

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19244

研究課題名(和文) 脂肪組織由来再生細胞による歯科領域の硬組織再生技術の確立

研究課題名(英文) Hard tissue regeneration using transplantation of adipose tissue-derived regenerative cells

研究代表者

糸瀬 昌克 (Masakatsu, Itose)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：30806576

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)：骨・軟骨欠損の改善を目的に、脂肪組織由来再生細胞(ADRCs)による硬組織再生を検討した。ラット脂肪組織から単離したADRCsは、骨芽細胞様細胞あるいは軟骨細胞様細胞へ分化した。関節円板あるいは顎関節の損傷を想定し、半月板を部分切除したラット膝関節へADRCsを注入したアテロコラーゲンスポンジを移植した。スポンジ単体に比べてADRCsを注入したアテロコラーゲンスポンジを移植すると、軟骨様組織の修復が向上した。動的粘弾性試験から、再生半月板は高い強度と低い粘弾性を有することがわかり、本来の半月板に必要な構造と機能を保持した。ADRCsは、硬組織再生治療の細胞ソースになり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪組織から単離したADRCsは、骨芽細胞様細胞や軟骨細胞様細胞へと分化できる多分化能を有し、軟骨修復に大きく寄与した。骨髄などに比べ低侵襲かつ移植時に新鮮な細胞が十分量採取できるADRCsは、硬組織再生医療の細胞ソースとして有用と考える。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue-derived regenerated cells (ADRCs) were investigated for the aim of improving bone and cartilage defects. ADRCs had pluripotent capacity of differentiating into osteoblast-like cells and chondrocyte-like cells. Assuming a model of articular disc or temporomandibular joint injury, an atelocollagen sponge infused with ADRCs was transplanted into a rat knee joint in which the medial meniscus was partially resected. Compared with the sponge alone, the atelocollagen sponge with ADRCs improved the repair of cartilage-like tissue. In dynamic mechanical analysis, higher elastic moduli and lower fluid permeability of regenerated meniscal tissue demonstrated a favorable structure-function relationship required for native menisci. ADRCs will be useful in future clinical cell-based therapy strategies, including as a cell source for reconstruction of hard tissue.

研究分野：口腔外科学

キーワード：脂肪組織由来再生細胞 軟骨組織 ADRCs

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

外科的手術や歯周疾患などによる顎骨欠損、それに伴う機能障害は QOL 低下に大きく影響し、過剰な咬合力、外傷や加齢によって生じる顎関節関節円板の断裂・穿孔は、全身状態に影響することもある。それら組織欠損を修復するため、従来の外科的移植治療のほかに、近年は未分化間葉系幹細胞を利用した骨再生療法が研究されている(Gurevitch O, *Stem Cells* 21:p588, 2003)。本研究で用いた脂肪組織由来再生細胞(ADRCs)は、多様な細胞系譜へ分化できる脂肪組織中に存在する細胞集団であり(Hedrick M. et al., *EuroIntervention* 2:p395, 2006)脂肪由来幹細胞(ASCs)を主体として、その他血管内皮前駆細胞、平滑筋細胞、マクロファージなど幾つかの細胞を含む(Lin K, *Cytotherapy* 10:p417, 2008)。手術室で患者から採取した脂肪組織を即座に特殊な高速遠心分離器にかけることで、閉鎖空間内で ADRCs の分離・濃縮の全ての行程が完了するため ASCs に比べて様々な利点がある。以下に ADRCs 有用性を示す。

- 1) 大量採取が可能のため培養による細胞増殖の必要がない。
- 2) 高速遠心分離器で ADRCs を濃縮するためセルソーティングによる細胞純化の必要がない。
- 3) 閉鎖空間全ての行程が完了するため感染のリスクが低い。
- 4) 脂肪組織から高速遠心分離器で ADRCs を高密度に濃縮できるため、細胞プロセッシングセンター(CPC)等施設が不要である。
- 5) 手術後即座(約 1 時間)に ADRCs を得られるため細胞が新鮮である。
- 6) 脂肪組織採取と得られた ADRCs の患部への移植が同時に手術できるため、患者負担が軽減できる。
- 7) 多分化能をもつ脂肪由来幹細胞(ASCs)と同等の分化能を有し、かつ豊富に組織内に存在して(Zuk PA, *Mol Biol Cell* 13:p4279, 2002)、組織から分離するまでの行程が ASCs に比べて煩雑でない。
- 8) 口腔領域においても口腔粘膜や、特に頬部脂肪体などからは十分に採取できるため、歯科臨床で実施可能である。
- 9) 医科では虚血性心疾患や (Houtgraaf JH, *J Am Coll Cardiol* 59:p539, 2012)、腹圧性尿失禁症(Gotoh M, *Int J Urol* 21:p294, 2014)など臨床応用されていることから、安全性も担保されている。

これら多くの利点をもった ADRCs による、細胞分化と硬組織再生能を解析する。

2. 研究の目的

頬部脂肪体など口腔領域に存在する ADRCs を、顎骨欠損、関節円板損傷や歯槽骨欠如へ移植して骨軟骨を修復する、骨髄からの間葉系幹細胞移植に比べて侵襲性の低い硬組織再生法を確立する。本研究で ADRCs の分化誘導能の解析と、欠損した軟骨組織へ ADRCs を移植して、修復した軟骨組織の量的および質的な有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 8~10 週齢の雄 SD ラットの腹部から鼠蹊部の皮下脂肪組織を採取し、酵素処理(セレーズ リエージェント: サイトリ・セラピューティクス社)で分散した ADRCs を回収した。フローサイトメーター(FACSVersa™, BD 社)にて、回収した細胞の細胞表面マーカーを解析した。

(2) 種々の誘導培地で ADRCs を 3 週間培養後に骨芽細胞への誘導は alkaline phosphatase (ALP) 活性染色、石灰化能は Alizarin red 染色と von Kossa 染色、軟骨細胞への誘導は Alcian Blue 染色で評価した。

(3) ラット内側半月板の前方半側を切除後、ADRCs 混入のアテロコラーゲンスポンジを切除部位に移植して、12 週後に HE 染色、Toluidine Blue 染色と Ⅰ型コラーゲンの免疫組織染色から ADRCs の再生能を評価した。

(4) 全身の細胞が緑色蛍光タンパク質(GFP)で標識された SD-Tg(CAG-EGFP) グリーンラットの ADRCs を、ヌードラット(F344/NJc1-*rnu/rnu*)の半月板切除部に移植して欠損部位への定着を GFP の免疫組織染色(anti-GFP antibody; Thermo Fisher Scientific)を指標に蛍光顕微鏡(FV1200 BX61W1 confocal laser scanning microscope; OLYMPUS)で観察した。

(5) ADRCs 移植によってできた修復半月板と本来の半月板の物理的特性を比較するため、ナノインデンテーション法を用いて接触特性と粘弾性を測定した。

4. 研究成果

当初、関節円板損傷または顎関節損傷のモデル動物作成に取り組んだが、ラット顎関節は極めて微細かつ術野確保が困難で、技術的要因に左右すると共に、個体差によるばらつきが大きく再現性を得られなかったことから、軟骨組織である半月板について組織形態学アプローチの他に物理化学的に解析した。

(1) ラット脂肪組織から分離した ADRCs をフローサイトメーターで解析すると骨髄に比べ幹細胞集団の割合が高く、脂肪由来幹細胞の指標である CD31(-), CD34(+), CD45(-)は全細胞数のおよそ 4.0%存在した。

(2) 培養条件によって ADRCs は、骨芽細胞様細胞あるいは軟骨細胞様細胞へと分化した。

(3) ADRCs を半月板損傷モデルに移植すると組織が修復された。ラット内側半月板の前方半側を切除した半月板損傷モデルの移植実験から、ADRCs 混入コラーゲンスポンジを移植した半月板は、スポンジ単独移植に比べて内側半月板前方の組織修復が亢進した。前方欠損部に線維性軟骨とみられる組織修復が進み、Ⅱ型コラーゲンの発現と Toluidine Blue 染色陽性の領域が観察された。

(4) 移植した ADRCs は修復した半月板に定着した。グリーンラット由来 GFP 陽性 ADRCs を移植すると、GFP 陽性細胞は移植相当部に局在した。さらに、Ⅱ型コラーゲンと GFP の二重免疫組織染色の所見から、術後 4 週では Ⅱ型コラーゲン陽性細胞は確認できなかったが、12 週後になると、移植した一部の GFP 陽性 ADRCs は Ⅱ型コラーゲン陽性を示した。

(5) ナノインデンテーション法を用いた動的粘弾性試験から、再生した半月板のより高い強度と低い粘弾性が認められた。本来の半月板に必要な構造と機能をもつ再生半月板が再現された。

ADRCs は骨髄などに比べ低侵襲かつ移植時に新鮮な細胞が十分量採取できることから、硬組織再生医療の細胞ソースになり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 葭葉清香、伏居玲香、糸瀬昌克、八十篤聡、代田達夫	4. 巻 69
2. 論文標題 急性期病院における周術期口腔機能管理の現状と有用性 - 術後合併症に対する影響とリスク評価 -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 22-28
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 葭葉清香、渡辺仁資、伏居玲香、糸瀬昌克、長崎理佳、八十篤聡、代田達夫	4. 巻 79
2. 論文標題 昭和大学横浜市北部病院 歯科・歯科口腔外科 開設後 8 年間における患者の臨床統計学的観察	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 昭和学会雑誌	6. 最初と最後の頁 757-764
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugisaki R, Miyamoto Y, Yoshimura K, Sasa K, Kaneko K, Tanaka M, Itose M, Inoue S, Baba K, Shirota T, Chikazu D, Kamijo R.	4. 巻 132
2. 論文標題 Possible involvement of elastase in enhanced osteoclast differentiation by neutrophils through degradation of osteoprotegerin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2019.115216.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzawa Tetsuo, Yoshida Hiroshi, Takahashi Masahiro, Itose Masakatsu, Takimoto Reiko, Sasama Yuji, Tanaka Motohiro, Ikezaki Kaori, Shirora Tatsuo, Maki Koutaro, Kamijo Ruytaro	4. 巻 17
2. 論文標題 Prospects of neural crest derived cells from oral and dentofacial tissues for application in regenerative medicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 115 ~ 125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/osi2.1064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 葭葉 清香、糸瀬 昌克、伏居 玲香、代田 達夫
2. 発表標題 昭和大学横浜市北部病院における周術期口腔機能管理の現状とその効果について
3. 学会等名 54回 NPO法人日本口腔科学会関東地方部会
4. 発表年 2020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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------