各種分化誘導刺激への応答の比較を行うと同時に、単球・マクロファージ系との相互作用を利用した骨再生の可能性を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体性幹細胞は様々な組織に潜在的に含まれているが、特に脂肪由来幹細胞は上皮直下の脂肪組織中に存在しており、採取が低侵襲であることと、幹細胞の含有量が骨髄に比較して約1000倍であることから注目されている。また、自己の組織であることと、遺伝子導入を必要としない点にもメリットがあると考えられている。我々は脂肪組織の採取部位によってその中に含まれる脂肪由来幹細胞の性質が異なることを確認した。また、単球・マクロファージ系と共存することや、ビスホスホネート剤の添加により、骨芽細胞分化が促進されることも明らかにした。これらの方法が確立できれば、低侵襲に採取可能な自己組織移植材として使用できる。

研究成果の概要(英文)：Tissue regeneration with autologous somatic stem cells has attracted attention as one of the regenerative therapy. Adipose tissue can be harvested by low invasive procedure because of its location. Moreover, adipose tissue includes 500 to 1000 times of stem cells than bone marrow. In this study, we focused on adipose-derived stem cells (ASC) as a source of somatic stem cells, and evaluated its differentiation potential for osteoblastic cells by three-dimensional culture and/or co-culture with monocyte-macrophage lineages. We further evaluated the effect of bisphosphonates for osteogenesis of ASC and other stem cells harvested from oral cavity and bone marrow stem cells. Furthermore, we compared the characteristics and proliferation/differentiation ability between ASCs isolated from abdominal fat tissue and buccal fat pad. Our results suggested that ASCs isolated from buccal fat pad has a possibility to generate a novel autologous tissue graft by using monocyte-macrophage lineages.

研究分野：口腔再生医学

キーワード：脂肪由来幹細胞 単球・マクロファージ系 ビスホスホネート剤 骨芽細胞分化誘導 頬脂肪体由来ASC

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

体性幹細胞は様々な組織に潜在的に含まれているが、特に脂肪由来由来幹細胞 (ASC) は上皮直下の脂肪組織中に存在しており、採取が低侵襲であることと、幹細胞の含有量が骨髄に比較して約 1000 倍であることから注目されている。また、年齢や性別によらず採取が可能であること、さらに、iPS 細胞に比較すると遺伝子導入などの手順が不要であることや、自己の組織であるため、臨床応用の際、免疫学的観点や倫理的な面においてもメリットがあると考えられている。また、口腔内には ASC のソースとして頬脂肪体が存在する。皮膚切開による癒痕が懸念される腹部皮下脂肪に比較して、口腔内の頬粘膜切開のみで採取可能な頬脂肪体は癒痕を残すことなく低侵襲に採取できる。しかし、現時点ではその組織由来幹細胞の増殖能や分化能には由来や個体による差があり、組織幹細胞を用いた再生療法の臨床応用には更なる条件の検討と培養方法や移植法の改善が求められる。

### 2. 研究の目的

以前の我々の研究で、ASC を立体培養し、骨芽細胞分化誘導を試みたことから、今回の研究では口腔内から採取できる細胞、特に頬脂肪体由来幹細胞や歯肉由来幹細胞、骨膜由来細胞に関する研究を中心に検討を行った。また、単球・マクロファージ系細胞の分化・成熟に関連するビスフォスフォネート製剤や、bFGF、さらにエクソソーム中のマイクロ RNA など、組織幹細胞の分化に影響を及ぼす因子に関する解析を行った。また、ASC および骨膜細胞に関しては、低出力パルス超音波(LIPUS)の効果についても検討を行った。

### 3. 研究の方法

脂肪由来幹細胞は 4 週齢、8 週齢、リタイア雌マウスの腹部皮下脂肪および頬脂肪体から分離した。フローサイトメトリーにて細胞膜表面抗原を比較し、さらに分化誘導を行って骨芽細胞分化能を比較した。歯肉由来幹細胞は、6 週齢雌マウス口蓋歯肉より分離し、骨膜細胞が含まれていないことを確認した後、細胞膜表面抗原の解析および分化誘導を行い、骨髄由来幹細胞と比較を行った。骨膜細胞は 4 週齢雌マウス頭蓋骨骨膜から分離し、骨芽細胞および線維芽細胞への分化誘導を行い、骨膜由来細胞の二相性分化能に関して検討を行った。さらに、ASC および骨膜由来細胞に対する LIPUS 刺激の骨芽細胞分化における効果を検討した。

### 4. 研究成果

我々は脂肪組織の採取部位によってその中に含まれる ASC の性質が異なることを確認した。また、単球・マクロファージ系と共存することや、ビスフォスフォネート製剤の添加により、骨芽細胞分化が促進されることも明らかにした。さらに、骨膜由来細胞や、歯肉由来細胞の骨芽細胞誘導に LIPUS やエクソソームが影響を及ぼすことも明らかにした。これらの方法が確立できれば、低侵襲に採取可能な自己組織移植材として使用できると考えられる。

## 発表

1. Kaori Yokota, Hidemi Nakata, Wai Maung, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda. Feasibility of exosomes from osteoblasts on osteogenesis of periosteum-derived cells. The 97<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR. Vancouver, Canada. June 19-22, 2019
2. 三浦基、中田秀美、春日井昇平、黒田真司. 骨膜細胞の骨芽細胞および線維芽細胞への二相性分化の可能性. 第 22 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会. 東京 12/01-02, 2018
3. Xiaolong Sun, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda. The effects of short-time application of FGF-2 on cell proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. EAO congress. Vienna, Austria. 10/12-13, 2018
4. Motoi Miura, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Munemitsu Miyasaka, You-Kyong Kim, Wai Myo Maung, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda. Biphasic ability of periosteum-derived cells between osteoblastogenesis and fibroblastogenesis in vitro. EAO congress. Vienna, Austria. 10/12-13, 2018
5. Quan Sun, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda Comparison of gingival derived and bone marrow mesenchymal stem cells for osteogenesis EAO congress. Vienna, Austria. 10/12-13, 2018
6. Emi Okada, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda. Feasibility of indirect osteoblast differentiation by liposomal clodronate. (iLIM-2) ICMaSS. Nagoya. 9/30, 2017
7. 岡田恵美、中田秀美、山本麻衣子、春日井昇平、黒田真司. ビスフォスフォネートの短期作

## 論文

1. Wai Myo Maung, Hidemi Nakata, Motoi Miura, Munemitsu Miyasaka, You-Kyoung Kim, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda. Low intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic differentiation of periosteal cells in vitro. *Tissue Engineering Part A*. 0(JA): , March 13, 2020
2. Xiaolong Sun, Hidemi Nakata, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda. Effects of three-day Fibroblast growth factors-2 (FGF-2) supplementation on proliferation and osteogenic differentiation of cultured adipose-derived and bone marrow-derived stromal cells. *Journal of Oral Tissue Engineering*.
3. Wai Myo Maung, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, You-kyoung Kim, Munemitsu Miyasaka, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda. Effects of Low-intensity pulsed ultrasound in osteogenic differentiation of murine periosteum-derived cells. *Biointegration*.
4. Motoi Miura, Hidemi Nakata, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda. Fibroblast and osteoblast differentiation characteristics of periosteum-derived cells in mouse calvaria. *Biointegration*.
5. Shinji Kuroda, Hidemi Nakata, Shohei Kasugai. Attempt to regenerate tooth extraction cavity by three dimensional culture construct using buccal adipose-derived stem cells. *Impact*. Review Article. 12/14/2019
6. Warunee Pluemsakunthai, Shinji Kuroda, Hidemi Nakata, Shohei Kasugai. The evaluation of platelet-rich fibrin for preventing an alveolar ridge atrophy in a rat tooth extraction socket model. *Medicine and Medical Science*. 7(8): 105-112, August 2019
7. Quan Sun, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda. Comparison of gingiva-derived and bone marrow mesenchymal stem cells for osteogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 23: 7592-7601, 2019.
8. Quan Sun, Hidemi Nakata, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda. Isolation and characteristics of mouse gingival mesenchymal stem cells. *Journal of Bio-Integration*. 9(1): 2019
9. Lia Kartika Wulansari, Boosana Kaboosaya, Masud Khan, Mariko Takahashi, Hidemi Nakata, Shinji Kuroda, Kazuhiro Aoki, Shohei Kasugai. Beneficial effects of fasting regimens on periodontal tissues in experimental periodontitis mice model. *Journal of International Dental and Medical Research*. 11(2): 362-369, 2018
10. Emi Okada, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda. Indirect osteoblast differentiation by liposomal clodronate. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 22(2): 1127-1137, Feb 2018
11. Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Emi Okada, Tomoko Nagayama, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda. Osteogenic potential of adipose-derived macrospheroids cocultured with CD11b+ monocytes. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 32(4): 231-240. July/August 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 11件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Emi Okada, Tomoko Nagayama, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda	4. 巻 32(4)
2. 論文標題 Osteogenic potential of adipose-derived macrospheroids cocultured with CD11b+ monocytes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Oral and Maxillofacial Implants.	6. 最初と最後の頁 231-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Emi Okada, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Shohei Kasugai, *Shinji Kuroda.	4. 巻 22(2)
2. 論文標題 Indirect osteoblast differentiation by liposomal clodronate.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine.	6. 最初と最後の頁 1127-1137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.13366. Epub 2017 Oct 24.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Lia Kartika Wulansari, Boosana Kaboosaya, Masud Khan, Mariko Takahashi, Hidemi Nakata, Shinji Kuroda, Kazuhiro Aoki, Shohei Kasugai	4. 巻 11(2)
2. 論文標題 Beneficial effects of fasting regimens on periodontal tissues in experimental periodontitis mice model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of International Dental and Medical Research	6. 最初と最後の頁 362-369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Quan Sun, Hidemi Nakata, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Isolation and characteristics of mouse gingival mesenchymal stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bio-Integration.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Quan Sun, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda.	4. 巻 23
2. 論文標題 Comparison of gingiva-derived and bone marrow mesenchymal stem cells for osteogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine.	6. 最初と最後の頁 7592-7601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Warunee Pluemsakunthai, Shinji Kuroda, Hidemi Nakata, Shohei Kasugai.	4. 巻 7(8)
2. 論文標題 The evaluation of platelet-rich fibrin for preventing an alveolar ridge atrophy in a rat tooth extraction socket model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine and Medical Science.	6. 最初と最後の頁 105-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shinji Kuroda, Hidemi Nakata, Shohei Kasugai.	4. 巻 12/14
2. 論文標題 Attempt to regenerate tooth extraction cavity by three dimensional culture construct using buccal adipose-derived stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Impact. Review Article.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Motoi Miura, Hidemi Nakata, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Fibroblast and osteoblast differentiation characteristics of periosteum-derived cells in mouse calvaria.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bio-Integration.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wai Myo Maung, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, You-kyoung Kim, Munemitsu Miyasaka, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Effects of Low-intensity pulsed ultrasound in osteogenic differentiation of murine periosteum-derived cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bio-Integration.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Xiaolong Sun, Hidemi Nakata, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of three-day Fibroblast growth factors-2 (FGF-2) supplementation on proliferation and osteogenic differentiation of cultured adipose-derived and bone marrow-derived stromal cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Tissue Engineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wai Myo Maung, Hidemi Nakata, Motoi Miura, Munemitsu Miyasaka, You-Kyoung Kim, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda.	4. 巻 0(JA) March 13
2. 論文標題 Low intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic differentiation of periosteal cells in vitro.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kaori Yokota, Hidemi Nakata, Wai Maung, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda.
2. 発表標題 Feasibility of exosomes from osteoblasts on osteogenesis of periosteum-derived cells.
3. 学会等名 The 97th General Session & Exhibition of the IADR. Vancouver, Canada. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦基、中田秀美、春日井昇平、黒田真司
2. 発表標題 骨膜細胞の骨芽細胞および線維芽細胞への二相性分化の可能性.
3. 学会等名 第22回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会. 東京
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Xiaolong Sun, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda.
2. 発表標題 The effects of short-time application of FGF-2 on cell proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells.
3. 学会等名 EAO congress. Vienna, Austria. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motoi Miura, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Munemitsu Miyasaka, You-Kyong Kim, Wai Myo Maung, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda.
2. 発表標題 Biphasic ability of periosteum-derived cells between osteoblastgenesis and fibroblastgenesis in vitro.
3. 学会等名 EAO congress. Vienna, Austria. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 5.Quan Sun, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda
2. 発表標題 Comparison of gingival derived and bone marrow mesenchymal stem cells for osteogenesis
3. 学会等名 EAO congress. Vienna, Austria. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田恵美、中田秀美、山本麻衣子、春日井昇平、黒田真司.
2. 発表標題 ビスフォスフォネートの短期作用による骨芽細胞分化の可能性.
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会. 仙台
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	黒田 真司  (KURODA Shinji)  (50323689)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師    (12602)	