

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2007～2009  
課題番号：19592288  
研究課題名（和文） 脂肪組織の間葉系幹細胞を用いて組織工学的に作製した培養骨による顎骨再生をめざして  
研究課題名（英文） Bone engineering with adipose-derived mesenchymal stem cells for jaw bone regeneration  
研究代表者  
小野 由起子 (ONO YUKIKO)  
新潟大学・医歯学総合病院・助教  
研究者番号：80345511

研究成果の概要（和文）：骨髄よりも採取しやすいラットの脂肪組織から間葉系幹細胞を分離して多孔性  $\beta$ -TCP ブロックに播種し、骨分化誘導培地で培養して細胞-基材複合体を作製した。それをラットの背部皮下に移植して経時的に試料を採取し、組織学的に観察したところ、骨の形成が少量ながら認められた。骨髄由来間葉系幹細胞を用いて作製した細胞-基材複合体をラットの皮下に移植した場合と比較すると、骨形成量はわずかであった。

研究成果の概要（英文）：Adipose tissue can be obtained more easily than bone marrow. Adipose-derived mesenchymal stem cells were harvested from inguinal fat pads of rats, seeded in porous  $\beta$ -TCP blocks, and incubated in osteogenic induction medium. Adipose-derived stem cells/ $\beta$ -TCP block composites were implanted subcutaneously and harvested for histological analysis. A small amount of newly formed bone was seen at the surfaces of the pores. Newly bone formation in adipose-derived stem cells/ $\beta$ -TCP block composites was less than bone marrow-derived stem cells/ $\beta$ -TCP block composites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	900,000	270,000	1,170,000
20 年度	800,000	240,000	1,040,000
21 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：脂肪 組織工学 再生医療 骨 培養

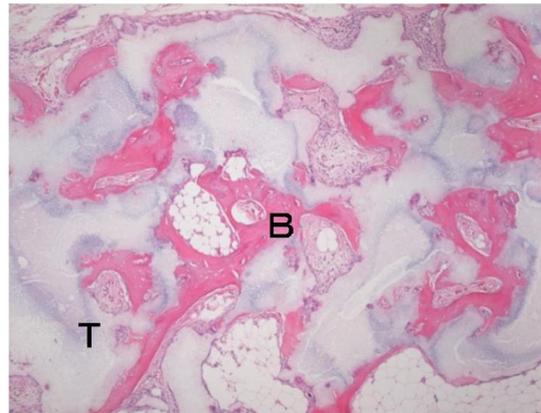
## 1. 研究開始当初の背景

顎顔面口腔外科領域では、腫瘍、炎症性疾患などの病変を外科的に切除した後に広範囲にわたる骨欠損が生じることが多く、その場合しばしば顎骨再建が必要となる。このような症例に対して現在では腸骨、腓骨、肩甲骨などの自家骨移植が主流であるが、自家骨移植は拒絶反応がないという利点があるものの、採取部位と採取量が制限され、しかも正常組織に著しい侵襲を加えるため患者の負担が大きいという欠点がある。そのため、自家骨の代替材料として組織工学的手法により作製した培養骨を用いることができれば、採取部位と採取量の制限はなくなり、手術侵襲も大幅に軽減できると思われる。しかし、現在歯科口腔外科領域においては国内外いずれにおいても、培養骨は歯周病の治療やインプラント治療の際の上顎洞挙上必要症例などの小さな歯槽骨欠損部に臨床応用されるのみで、大きな顎骨欠損部に移植可能な培養骨はいまだ開発されていない。大きな顎骨欠損の再建に用いるためには、培養骨は顎骨形態を保つだけの力学的強度を有し、かつその形態を保ちながら徐々に骨に置換されていくことが必要で、さらに骨形成後長期間にわたりその形態と骨質が維持されることも必要であると考えられる。

そこで広範囲にわたる顎骨欠損部に臨床応用することを想定し、その基礎研究として、生体内で経時的に吸収される生体親和性・骨伝導能に優れた多孔性 $\beta$ -リン酸三カルシウム( $\beta$ -TCP)ブロックを足場に用い、そこにラット大腿骨から採取した骨髄細胞を播種して細胞-基材複合体を作製した。下顎骨区域切除術後に生じるような広範囲の顎骨欠損部には周囲に骨がないため、同部への骨移植はむしろ異所性移植に近いと考え、作製した培養骨をラットの背部皮下に移植するモデルを用いて骨が形成されていく過程における骨芽細胞と破骨細胞の分布について組織学的に検索した。その結果、骨芽細胞に分化誘導した骨髄細胞と多孔性 $\beta$ -TCPブロックとの複合体は異所性に活発な骨形成能をもち、移植後12週目の新生骨では骨のリモデリングも生じていることが示された。

また、破骨細胞は $\beta$ -TCPの表面に多数存在していた。そのため、本複合体による骨形成には骨芽細胞に分化した骨髄細胞と破骨細胞が関与していると考えられた。

しかしながらこの研究モデルを臨床応用するならば、骨髄細胞はおもに腸骨から採取しなければならず、自家骨移植をする場合に骨を採取するよりは侵襲は少ないとはいえ、



ヘマトキシリンエオジン染色

$\beta$ -TCPブロック表面に骨形成が広範囲にみられる

B:骨 T: $\beta$ -TCP

やはりある程度の侵襲を加えることになる。一方、脂肪組織のなかにも未分化な間葉系幹細胞が含まれており、培養条件によってさまざまな細胞に分化させることができ、骨芽細胞にも分化させることができるという報告がある。口腔内には頬脂肪体という容易に脂肪を採取できる組織があるので、脂肪組織から間葉系幹細胞を分離してそれを骨芽細胞に分化させることができれば、わずかな侵襲で容易に細胞-基材複合体を作製することができる。

## 2. 研究の目的

脂肪組織から間葉系幹細胞を分離し、それを骨芽細胞に分化させて $\beta$ -TCPなどの生体材料と組み合わせ、広範囲にわたる顎骨欠損部への移植に適した細胞-基材複合体を作製することが目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 脂肪組織から採取した間葉系幹細胞を用いた培養骨を作製し、ラット背部皮下に移植して骨形成能を確認する

### ①脂肪組織から間葉系幹細胞を採取し、骨芽細胞へ分化させる

ラットの腹部脂肪組織から間葉系幹細胞を採取し、基本培地にデキサメタゾン、 $\beta$ グリセロリン酸、アスコルビン酸を添加して骨芽細胞への分化を誘導しながら培養する。骨芽細胞への分化はアルカリホスファターゼ活性の測定や、アルカリホスファターゼ染色、アリザリンレッド染色、フォンコッサ染色などで確認する。

②細胞の足場となる生体材料に細胞を播種して培養骨を作製する

経過時的に吸収され、生体親和性、骨伝導能に優れた多孔性 $\beta$ -TCPブロックを使用し、気孔率の異なるものをいくつか用いる。

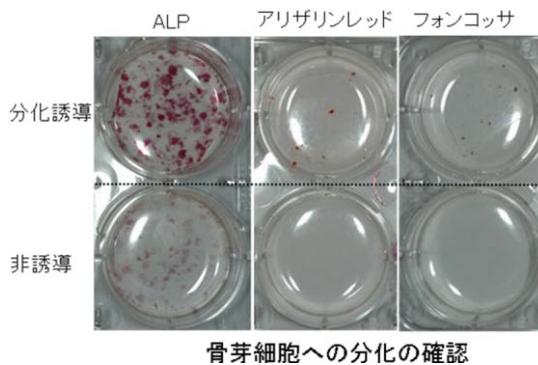
③ラットの背部皮下に移植する

分化誘導群：脂肪組織の間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導して作製した培養骨を移植

非誘導群：脂肪組織の間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導せずに作製した複合体を移植

コントロール群：生体材料単体を移植

→経時的に屠殺して移植部を採取して標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色、アルカリフォスファターゼ染色、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ染色等をおこない、組織学的に観察して骨形成の程度を比較する。



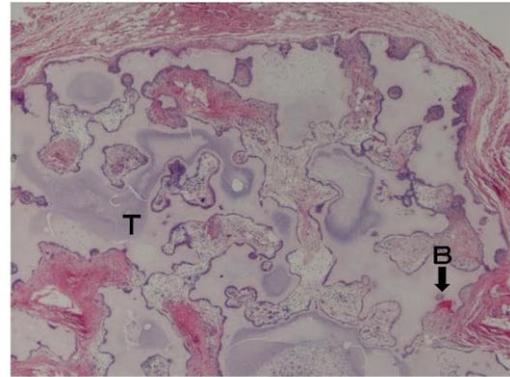
(2) 脂肪組織から採取した間葉系幹細胞を用いて作製した細胞-基材複合体と、骨髄から採取した間葉系幹細胞を用いて作製した複合体をそれぞれラットの背部皮下に移植して、骨形成の程度を比較する。

→経時的に屠殺して移植部を採取して標本を作製し、組織学的に観察して骨形成の程度を比較する。

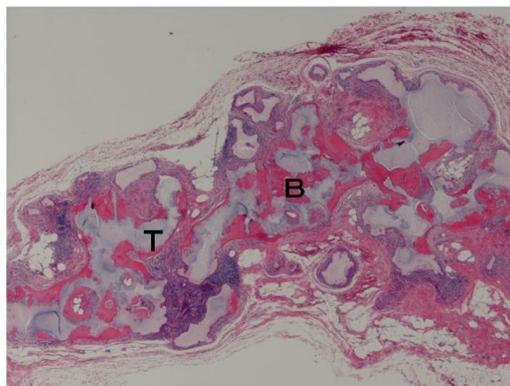
#### 4. 研究成果

脂肪組織由来間葉系幹細胞をラットの脂肪組織から採取し、骨芽細胞に分化誘導することができた。さらに、 $\beta$ -TCP に播種して複合体を作製し、それをラットの皮下に移植して経過的に試料を採取し、組織学的に観察したところ、骨の形成はわずかに認められたが、骨髄由来間葉系幹細胞を用いた複合体と比較するとその量はわずかであった。

脂肪組織由来幹細胞の骨芽細胞への分化誘導の至適条件は、骨髄細胞由来幹細胞のそれとは異なる可能性がある。さらに、未分化幹細胞の骨芽細胞への分化誘導能をもつ骨形成たんぱく (BMP-2, BMP-7)、骨芽細胞の増殖促進能をもつ線維芽細胞増殖因子



脂肪組織由来間葉系幹細胞- $\beta$ -TCPブロック複合体  
ヘマトキシリンエオジン染色  
 $\beta$ -TCPブロック表面にわずかに骨形成がみられる  
B:骨 T: $\beta$ -TCP



骨髄由来間葉系幹細胞- $\beta$ -TCPブロック複合体  
ヘマトキシリンエオジン染色  
 $\beta$ -TCPブロック表面に骨形成が広範囲にみられる  
B:骨 T: $\beta$ -TCP

(b-FGF) の添加や、骨折部の骨癒合を促進するといわれている低出力超音波パルスの培養細胞への照射により、脂肪組織由来幹細胞-基材複合体の骨形成をさらに促進できる可能性がある。

そこで、今後は脂肪組織由来幹細胞の骨芽細胞への分化誘導に用いる試薬の量や培養期間などの培養条件を詳細に検討し、移植した時に骨髄由来幹細胞を用いたときと同程度、もしくはそれ以上に骨が形成される脂肪組織由来幹細胞-基材複合体を作製する方法を明らかにしていきたい。また、骨形成たんぱくや線維芽細胞増殖因子を添加したり、低出力超音波パルス照射をおこなうことにより、脂肪組織由来幹細胞の骨芽細胞への分化、そして細胞-基材複合体の骨形成がさらに促進されることを確認し、どの因子が最も骨形成を促進するのかを明らかにしていきたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕（計1件）

骨髄細胞・多孔性 $\beta$ -TCPブロック複合体による骨形成に関する組織学的検討  
小野由起子、泉直也、芳澤享子、齊藤力  
日本口腔外科学会雑誌、査読有、53巻、8号、  
2007、468-480

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野 由起子 (ONO YUKIKO)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：80345511

### (2) 研究分担者

芳澤 享子 (YOSHIZAWA MICHIKO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60303137

泉 直也 (IZUMI NAOYA)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：10361908