

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861759

研究課題名(和文)脱分化脂肪細胞を用いた機能的唾液腺再生

研究課題名(英文)Functional salivary gland regeneration using dedifferentiated fat cells

研究代表者

岸本 直隆(KISHIMOTO, Naotaka)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：50610911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔外科手術時に採取し、術後廃棄予定の脂肪組織(頬脂肪体)をコラゲナーゼ溶液で処理した。その後脂肪組織の浮力を利用した天井培養法を行い、脱分化脂肪細胞を獲得した。脱分化脂肪細胞を培地中で増殖させ、フローサイトメトリーにて細胞表面抗原の解析を行った。脱分化脂肪細胞はStro-1、CD44、CD90、CD105、CD166陽性であり、CD19、CD45、CD106、CD146陰性であった。またGFP遺伝子改変マウスから脂肪組織を採取し、天井培養法にて脱分化脂肪細胞を獲得した。蛍光顕微鏡下でマウス由来脱分化脂肪細胞の形態を評価した。

研究成果の概要(英文)：A human buccal fat pad (BFP) was obtained from a patient, who underwent oral and maxillofacial surgery. BFP was dissociated in a collagenase solution. We isolated dedifferentiated fat (DFAT) cells using the "ceiling culture method". This method used the adipocytes' characteristic that they have buoyancy. DFAT cells were passaged and used for flow cytometric analysis. DFAT cells were positive for Stro-1, CD44, CD90, CD105, CD166, and negative for CD19, CD45, CD106, CD146. We also obtained DFAT cells from GFP transgenic mice using the "ceiling culture method". The form of DFAT cells derived from GFP transgenic mice were evaluated using a fluorescence microscope.

研究分野：組織工学

キーワード：再生医療 組織工学 脱分化脂肪細胞 幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌に対する外科手術や放射線療法、Sjögren 症候群などによって起こる口腔乾燥症(ドライマウス)は口腔内の不快感、齲蝕、歯周病、咀嚼・嚥下障害など、生活の質を左右する要因となる。ドライマウスの治療としては対症療法が主流であり、その根治的治療の開発が今後の急務となっている。

近年、再生医療の発展に伴い、骨髄間質細胞、脂肪組織由来幹細胞など様々な幹細胞を用いた唾液腺再生の研究が行われるようになってきた。しかし、骨髄間質細胞を採取するためには骨髄穿刺が必要であり、採取に伴う侵襲が大きい。一方、脂肪組織由来幹細胞は皮下脂肪を少量採取することで樹立可能であり、より臨床応用に適した幹細胞と言える。しかし、どちらの細胞も骨髄また脂肪組織中においてはマイナーな細胞であり、樹立された幹細胞は不均一な細胞集団である。臨床応用における安全性の観点から考えると移植に用いる細胞は純度が高い細胞集団(均一な細胞集団)であることが望ましい。

### 2. 研究の目的

脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells : DFAT cells) は低侵襲に樹立可能な細胞集団であり、高い増殖能と多分化能を有することから再生医療用ドナー細胞として有用である。また DFAT cells は非常に純度が高いことから、細胞集団に含まれる未分化な細胞の割合が高く、骨髄間質細胞や脂肪組織由来幹細胞と比較して様々な組織の細胞へ分化する能力が高い可能性が示唆されている。本研究の目的はヒト頬脂肪体から樹立した DFAT cells の唾液腺障害モデル(ヌードマウス)に対する唾液腺再生能を評価することである。

### 3. 研究の方法

ヒト頬脂肪体から DFAT cells を樹立し、フローサイトメリーにて細胞表面抗原の解析を行う。次に放射線照射によるヌードマウス

唾液腺障害モデル顎下腺へ DFAT cells を移植(局所注入)する。唾液総量、アミラーゼ活性の測定など唾液腺機能の再生能を評価し、次に H-E 染色、免疫組織化学による組織学的な唾液腺再生能を評価する。

### 4. 研究成果

(1) 口腔外科手術時に切除され、術後廃棄予定の頬脂肪体を採取(約 1g)し、細切後、コラゲナーゼ溶液中で 37 °C、振盪下で 1 時間処理した。浮遊した細胞を採取し、さらに遠心分離操作を行うことで浮遊する成熟脂肪細胞と沈殿するストローマ分画に分けた。遠心分離操作を数回繰り返すことで、ほとんど成熟脂肪細胞のみで構成される純度の高い細胞集団を獲得することが可能であった。それら純度の高い細胞集団を通常培地 (DMEM + 20%FBS) で完全に満たされた 25 cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、油滴を含み浮遊する成熟脂肪細胞がフラスコ内側の天井表面に接着するようフラスコの接着面(本来の底面)を上方にして、37°C、5%CO<sub>2</sub> の環境下で培養した(天井培養法、図 1)。この操作によって DFAT cells を獲得した。

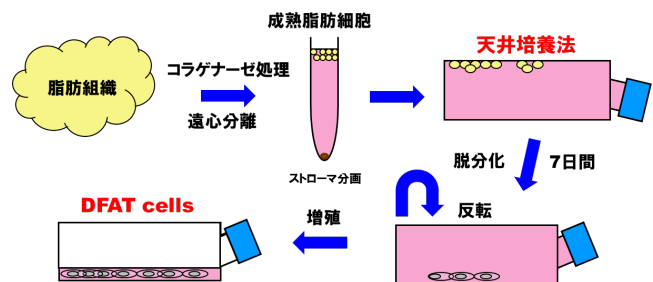


図 1 天井培養法

(2) フローサイトメリーにて DFAT cells の細胞表面抗原を解析した。その結果 DFAT cells は Stro-1、CD44、CD90、CD105、CD166 陽性であり、CD19、CD45、CD106、CD146 陰性であった(図 2)。International society for cellular therapy によると幹細胞は CD105、CD73、CD90 陽性、CD45、CD34、CD14、CD19

陰性と定義されており、DFAT cells は幹細胞と類似した細胞表面抗原パターンを示すことが示唆された。

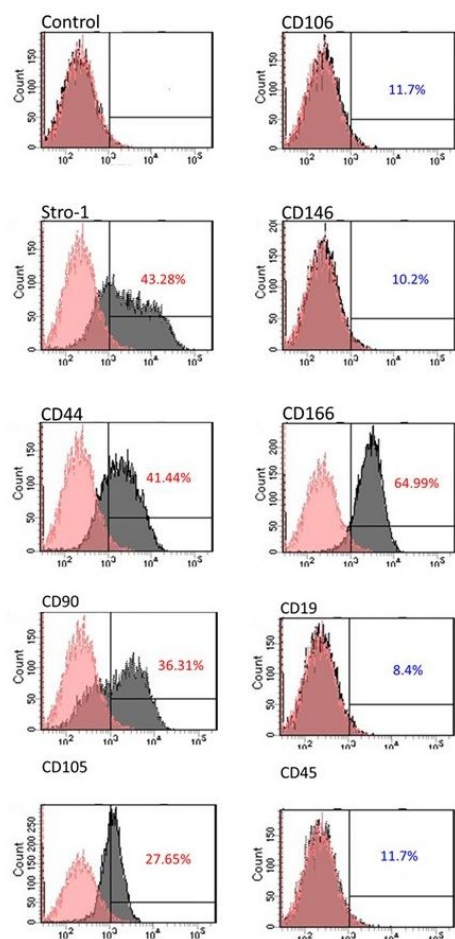


図 2 DFAT cells 細胞表面抗原

(3) DFAT cells を浮遊培養用シャーレ中で 3 週間培養し、細胞スフェアを作製した。スフェアを neural-conditioned medium ( NCM : DMEM/F12<sup>50ml</sup> FGF<sup>50ul</sup> EGF<sup>50ul</sup> N<sub>2</sub><sup>500ul</sup> ) にて 1 週間培養した。NCM で培養したスフェアには神経細胞の樹状突起と類似した突起が認められた ( 図 3 上 )。また免疫組織化学にて神経系マーカーである Tuj1 の発現を確認したところ、スフェア内に発現が認められた ( 図 3 下 )。以上のことから DFAT cells は NCM にて培養することで神経系細胞へ分化することが示唆された。

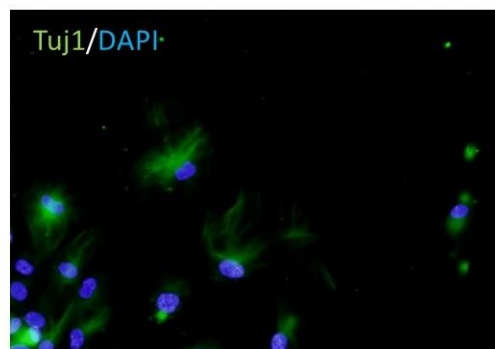
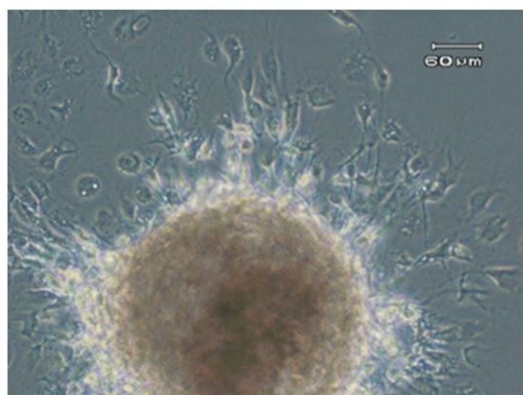


図 3 樹状突起様の突起を有する細胞スフェア ( 上 )、免疫組織化学の結果 ( 下 )

(4) 全身麻酔下で GFP 遺伝子改変マウスの鼠蹊部より脂肪組織を採取し、天井培養法にて DFAT cells を樹立した。蛍光顕微鏡下に DFAT cells を観察し、その形態や数を評価した ( 図 4 )。

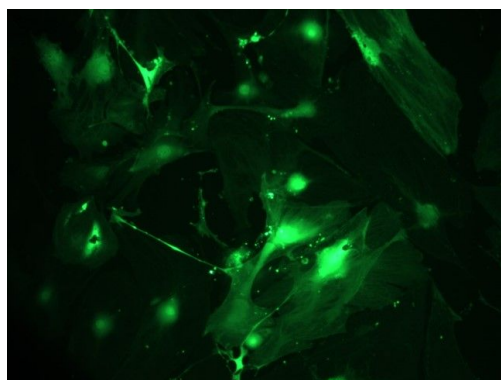


図 4 GFP 遺伝子改変マウス由来 DFAT cells

(5) DFAT cells の移植を行うため、放射線照射によるマウス唾液腺障害モデルマウスの作製に取り組んだが、照射部位、照射線量の設定が困難であり安定したモデル動物の作製に時間を要した。今後はさらに安定した唾液腺障害モデルマウスを作製し、それらの動

物にヒト類脂肪体由来 DFAT cells または GFP 遺伝子改変マウス由来 DFAT cells の移植を行い、唾液腺再生能の評価に取り組んでいきたい。GFP 遺伝子改変マウス由来 DFAT cells を用いることで移植された細胞の追跡が容易であると考えている。

#### 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)

[学会発表](計 2 件)

覚道 知樹、岸本 直隆、百田 義弘、脱分化脂肪細胞の神経系細胞分化、第 43 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会、2015 年 10 月 31 日、学術総合センター(東京都)  
岸本 直隆、The possibility of dedifferentiated fat cells for tissue engineering、McGill University、Faculty of Dentistry Research Seminar、2015 年 9 月 18 日、Montreal (Canada)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

岸本 直隆 (KISHIMOTO, Naotaka)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：50610911