

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22日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390387

研究課題名（和文） 即時調整した脂肪細胞由来幹細胞組み込み型遺伝子活性化基質による顎骨の再生

研究課題名（英文） Jaw bone regeneration using gene activated matrix incorporated with directly prepared adipose derived stem cells

研究代表者

朝比奈 泉（ASAHINA IZUMI）

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30221039

研究成果の概要（和文）：

脂肪組織からコラゲナーゼ消化と遠心という簡単な操作で幹細胞(ADSC)を調整することが可能であり、これを、培養を経ずに BMP とともに移植することによって、BMP の量を大幅に減じて骨誘導が可能であった。一方、BMP や Wnt を発現するプラスミドを ADSC に導入することによって骨芽細胞への分化が見られ、カルシウム沈殿法を応用しアテロコラーゲンを基質とした BMP 組み込み遺伝子活性化基質は in vivo で骨形成を誘導し、ADSC を搭載することによって骨形成が促進した。

研究成果の概要（英文）：

Adipose derived stem cells (ADSCs) have been isolated from adipose tissue by the simple method with collagenase digestion and centrifugation. Direct implantation of freshly isolated ADSCs with minimal amount of BMP could induce ectopic bone formation. ADSCs transfected with the plasmid carrying BMP and/or Wnt genes differentiated into osteoblasts in vitro. Implantation of the gene activated matrix (GAM) consisted with atelocollagen, which constructed with BMP gene by calcium precipitation method, induced bone formation and the addition of ADSCs to the GAM accelerated the bone induction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

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：口腔顎顔面再健外科学

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域において、顎骨あるいは歯槽骨欠損の再生は重要な課題である。特にデンタルインプラントを用いた治療の予知性が高まった現状において、口腔機能回復のため

に、インプラントを埋入するに足る骨組織再生は以前にも増して重要になってきた。しかし、二次的外科的侵襲を要し採取量にも限界があるという欠点を持ちながらも、未だに新鮮自家骨移植に代わる確実で有効な方法が

無いのが現状である。

そこで、我々は人工代用骨に骨誘導能を付与することを目的に BMP の応用が試みてきたが、高齢で高等な動物の大きな骨欠損の確実な再生には、成長因子 (BMP) 単独の移植でのみでなく、応答する細胞の添加が不可欠であることを明らかにしてきた。またヒト骨髄由来培養骨芽細胞様細胞 (BMSC) を用いた歯槽骨再生の臨床研究を行ったが、培養細胞の増殖・分化能に個体差が大きく、培養操作には多大な労力と経費を要することが明らかとなった。そこで培養操作を行うことなく、組織再生に必要な十分量の幹細胞回収の必要性があるとの結論に至った。さらに、脂肪組織には骨髄中の 100-1000 倍の幹細胞が存在することが知られており、骨髄などの間葉系幹細胞源と比較して多量に存在し、余剰組織として十分な量の回収が可能であることから、移植時に脂肪由来の間葉系幹細胞 (ADSC) を回収し、培養操作を加えることなく直接応用することを考えた。

一方、BMP は、既に臨床応用され始めているが、非常に高価であり、副作用としての腫脹を生じることが問題となる。そこで安全なプラスミドをベクターとして遺伝子を組み込み、*in vivo* で直接遺伝子導入が可能な、コラーゲンを担体とした遺伝子活性化基質を骨欠損部に移植することによって骨欠損の再生を図ることにした。しかし、この方法は、遺伝子導入効率の低さから確実性の欠けるものであり、本研究では遺伝子活性化基質に用いるコラーゲン基質の性状、さらにリン酸カルシウムの形状に改変を加え、より遺伝子導入効率の高い遺伝子活性化基質 (GAM) の作製を図ると共に、骨形成誘導遺伝子として、BMP の他、骨形成に必須の転写因子 Runx2 の組み込みを試みることにした。また、この遺伝子活性化基質に直接幹細胞を組み込むことによって、遺伝子導入効率の向上、骨芽細胞分化誘導の効率化が図れるものと思われた。

2. 研究の目的

先に述べた背景から、本研究では、Tissue Engineering の概念を基本に、培養操作を経ることなく、*on site* で脂肪組織から幹細胞を採取、分離し、骨形成を誘導する遺伝子を組み込んだ基質 (遺伝子活性化基質) に組み込み、これを骨欠損部へ移植することによって顎骨、歯槽骨組織の再生を図る、容易で確実な骨組織再生法の開発を目的とした。

具体的には、1) 脂肪からの幹細胞の分離、2) 細胞の遺伝子の取り込みを効率化させる基質の作製、3) 効果的に骨芽細胞への分化を誘導する遺伝子あるいは遺伝子の組み合わせの選定を目標としている。

3. 研究の方法

1) 脂肪由来幹細胞の分離 :

①細胞の分離 : マウス鼠径部より採取した脂肪体を細切しコラゲナーゼで酵素処理することで細胞を単離する。次いで、遠心操作によって細胞の分離を行った。マウス同様、ヒト類脂肪体からも同様に行った。

②Bioassay : 骨分化用培地に BMP-2 を添加し、分化培養を行い、骨分化マーカーの活性測定、遺伝子発現の解析を行い、骨芽細胞への分化能を定量的に評価する分化を確認した。

③細胞の特性の解析 : 細胞表面抗原を、FACS を用い解析した。

2) 導入遺伝子の選択 :

①導入遺伝子のクローニング : BMP-4 と転写因子である Runx2、骨形成に BMP とは異なる経路で促進的に働くと考えられている Wnt3a のクローニングを行い、GFP を持つ蛋白発現プラスミドベクターに組み込んだ。

②遺伝子の導入 : 脂肪由来幹細胞に Amaxa Nucleofector Device を用いエレクトロポレーション法によって遺伝子導入を行い、GFP の発現で取り込みを確認した。

③Bioassay : 上記遺伝子を単独あるいは組み合わせで導入した細胞の *in vitro* における骨分化能を評価した。BMP と Wnt3a はたんぱく質でも同様に、その効果を検討した。

3) 遺伝子活性化基質の調整

①材料の選択と基質作製 : プラスミドベクターとリン酸カルシウムをコラーゲン溶液に溶解し凍結乾燥することによって基質を作製した。リン酸カルシウムは遺伝子導入キットのものを用いたが、その他、微細に粉碎した α 、 β TCP さらにナノサイズハイドロキシアパタイトを用いた。コラーゲンは牛骨由来アテロコラーゲンをを用いたが、鮭皮由来マリンコラーゲンも検討した。

②Bioassay : GFP 遺伝子を組み込んだプラスミドベクターを用い作製した遺伝子活性化基質を、マウスの頭部および背部の皮下に移植、共焦点レーザー顕微鏡を用い移植標本全層にわたり蛍光の存在を観察した。また骨形成を組織学的に評価した。同時に BMP たんぱく質を用いて同様の検討を行った。

4) 即時調整幹細胞移植による骨形成

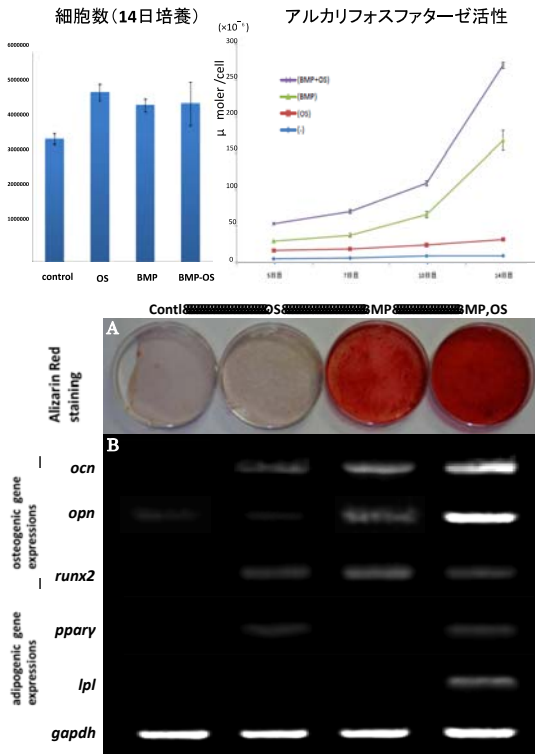
培養操作を経ない幹細胞移植で、骨組織の形成が可能か、ADSC および BMSC を、BMP を添加したセラミックス担体とともに、マウスの頭蓋骨膜下および背部皮下に移植することによって確認した。

4. 研究成果

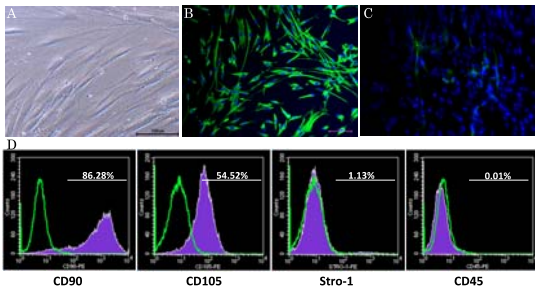
1) 脂肪由来幹細胞の分離 :

マウス、ラットの鼠径部脂肪体ならびにヒ

トコ脂体から、1%コラゲナーゼ処理によって幹細胞画分を回収することに成功し、骨分化培地ならびにBMP-2を作用させることによってALP活性の上昇、osteocalcin, Runx2等の骨分化マーカーが上昇することを見出した。



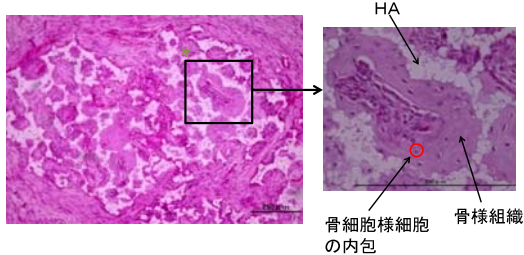
ヒト脂肪由来幹細胞の細胞表面マーカーの解析ではCD90, 105が陽性で, Stro1が僅かに陽性、CD45は陰性であり他の組織由来の間葉系幹細胞と同様の特性を示した。



また、これらの細胞をハイドロキシアパタイトを担体として移植することによって、in vivoで骨形成が出来ることを明らかにした。

Histological appearance

•BMP-OS移植群で骨形成が観察された

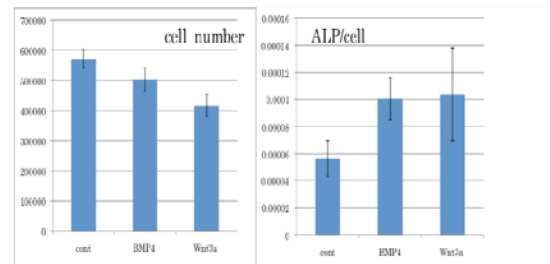


2) 遺伝子クローニングと導入:

BMP-4, Runx2に加え、新たに骨形成に協調的に働く因子としてWnt3aを候補に挙げた。BMP-4, Wnt3a遺伝子は新たにマウスライブラリーからクローニングし、それぞれ緑、赤の蛍光を発する発現ベクターpAuGFP1-N1、pTurboFP635-N1に組み込み遺伝子導入実験を行った。Runx2は既にクローニングされたものを用いた。対象の細胞として、マウス、ラットおよびヒトのADSCならびにBMSCを用いた。また導入方法としてカルシウム沈殿法、リポフェクション法、およびエレクトロポレーション法を用いた。さらにベクターにアデノウイルスを用いた遺伝子導入も試みた。その結果、それぞれ細胞あるいは種、遺伝子の種類の組み合わせによって遺伝子導入効率は異なり、ラットBMSCに対してはBMP-4遺伝子の効率はよいものの、ADSCに足しては悪く、一方、マウスBMSCに対してBMP-4の導入効率が低く、反対にRunx2遺伝子は効率よく導入された。結果として、Amara Nucleofector Deviceを用いたエレクトロポレーション法がBMP-4, Wnt3a, Runx2のマウスADSCへの導入効率が最も良かった。

各因子のin vitroにおける骨誘導作用を検討した。まず、100ng/mlのBMP-2とWnt3aのたんぱく質をADSCに添加した。経時的な細胞増殖とALP活性の発現を確認したが、BMP-2を作用させることによって、細胞は僅かに増殖は抑制され、ALP活性は対照群に比して2倍以上の上昇が見られた。一方、Wnt3は細胞増殖、ALP活性、ともに大きに変化は与えなかった。両者を同時に作用させても、相乗相加作用は見られなかった。

次いで、おのおの15 μ gずつのplasmidを導入した細胞でも同様の検討を行った。結果はたんぱく質で行った実験と異なり、BMP-4によるALP活性の上昇は対照群に比べ1.6倍程度で、たんぱくに比べると低かった。一方、Wnt3aは、たんぱくの場合と異なり細胞の増殖を20%ほど抑制し、ALP活性は対照群に比べ1.7倍程度の上昇を認めた。BMP-4, Wnt3aの両者を導入したものは、僅かではあるが両因子が同時に導入された細胞が観察された。しかし、両因子による相互作用は認められなかった。

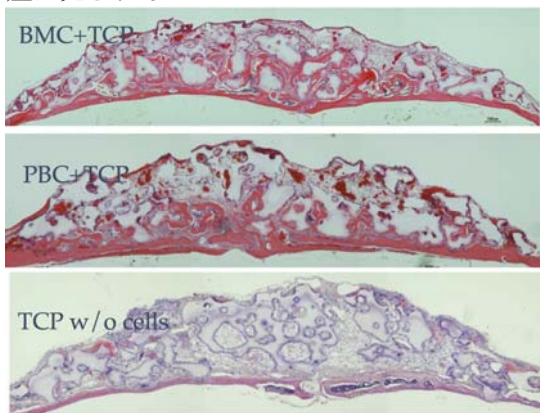


またRunx2を導入したものはBMP-4と同程度

のALP活性の上昇が認められたが、Runx2と他因子との相互作用については現在検討中である。

3) 即時調整幹細胞移植による骨形成：

即時調整した幹細胞による骨形成の促進が可能なかを検討するため、比較的大量に幹細胞の回収が可能なヒト骨髄を用いた。すなわち、30mlの骨髄を採取し、遠心操作によって間葉系幹細胞を含むと考えられる単核球画分を回収し、 β TCPを担体としてヌードマウス頭蓋骨上への移植実験を行った。その結果、骨髄由来単核球細胞移植によって、対象に比べ有意に骨形成の促進が見られた。しかし、その効果は末梢血由来多血小板血漿移植との有意差は見られなかった



次に、即時調整したヒト ADSC を β -TCP を担体とし、ヌードマウス皮下移植による骨形成作用の検討を行った。当然ながら ADSC 単独の移植では骨形成の誘導は見られないが、BMP-2 たんぱく質を β -TCP に吸着してから細胞を添加して移植することによって、骨形成の誘導が確認された。BMP-2 単独の移植においても骨形成の誘導は確認できるが、細胞を添加することによって BMP のタンパク量は 10 分の 1 に減じることが可能であった。

4) 遺伝子活性化基質 (GAM) の調整

Bonadio らのオリジナルによる GAM はコラーゲンを基質としている。そこで、GFP を持つ発現プラスミドに、先にクローニングした BMP-4 を組み込んだものを、牛真皮由来 2% アテロコラーゲンに混和し、さらに担体としての β TCP 顆粒を加え、凍結乾燥した GAM を調整した。これをマウス頭蓋部および背部皮下に移植、2、8 週後に、共焦点レーザー顕微鏡で GFP の発光を確認するとともに、組織学的に観察を行った。その結果、2、8 週とも蛍光および組織学的に骨形成ともに観察できなかった。そこで、カルシウム沈殿法の *in vitro* 遺伝子導入用キットを用い、プラスミド 30 μ g を試薬に溶解後、アテロコラーゲンと混

和、凍結乾燥し移植した。その結果、2 週間には十分な蛍光が観察できた。移植 8 週間には僅かではあるが新生骨の形成を認めた。しかし、同様の実験で BMP-2 たんぱく質 1 μ g を移植したもの比べ、その骨形成量は 10 分の 1 程度であった。

より遺伝子の導入効率を上げるために μ m サイズオーダーの α および β TCP 粉末とプラスミドを混和指導用の移植実験を行ったが、GFP の発現、新生骨形成ともに、カルシウム沈殿法の場合と同程度であった。現在、ナノサイズオーダーの HA を用いた効果を検討中である。

今後、当初の実験計画にあったように鮭皮由来のアテロコラーゲンが入手可能となったので、これについても検討予定である。

さらに、BMP-4 を含む GAM に 10 万個の ADSC を播種し、移植実験を行った。GFP の発現は、ADSC を搭載しない GAM に比べ 20~30% 程度の上昇を認めたが、これが ADSC に導入されたのか、ホストの細胞に取り込まれたのか明確ではなかった。また、移植 8 週間には骨形成を認めたが、ADSC の有無による骨形成量の差異に関しては、現在、精査中である。

また Wnt3a、Runx2、単独さらに BMP-4 との組み合わせによる GAM に関しては現在、移植実験を終了し標本を回収中である。

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 13 件)

- 1) Zhong W, Sumita Y, Ohba S, Kawasaki T, Nagai K, Ma G, Asahina I. In vivo comparison of the bone regeneration capability of human bone marrow concentrates vs. platelet-rich plasma. *PLoS One*. 2012;7(7):e40833.
- 2) Shiraishi T, Sumita Y, Wakamastu Y, Nagai K, Asahina I. Formation of engineered bone with adipose stromal cells from buccal fat pad. *J Dent Res*. 2012 Jun;91(6):592-7.
- 3) Nishimura M, Takase K, Suehiro F, Murata H. Candidates cell sources to regenerate alveolar bone from oral tissue. *Int J Dent*. 2012; 2012:857192.
- 4) Kagawa R, Kishino M, Sato S, Ishida K, Ogawa Y, Ikebe K, Oya K, Ishimoto T, Nakano T, Maeda Y, Komori T, Toyosawa S. Chronological histological changes during bone regeneration on a non-crosslinked atelocollagen matrix. *J Bone Miner Metab*. 2012 Nov;30(6):638-50

(他9件)

〔学会発表〕（計 21 件）

- 1) Umebayashi M, Zhong W, Sumita Y, Ohba S, Nagai, Asahina I: Bone Regeneration Capability of Human Bone-Marrow Concentrates vs. Platelet-Rich Plasma. ISSCR, Yokohama, Japan, 2012
- 2) Asahina I: Over view on regenerative therapy for alveolar bone (Keynote lecture2) 2nd International Auto-Tooth Bone Bank Symposium(I.A.B.B), Fukuoka, Japan, 2011
- 3) Shiraishi T, Ikeda H, Sumita Y, Ohba S, Wakamatu Y, Nagai K, Asahina I: Bone regeneration using adipose-derived stromal cells ADSCs prepared from human cheek fat pads, Asian Congress on Oral & Maxillofacial Surgery 2010.11.25 - 28 Kuala Lumpur
- 4) Asahina I: Alveolar bone regeneration using mesenchymal stem cells. Second International Congress for Regenerative Surgery 2010.10.28-30 Roma
(他 17 件)

〔図書〕（計 2 件）

- 1) 朝比奈泉：歯槽骨の再生医療 上田実、朝比奈泉：編集 再生医療叢書 8 「歯学系」 91-109 頁 2012 年

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝比奈 泉 (ASAHINA IZUMI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30221039

(2) 研究分担者

住田 吉慶 (SUMITA YOSHINORI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号：50456654

小守 壽文 (KOMORI TOSIHISA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00252677

西村 正宏 (NISHIMURA MASAHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号：00294570