

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592210

研究課題名（和文） 低侵襲な顎骨再生をめざして一脂肪組織由来幹細胞を効率よく骨芽細胞に分化させる一

研究課題名（英文） Minimally invasive jawbone regeneration with adipose-derived mesenchymal stem cells

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）：

ラットの脂肪組織由来幹細胞を分離し、培地に加える添加剤の濃度、種類を検討したり、低出力超音波パルス照射を行うなどして骨芽細胞への分化を最も誘導する培養条件を明らかにした。そして脂肪組織由来幹細胞を多孔性β-TCPブロックに播種し、骨芽細胞への分化誘導至適条件下で培養して作製した細胞-基材複合体をラットの背部皮下に移植し、組織学的に観察したところこれまでの培養条件よりは骨の形成量はやや増加したものの、骨髄由来幹細胞を用いて作製した複合体と比較すると、その量はわずかであった。

研究成果の概要（英文）：

Adipose-derived mesenchymal stem cells were cultured in various osteogenic induction conditions, and the best culture condition was revealed. They were seeded in porous β-TCP blocks, and incubated in the best osteogenic induction condition. Adipose-derived stem cells/β-TCP block composites were implanted subcutaneously and harvested for histological analysis. Amount of newly formed bone in adipose-derived stem cells/β-TCP block composites increased slightly more than ever before, however it was less than that in bone marrow-derived stem cells/β-TCP block composites.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：口腔外科学一般

1. 研究開始当初の背景  
顎顔面口腔外科領域では、腫瘍などの病変を

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、その場合には顎骨再

建が必要となる。顎骨再建には腸骨、腓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骨芽細胞-基材複合体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。しかし、現在歯科口腔外科領域では国内外いずれにおいても、骨芽細胞-基材複合体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ているものの、大きな顎骨欠損部に移植可能な細胞-基材複合体はいまだ開発されていない。

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、培養し、骨芽細胞-基材複合体を作製し、ラット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由来幹細胞と破骨細胞が関与していると考えられた。

ただ、臨床応用する場合には骨髄細胞はおもに腸骨から採取しなければならず、骨を採取するよりは侵襲は少ないとはいえ、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骨芽細胞-基材複合体を作製することができる。

そこで、脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いて骨芽細胞- $\beta$ -TCPブロック複合体を作製し、ラット背部皮下に移植して組織学的に検索したところ、骨の形成は認められたが、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や適した基材は、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(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 of 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。

## 2. 研究の目的

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する。また、培養条件だけでなく用いる基材についても検討し、骨を形成する上で脂肪組織由来幹細胞に最も適した基材を明らかにする。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する。

## 3. 研究の方法

(1) 脂肪組織から間葉系幹細胞を採取し、骨芽細胞へ分化誘導するための至適条件を検索す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。このとき、添加剤の濃度、培養期間を変えていくつかの培養条件を設定する。骨芽細胞への分化はアルカリホスファターゼ(ALP)活性の測定、ALP染色、アリザリンレッド染色、フォンコッサ染色で確認し、骨芽細胞への分化を最も誘導する培養条件を検索する。このとき、ラットの大腿骨骨髄から採取した間葉系幹細胞も同じ条件で培養し、骨芽細胞への分化の程度を比較する。

(2) 細胞の足場、基材となる生体材料に、(1)で見出した至適条件で骨芽細胞に分化誘導した脂肪組織由来幹細胞を播種し、細胞-基材複合体を作製する。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ブロックを基材として使用し、気孔率の異なる $\beta$ -TCPブロックを数種類用いる。

(3) (2)で作製した細胞-基材複合体をラットの背部皮下に移植して骨形成能を比較する

実験群1：脂肪組織由来の間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導して作製した細胞-基材複合体

実験群 2：骨髄組織由来の間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導して作製した細胞-基材複合体

コントロール群：多孔性 $\beta$ -TCP ブロック単体

これを、それぞれラット背部皮下に移植する。

→移植後経時的に屠殺し、移植部を採取して標本作製し、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をおこない、組織学的に観察して骨形成の程度や骨芽細胞、破骨細胞の分布を比較する。

(4)(1)で見出した至適条件下で、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)や骨芽細胞の増殖促進能をもつ線維芽細胞増殖因子

(b-FGF)を添加、あるいは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照射をおこなって作製した細胞-基材複合体をラット背部皮下に移植し、骨形成の程度を確認する。

骨形成たんぱくや線維芽細胞増殖因子を添加して作製した細胞-基材複合体と添加せずに作製した複合体、または培養中に低出力超音波パルス照射をおこなった複合体とおこなわなかった複合体をそれぞれラット背部皮下に移植し、経時的に屠殺して移植部を採取して標本作製し、組織学的に観察して骨形成の程度を比較する。さらに、添加剤の投与量やパルス照射の出力を変えて骨形成の程度を比較する。

#### 4. 研究成果

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添加するデキサメタゾン、 $\beta$ グリセロリン酸、アスコルビン酸の濃度や培養期間を変えて骨芽細胞への分化を最も誘導する培養条件を明らかにした。脂肪組織由来幹細胞を $\beta$ -TCPブロックに播種して明らかになった至適条件下で骨芽細胞に分化誘導して作製した細胞- $\beta$ -TCP複合体をラット背部皮下に移植して組織学的に観察したところ、これまでの培養条件で作製した複合体よりも骨の形成量は増加したものの、骨髄由来幹細胞を用いて作製した複合体と比較するとその量は著しく少なかった。そこで至適濃度のデキサメタゾン、 $\beta$ グリセロリン酸、アスコルビン酸を加えた培地に、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や骨芽細胞の増殖促進能をもつ線維芽細胞増殖因子を添加、ないし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照射をおこない、骨芽細胞への分化を最も誘導する培養条件を明らかにした。

さらに脂肪組織由来幹細胞を多孔性 $\beta$ -TCPブロックに播種し、明らかにした骨芽細胞への分化誘導至適条件下で培養して作製した細胞-基材複合体をラットの背部皮下に移植し、組織学的に観察したところ、これまでの培養条件よりは骨の形成量はやや増加したものの、骨髄由来幹細胞を用いて作製した複合体と比較するとその量はわずかであった。

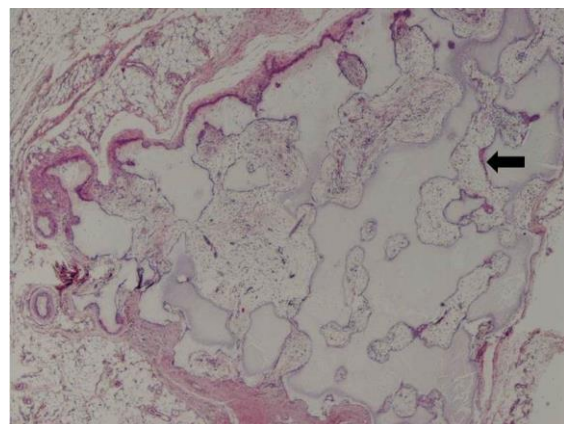


対照：骨髄由来幹細胞

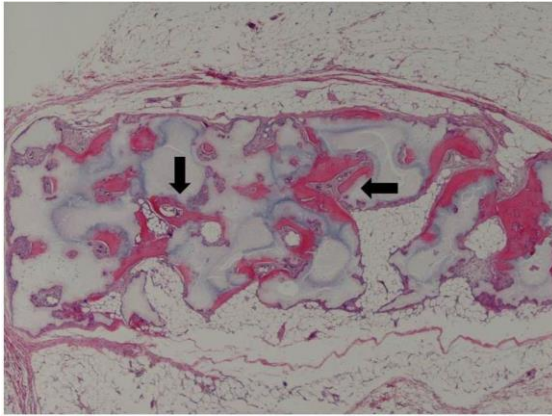


さまざまな培養条件下での脂肪由来幹細胞の骨芽細胞への分化の確認(ALP染色)

脂肪組織由来間葉系幹細胞は骨髄由来間葉系幹細胞と比較して採取は容易だが、培養条件をさまざまに工夫しても骨髄由来幹細胞のような骨形成を促すことは難しかった。ヒト脂肪組織由来幹細胞を用いて作製した細胞-基材複合体を用いた報告ではもっと多量の新生骨が形成されているので、今後は動物種を変更したり、ヒト脂肪組織由来幹細胞を用いて今回の培養条件で細胞-基材複合体を作製し、骨形成量を比較したい。



脂肪由来幹細胞- $\beta$ -TCPブロック複合体 HE染色  
 $\beta$ -TCPブロック表面にわずかに骨形成が認められる



骨髄由来幹細胞-B-TCPブロック複合体 HE染色  
B-TCPブロック表面に骨形成が広範囲に認められる

## 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)

1. 小島 拓, 芳澤 享子, 小野 由起子, 鈴木 晶子, 坂上 直子, 長谷川 智香, 網塚 憲生, 織田 公光, 前田 健康, 齊藤 力: 骨再生バイオマテリアルと間葉系幹細胞併用による骨再生向上の解析 培養技術を応用した新しい骨再生法の展開. 日本歯科医学会誌 31 巻 : 34-38, 2012.03

[学会発表] (計1件)

1. 小島 拓, 芳澤 享子, 小野 由起子, 坂上 直子, 船山 昭典, 三上 俊彦, 齊藤 力: 骨髄細胞・多孔性 $\beta$ -TCPブロック複合体による骨増生の評価. 第15回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会, 2011年12月4日、千葉

## 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

(H23→H24 : 連携研究者)