

平成21年5月7日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390559
 研究課題名（和文） 脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞を用いた次世代型
 歯周組織再生療法開発
 研究課題名（英文） The establishment of a new periodontal tissue regeneration therapy
 using adipose-tissue derived stem cells
 研究代表者
 北村 正博（KITAMURA MASAHIRO）
 大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
 研究者番号：10243247

研究成果の概要：脂肪組織由来間葉系幹細胞（ADSC）を用いた歯周組織再生療法を確立するため、ヒト ADSC の硬組織形成細胞への分化能を解析するとともに、ビーグル犬歯周病モデルにおいて ADSC の歯周組織再生効果を検討した。その結果、ヒト ADSC が硬組織形成細胞への分化能を有していることが確認され、2級根分岐部病変や2壁性骨欠損のような重度の歯周組織欠損症例においても、ADSC が歯周組織再生を誘導する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 8,500,000 | 2,550,000 | 11,050,000 |
| 2007年度 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |
| 2008年度 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,300,000 | 4,590,000 | 19,890,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周組織再生、未分化間葉系幹細胞、脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

1980年代初めにGTR法が歯周組織再生療法として確立して以来、術式の簡便性や安全性の更なる向上を目指し、国内外で新規歯周組織再生療法の開発競争が行なわれている。しかしながら、これまで報告されたいずれの歯周組織再生療法においてもその適応症は主に骨内欠損に限定され、水平性骨吸収を含む広範囲な歯周組織欠損部の再生を誘導することは、依然として困難と言わざるを得ない。これまでに実用化された歯周組織再生療法が小規模な垂直性骨欠損にしか適応できない理由を考察すると、歯周

組織を構成する歯槽骨、歯根膜、セメント質の全ての組織に分化可能な間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cell: MSC）の供給を、喪失した歯周組織近傍に位置する歯根膜組織のみに依存しているため、MSCの量的問題から再生できる組織量に限界があることが挙げられる。このMSCの量的問題を解決するため、骨髄由来MSCを用いて歯周組織を再生させる試みが一部の施設で行われているが、骨髄採取時の患者への危険性と侵襲性や骨髄中のMSCの存在率の低さから採取できるMSC数に制限があることなどから臨床応用は進んでいないのが現状である。

近年の急速な組織幹細胞研究の発展により、脂肪組織中に高い頻度でMSCが存在していることが明らかとなり、骨髄にかわる新しいMSC供給源として脂肪組織が脚光を浴びている。脂肪組織は骨髄の採取と比較して安全かつ多量に採取できる大きなメリットがあり、脂肪組織中の間葉系幹細胞 (Adipose Tissue derived MSC: ADSC) は骨髄に比べてはるかに存在比率が高く、幹細胞の中でも胚性幹細胞に次ぐ高い分化能を有していることが報告されている。そこで、我々のグループでは、脂肪組織が歯周組織再生のための幹細胞ソースとして非常に有用と考え、現行の歯周組織再生療法の適応を超えた重度歯周組織欠損症例への適応を目的としてADSCを用いた次世代型歯周組織再生療法の開発を目指した本研究を計画した。

2. 研究の目的

脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) を応用した次世代型歯周組織再生療法の確立を目指す、

- 1) ヒトの脂肪組織を採取し、脂肪組織からのADSCの単離法を確立する。
- 2) 単離したヒトADSCの硬組織形成細胞への分化能を検討する
- 3) ビーグル犬歯周組織欠損モデルを用いてADSCの移植実験を行い、ADSCの歯周組織再生能力を *in vivo* で検討する。

3. 研究の方法

1) ヒト脂肪組織からのADSCの単離

大阪大学医学部附属病院未来医療センターにて同意が得られたボランティアから腹部脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織を0.1%のコラゲナーゼで1時間インキュベートし、Ficollを用いて比重遠心することにより血球および脂肪成分を除去した。そして、得られた細胞を培養プレートへ播種し、3代継代培養して目的細胞をEnrichmentした後、付着細胞を回収しADSCを単離した。

2) ADSCの硬組織形成細胞への分化能の検討

ヒトの脂肪組織から単離したADSCを、基礎培地 (10% FBS 含有 DMEM 培地)、基礎培地に10mM β -グリセロホスフェート (β -glycerophosphate) および50 μ g/ml アスコルビン酸 (Ascorbic acid) が添加された硬組織誘導培地 (C-Med)、あるいは1mM デキサメタゾン (Dexamethasone: DEX) を添加

したC-Medで培養し、それぞれのアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性および石灰下モジュール形成を経時的に比較した。

3) ビーグル犬脂肪組織からのADSCの単離

ネンブータル全身麻酔下にてビーグル犬の大網から脂肪組織を採取し、前記のヒト脂肪組織からのADSCの単離方法と同様にビーグル犬ADSCを単離した。

4) ビーグル犬歯周組織欠損モデルにおけるADSCを用いた歯周組織再生実験

①根分岐部歯周組織欠損モデル：ビーグル犬1頭を用い、ネンブータル全身麻酔下にて左右第4前臼歯側根分岐部に垂直的深さ5mm、水平的深さ3mmの人工的2級根分岐部歯周組織欠損を作製し、シリコン材を填入した。4週後に、作成した人工的根分岐部歯周組織欠損のうち、左側 (試験側) にADSC+フィブリンゲルを、右側 (対照側) にはフィブリンゲルのみを移植した。そして、移植6週後に屠殺し、マイクロCTにより歯周組織の断層撮影による歯槽骨再生の評価を行うとともに、組織切片を作成してHE染色を行い組織学的に歯周組織再生効果を評価した。

②2壁性歯周組織欠損モデル：ビーグル犬5頭を用い、人工的2壁性歯周組織欠損を作成した。すなわち、まず両側の下顎第4前臼歯を抜去し、約3ヶ月間の抜歯窩の治療期間を経た後、第1後臼歯の近心側部に、頬舌径3mm、近遠心径5mm、垂直的深さ4mmの2壁性歯周組織欠損を作製した。作成した人工的2壁性歯周組織のうち、左側 (試験側) にADSC+フィブリンゲルを、右側 (対照側) にはフィブリンゲルのみを移植した。そして、移植6週後に屠殺し、根分岐部病変モデルと同様のエックス線のおよび組織学的評価に加え、AZAN染色による組織学的検索とコンピューターアナライザーを用いた3次元画像解析を行った。

4. 研究成果

1) ヒトの脂肪組織から単離したADSCを、基礎培地、硬組織誘導培地 (C-Med)、あるいはDEX添加C-Medで培養し、それぞれのアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性および石灰下モジュール形成を比較した。その結果、C-MedあるいはDEX添加C-Medで培養したADSCは、基礎培地で培養したADSCに比べて、培養7日目以降高いALP活性を示した (図1)。

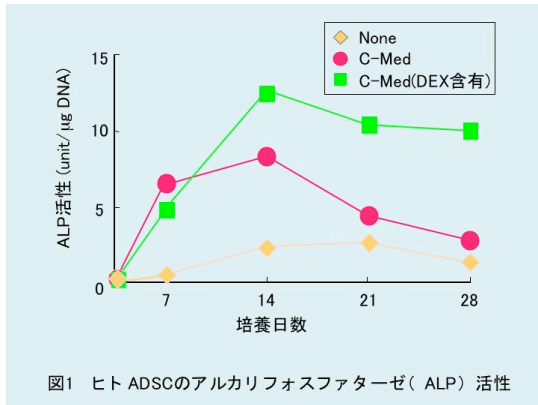


図1 ヒト ADSCのアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

特に、DEXを添加したC-Medで培養したADSCは、DEX非添加C-Medに比べて、培養14日目以降も高いALP活性を持続した。また、基礎培地で培養したADSCには石灰下モジュール形成は認められなかったが、C-MedあるいはDEX添加C-Medで培養したADSCには著明な石灰下モジュール形成が認められた (図2)。

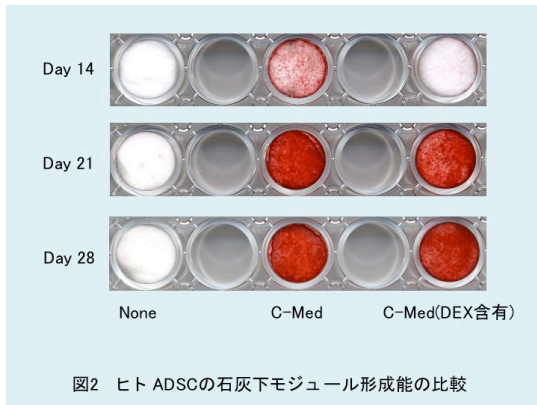


図2 ヒト ADSCの石灰下モジュール形成能の比較

以上の結果から、ヒトの脂肪組織から単離したADSCは、硬組織形成細胞への分化能を有することが明らかとなった。

2) ビーグル犬の左右第4前臼歯類側根分岐部に人工的2級根分岐部歯周組織欠損を作製し、シリコン材を填入し慢性炎症化した後、左側(試験側)にADSC+フィブリンゲルを、右側(対照側)にはフィブリンゲルを移植した。

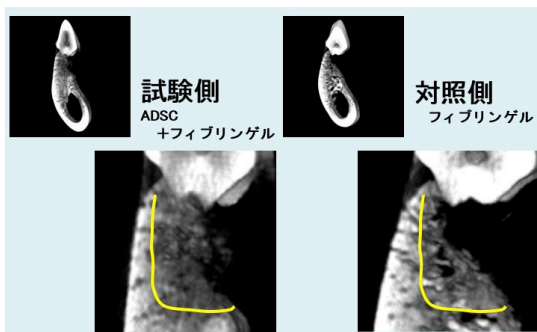


図3 2級根分岐部歯周組織欠損へのADSC移植6週後のマイクロCTによる解析

移植6週後にマイクロCTにより試験側と対照側の2級根分岐部歯周組織欠損部の歯槽骨再生を比較したところ、ADSCを移植した試験側において著明な骨再生が認められた(図3)。また、組織学的にもADSCを移植した試験側において、移植6週後に著明な歯槽骨再生が認められた(図4矢印)。

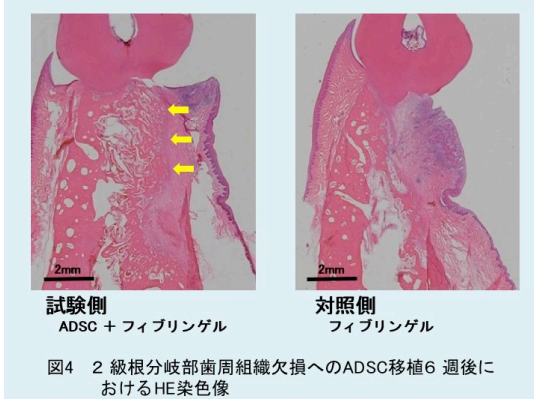


図4 2級根分岐部歯周組織欠損へのADSC移植6週後におけるHE染色像

3) ビーグル犬の左右第1後臼歯の近心頰側に2壁性歯周組織欠損を作製し、左側(試験側)にADSC+フィブリンゲルを、右側(対照側)にはフィブリンゲルを移植した。移植6週後にマイクロCTにより試験側と対照側の2壁性歯周組織欠損部に再生した新生歯槽骨を三次元的に評価(図5)したところ、ADSCを移植した試験側において形成される新生骨体積が大きい傾向が認められた(図6)。

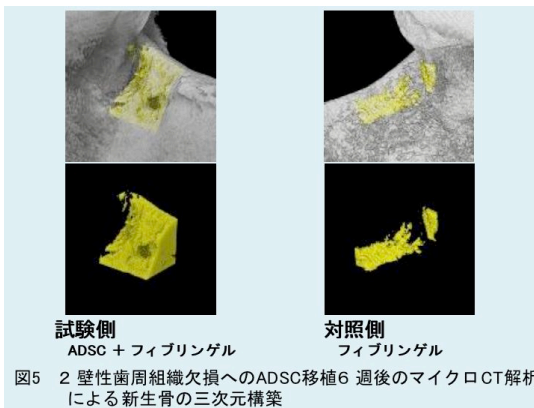


図5 2壁性歯周組織欠損へのADSC移植6週後のマイクロCT解析による新生骨の三次元構築

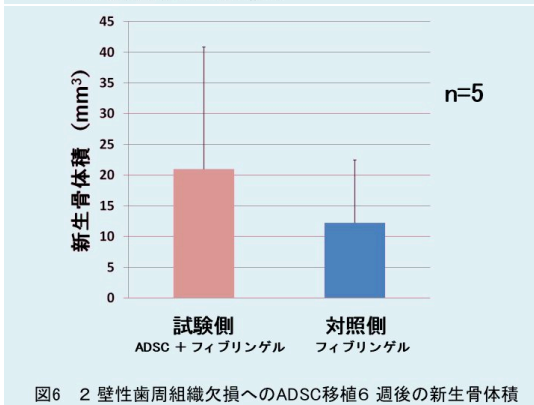


図6 2壁性歯周組織欠損へのADSC移植6週後の新生骨体積

一方、ADSCを移植した試験側において、移植6週後に著明な歯槽骨再生が組織学的にも確認された(図7)。そして、新生セメント質の長さ(図8)と骨欠損底部-歯肉上皮最根尖部間距離を計測したところ、新生セメント質の長さ(図8)と骨欠損底部-歯肉上皮最根尖部間距離共に、ADSCを移植した試験側において有意に($P < 0.05$)大きな値を示し(図8および9)、ADSC移植がセメント質新生と歯肉上皮の根尖側への増殖抑制を誘導した可能性が示唆された。

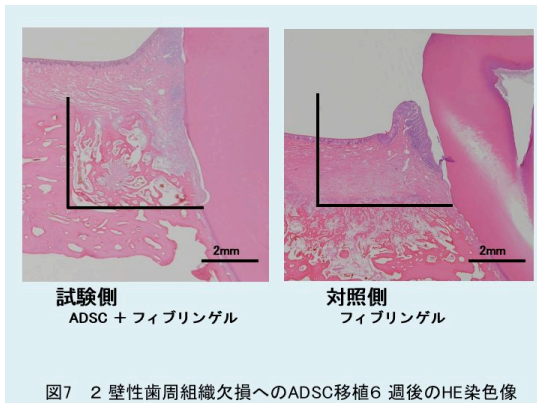


図7 2 壁性歯周組織欠損へのADSC移植6 週後のHE染色像

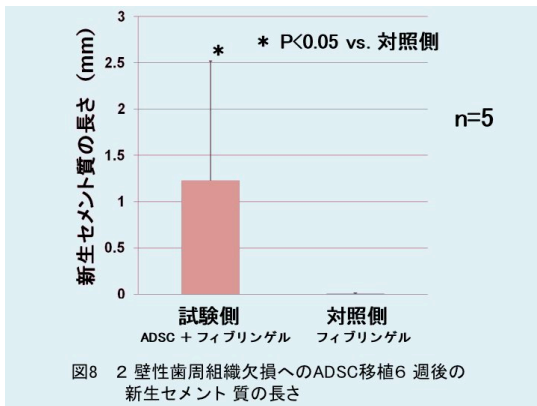


図8 2 壁性歯周組織欠損へのADSC移植6 週後の新生セメント質の長さ

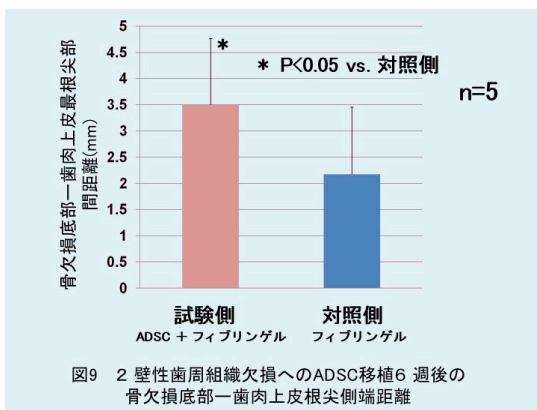


図9 2 壁性歯周組織欠損へのADSC移植6 週後の骨欠損底部-歯肉上皮根尖側端距離

また、再生された歯周組織をAZAN染色により観察したところ、歯根膜のコラーゲン線維が新生セメント質と新生骨に埋入していることが確認され(図10)、ADSC移植による

歯周組織再生が歯周組織が本来保持している組織学的構造を再現するものであることが明らかとなった。



図10 2 壁性歯周組織欠損へのADSC移植部のAZAN染色像

ビーグル犬を用いた2級根分岐部病変や2壁性骨欠損を想定した重度の歯周組織欠損モデルにおいて、ADSCが歯周組織の再生を誘導することが明らかとなった。また、2壁性歯周組織欠損モデルにおいて、ADSC移植側で著明なセメント質の新生を認め、歯根膜のコラーゲン線維が新生セメント質と新生骨に埋入していることが確認されことから、ADSCが歯周組織の組織学的構造をも含めた歯周組織再生を誘導する可能性が示唆された。また、いずれのモデルにおいてもADSCを移植した部位に、アンキローシスや歯根吸収等の非生理的治癒は認められず、ADSCが真の歯周組織再生を誘導する可能性が示唆された。

また、ボランティアから採取した脂肪組織にEnrichment操作を加え回収したヒトADSCが硬組織形成細胞への分化能を有していることが確認され、本研究課題で確立したヒトADSCの単離法がヒトにおけるADSCを用いた歯周組織再生療法に応用可能であることが明らかとなった。

今後、ADSCを用いた歯周組織再生療法の適応範囲の決定・拡大を目指し、ADSC用の至適再生誘導用足場材を選定や我々が現在治験中の塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)との併用効果の基礎的検討を行うとともに、トランスレーショナルリサーチを通じた臨床応用を計画している。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

①橋川智子、村上伸也、脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生、日本歯科評論、778、39-40、2007

〔学会発表〕(計 8 件)

小笹匡雄、橋川智子 (2番目)、村上伸也 (8番目) 他5名、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の移植による歯周組織再生療法の開発、日本歯科保存学会2008年度秋季学術大会(第129回)、平成20年11月7日、富山国際会議場(富山)

②田内拓史、山田 聡 (2番目)、橋川智子 (9番目)、北村正博 (10番目)、村上伸也 (11番目) 他7名、歯根膜特異的Periostinアイソフォームは歯根膜細胞の硬組織形成分化を促進する、日本歯科保存学会2008年度秋季学術大会(第129回)、平成20年11月7日、富山国際会議場(富山)

③橋川智子 (1番目)、村上伸也 (8番目) 他4名、脂肪細胞由来未分化間葉系幹細胞の移植による歯周組織再生療法の開発、第6回日本再生歯科学会学術大会・総会、平成20年9月13日、日本歯科大学(東京)

④T. HASHIKAWA (1番目)、M. MURAKAMI (8番目) 他6名、Periodontal Regeneration by Transplantation of Adipose Tissue-derived Stem Cells、IADR 86th General Session & Exhibition、2008年7月3日、Metro Toronto Convention Centre (カナダ)

⑤T. IWAYAMA, T. HASHIKAWA (2番目)、M. MURAKAMI (11番目) 他8名、Analysis of Osteogenic Differentiation of Adipose Tissue-derived Stem Cells、IADR 86th General Session & Exhibition、2008年7月3日、Metro Toronto Convention Centre (カナダ)

⑥小笹匡雄、橋川智子 (2番目)、村上伸也 (8番目) 他5名、実験的歯周病モデルを用いた脂肪組織由来間葉系幹細胞の移植による歯周組織再生、第51回春季日本歯周病学会学術大会、平成20年4月26日、大宮ソニックシティー(埼玉)

⑦岩山智明、橋川智子 (2番目)、村上伸也 (8番目) 他5名、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の硬組織分化能の解析、第51回春季日本歯周病学会学術大会、平成20年4月26日、大宮ソニックシティー(埼玉)

⑧橋川智子 (1番目)、村上伸也 (6番目) 他4名、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の硬組織形成細胞への分化誘導、第50回春季日本歯周病学会学術大会、2007年5月18日、横須賀芸術劇場(神奈川)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：歯周硬組織再生用組成物

発明者：村上伸也、橋川智子、澤芳樹
松山晃文、菰田弘

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：PCT/JP2007

番号：068287

出願年月日：2007年9月20日

国内外の別：外国

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

北村 正博 (KITAMURA MASAHIRO)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：10243247

(2)研究分担者

村上 伸也 (MURAKAMI SHINYA)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70239490

山田 聡 (YAMADA SATORU)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40359849

佐保 輝之 (SAHO TERUYUKI)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：10263295

橋川 智子 (HASHIKAWA TOMOKO)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00362682

(3)連携研究者

なし