

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11797

研究課題名(和文) 頬脂肪由来幹細胞を用いた立体培養コンストラクトによる抜歯窩骨再生の試み

研究課題名(英文) Extraction tooth bone regeneration by adipose derived stem cell

研究代表者

黒田 真司 (Kuroda, Shinji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：50323689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪由来幹細胞は体内のあらゆる種類の脂肪組織に含まれているが、内臓脂肪に比較して、皮下脂肪組織により多くの幹細胞が含まれていることが報告されている。顎・口腔領域では、頬粘膜下の頬脂肪体が容易に採取できるが、脂肪由来幹細胞の骨再生への応用に関しては、まだその方法が確立されていない。脂肪由来幹細胞を立体培養し、三次元的な分化誘導を行うことで、より大きな組織再生が可能になると考えられる。本研究より、脂肪由来幹細胞・骨膜由来細胞の立体培養と三次元的分化誘導が可能であることが示された。また、共培養やLIPUS刺激により、これらの細胞の骨芽細胞分化誘導が促進されることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮下脂肪は全身的に浅層に存在し、摘出が容易で低侵襲であること、美容外科などの領域では簡便な方法で大量に吸引し、捨てられる組織でもあることなどから、再生療法への利用が期待されている。脂肪由来幹細胞は多分化能を持ち、様々な細胞への分化誘導が可能であるが、口腔内の抜歯窩再生においては骨膜や歯肉粘膜の再生も必須となる。そこで、本研究では、脂肪由来幹細胞の立体培養・三次元分化誘導とともに、口腔内の各種組織由来の幹細胞の特性とその分化誘導についても検討を行った。これらの成果により、自然な抜歯窩の治癒を促進する新しい形の再生療法が可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fat tissue in whole body contains adipose-derived stem cells (ASCs) and particularly subcutaneous fat tissue holds more stem cells than visceral fat. ASCs from buccal fat pad which can be harvested from oral cavity is one of the candidates for regenerative medicine. However, the protocol for using ASCs for bone regeneration of extraction socket hasn't been established yet. Three dimensional culture and differentiation will make a big impact on regenerative therapy with ASCs and other stem cells. In the present study, we isolated ASCs from murine buccal fat pad, periosteum-derived cells (PDCs) from murine calvarias periosteum, and gingiva-derived cells (GSCs) from murine palatal gingival tissue together with bone marrow cells from murine femur as a control. Our results suggested that ASCs, PDCs, and GSCs will differentiate into osteoblastic cells three dimensionally, and it can be enhanced by co-culture or LIPUS stimulation.

研究分野：インプラント・口腔再生医学分野

キーワード：脂肪由来幹細胞 骨膜由来幹細胞 歯肉由来幹細胞 立体培養

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂肪由来幹細胞は体内の皮下脂肪、内臓脂肪など、あらゆる種類の脂肪組織に含まれているが、内臓脂肪に比較して、皮下脂肪組織により多くの幹細胞が含まれていることが報告されている。皮下脂肪は全身的に浅層に存在し、摘出が容易で低侵襲であること、美容外科などの領域では簡便な方法で大量に吸引し、捨てられる組織でもあることなどから、再生療法への利用が期待されている。顎・口腔領域では、頬粘膜下の頬脂肪体が容易に採取できる。脂肪由来幹細胞は、線維芽細胞様の細胞形態を呈しているが、骨芽細胞に分化誘導できることを、以前の研究で報告した。既に頬脂肪体を採取して粘膜被覆等に使用することは臨床上で試みられているが、脂肪由来幹細胞の骨再生への応用に関しては、まだその方法が確立されていない。

### 2. 研究の目的

脂肪由来幹細胞を立体培養し、三次元的な分化誘導を行うことで、より大きな組織再生が可能になると考えられる。脂肪由来幹細胞は多分化能を持ち、様々な細胞への分化誘導が可能であるが、口腔内の抜歯窩再生においては骨膜や歯肉粘膜の再生も必須となる。そこで、本研究では、脂肪由来幹細胞の立体培養・三次元分化誘導とともに、口腔内の各種組織由来の幹細胞の特性とその分化誘導についても検討を行った。

### 3. 研究の方法

使用した細胞種は、脂肪由来幹細胞、骨膜由来細胞、歯肉由来細胞とコントロールとして使用した骨髄細胞と骨芽細胞で、脂肪由来幹細胞は4週齢雌、8週齢雌、リタイアマウス(雌)より採取し、骨膜由来細胞は4週齢雌マウスより採取した。歯肉由来細胞は6週齢雌マウス口蓋歯肉より単離した。骨髄細胞は、4週齢雌、6週齢雌、8週齢雌、リタイアマウス(雌)より採取し、骨芽細胞は新生仔マウス頭蓋骨より採取した。それぞれの細胞に関して、立体培養、三次元的分化誘導、共培養、LIPUS刺激などによる効果を検討した。また、bFGFの効果を検討した。

### 4. 研究成果

著しい骨吸収や骨欠損をもつ顎骨・歯槽骨では、歯科補綴治療に困難である。したがって、顎骨・歯槽骨の骨再生による獲得は効果的な歯科補綴治療をもたらすと考えられる。そこで、その骨再生における有効なソースとして口腔内組織由来細胞を用い、骨芽細胞分化誘導に関して研究した。

脂肪由来幹細胞・骨膜由来細胞・歯肉由来細胞に関して、平面培養あるいは立体培養において、骨芽細胞分化誘導が可能であることが示された。また、共培養やLIPUS刺激により、これらの細胞の骨芽細胞分化誘導が促進されることも明らかにした。

## 脂肪由来幹細胞

脂肪組織が含有する幹細胞の濃度は、骨髄が含有するそれと比較すると100倍ほどを示す報告がある。そこで、口腔内において比較的獲得が容易である頬脂肪体が、将来的に幹細胞のソースである候補として研究を展開するため、本研究では小動物の皮下脂肪組織由来幹細胞に関して分化誘導の可能性を実験した。

マウス脂肪由来幹細胞(ASC)にBMP2をコードするアデノウイルスベクターAdenoX-bmp2を感染させ、細胞増殖および骨芽細胞分化に関して比較検討を行ったところ、ASCの細胞増殖はBMSCと比較して高く、特にCD90およびCD105が陽性であるASCではBMP2の遺伝子導入によって著しい石灰化結節の形成がみられた。以上から、CD90(+)/CD105(+ )であるASCは、骨芽細胞への分化誘導において強い骨芽細胞分化能を示してきた。そして本研究では、CD11b(+ )をもつ単球と共存培養をすることによって、培養ASCのアルカリフォスファターゼの発現および石灰化沈着が促進することが確認された。

## 骨膜由来細胞

骨膜細胞の骨再生能を明らかにするため、マウス頭蓋骨骨膜のコラーゲン3次元培養による骨芽細胞分化を観察したところ、石灰化結節の形成が亢進した。また、大腿骨骨髓腔に、コラーゲンゲルをキャリアーに用いてCD90(+ )骨膜細胞を注入したところ、骨再生が促進した。以上から、骨膜細胞のコラーゲン3次元培養による増殖促進と足場としての有効性、およびCD90(+ )骨膜細胞は増殖能および骨形成能が示唆された。つぎに骨折などの治癒促進の目的で用いられている低出力超音波パルス(LIPUS)を、培養骨膜由来細胞に照射すると、培養骨膜由来細胞が骨芽細胞、脂肪細胞、および軟骨細胞への分化能を確認した。とくにLIPUS照射によって、骨芽細胞分化では骨膜由来細胞のALP活性および石灰化結節形成の促進と骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現の上昇が顕著に認められ、LIPUSが骨膜由来細胞の増殖および骨芽細胞分化を促進した。

## 歯肉由来細胞

ヒト口腔内組織より安全で容易に獲得可能であるソースとして、歯肉組織は最適であると認識されている。一方で、歯肉組織由来細胞の効果的な骨芽細胞分化に関して明らかとなっていなかった。そこで、小動物の歯肉組織を用いて実験を行った。

マウス歯肉由来細胞を単離してその幹細胞としての特性を調べた結果、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞に分化する能力を保持していた。歯肉由来培養細胞は高い増殖能を示し、骨芽細胞への分化誘導ではアルカリフォスファターゼ陽性細胞と石灰化結節が多く出現し、骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現が顕著であった。以上から、歯肉由来間葉系幹細胞が、細胞分化能、特に骨芽細胞分化能を保持する細胞ソースであることが示唆された。

## 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 Wai Myo Maung, Hidemi Nakata, Motoi Miura, Munemitsu Miyasaka, You-Kyoung Kim, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda.	4. 巻 0(JA)
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） 10.11607/jomi.4957	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 2020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, Maiko Yamamoto, You-kyoung Kim, Munemitsu Miyasaka, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of Low-intensity pulsed ultrasound in osteogenic differentiation of murine periosteum-derived cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J.Biointegration	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 -
2. 論文標題 Fibroblast and osteoblast differentiation characteristics of periosteum-derived cells in mouse calvaria.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J.Biointegration	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 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 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 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 9.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 10.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) 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 11.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

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5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 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 Emi Okada, Hidemi Nakata, Maiko Yamamoto, Shohei Kasugai, Shinji Kuroda.
2. 発表標題 Feasibility of indirect osteoblast differentiation by liposomal clodronate.
3. 学会等名 (iLIM-2) ICMaSS. Nagoya. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 7. 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	中田 秀美  (NAKATA HIDE MI)  (30451967)	東京医科歯科大学・歯学部附属病院・助教   (12602)	
研究 分担者	春日井 昇平  (KASUGAI SHOHEI)  (70161049)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授   (12602)	