

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19199

研究課題名（和文）脂肪由来多能性細胞と炭酸アパタイト多孔体による骨と軟骨の複合的再生医療の開発

研究課題名（英文）Development of Combined Bone and Cartilage Regenerative Medicine Using Adipose-Derived Pluripotent Cells and Porous Carbonate Apatite

研究代表者

鎌田 久美子（KAMATA, KUMIKO）

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60836469

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：口腔癌治療で失われた顎関節の再生は咀嚼や嚥下機能の回復に非常に重要である。しかしながら現在は金属プレートなどによる再建法が主で機能の回復が十分とは言えない。本研究は失われた顎関節の再生のため、口腔内から簡便に採取できる脂肪組織から脂肪幹細胞を採取し、軟骨や骨に分化誘導することで顎関節機能の再生をおこなうための基礎的研究である。本研究では脂肪組織から脂肪幹細胞を採取し軟骨誘導培地で培養することにより軟骨細胞への分化誘導が可能であることを示した。また軟骨組織の立体的再生にはスフェロイド形成が重要と考えられるが、本研究では安定した大きさと長期の培養に耐えられるスフェロイドの形成が困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌治療で失われた顎関節の再生は咀嚼や嚥下機能の回復に非常に重要である。しかしながら現在は金属プレートなどによる再建法が主で機能の回復が十分とは言えない。本研究は失われた顎関節の再生のため、口腔内から簡便に採取できる脂肪組織から脂肪幹細胞を採取し、軟骨や骨に分化誘導することで顎関節機能の再生をおこなうための基礎的研究である。脂肪組織から採取した脂肪幹細胞は軟骨誘導培地で軟骨細胞への分化が簡便に行えることが分かった。脂肪細胞は関節の再生で最も困難である軟骨組織の再生にむけて有用な幹細胞のソースとなることが示された。

研究成果の概要（英文）：Regeneration of the lost temporomandibular joint due to an oral cancer treatment is very important for restoration of mastication and swallowing functions. However, currently, metal plates are the main method for the reconstruction, and it is not sufficient to restore the function. This study is a basic research to regenerate the lost TMJ function by inducing adipose stem cells from adipose tissue, which can be easily obtained from the oral cavity, to differentiate into cartilage and bone. In this study, we demonstrated that adipose stem cells can be induced to differentiate into chondrocytes by harvesting adipose tissue and culturing them in a cartilage induction medium. Spheroid formation is considered to be important for three-dimensional regeneration of cartilage tissue, but in this study, it was difficult to form spheroids that were stable in size and could withstand long-term culture.

研究分野：外科系歯学

キーワード：軟骨再生 DFAT 顎関節

1. 研究開始当初の背景

口腔領域の疾患では癌・その他の良悪性腫瘍、骨髄炎などにより顎関節の下顎頭を含めた下顎骨の広範囲切除が必要になることがしばしばある。この場合、欠損と関節機能を補うために金属製の顎頭が付いたチタンプレートや軟骨付きの遊離組織移植術などの再建治療が適応される。しかしながら金属製の顎頭は生体特有の弾力性を持たないため、下顎窩の骨の磨耗や頭蓋底、中耳への過剰な外力の影響が危惧される。また遊離組織移植術ではドナー部に大きな侵襲があることや形態・機能的な問題がある。そのため顎骨切除術後の新たな機能的再建法の確立は重要な課題となっている。

近年、幹細胞生物学や組織工学の発展により再生医療による欠損部の治療が期待されている。現在は多分化能を持つ細胞を、疾患や傷害を受けた組織へ移入する幹細胞移入療法の臨床研究や応用が進められている。この治療法は小範囲の組織欠損に対して有効であるが下顎骨半側切除術後のような広範囲欠損への応用は困難である。このような大きな欠損に対する治療コンセプトとしては下顎骨を一つの大きな器官として体外で再生し、欠損部へ移植する方法が必要と考えられる。しかしながらこのような大きな器官再生医療は確立されていない。再生医療の3要素は細胞、足場(スキャホールド)、増殖因子である。

骨髄幹細胞、脂肪幹細胞、iPS細胞などが細胞ソースとして用いられ、骨や筋肉、血管細胞などへの分化が可能であることが報告されている。しかしながら、採取できる幹細胞数が少ないことや癌化の問題があり、これらを解決する必要がある。近年、成熟脂肪組織から単離された脱分化脂肪細胞(DFAT)が高い増殖能と多分化能を持つことが明らかにされた(Matsumoto et al ; J cell physiol., 2008)。DFATは口腔内の頬脂肪体から簡単に採取でき、短期間で大量に調整できる。また自己の細胞であるため拒絶反応や癌化の心配がないことから再生医療の細胞ソースとして期待されている。

本研究では臨床応用を目指してDFAT、炭酸アパタイトブロック、種々の増殖因子を用いて、下顎頭を一つの三次元複合臓器構造体として再生させるための基礎的研究を行う。これにより、癌切除後や変形性顎関節症の患者の口腔機能のQOL向上が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は人工合成されたヒトの骨アパタイトと極めて類似した炭酸アパタイトブロックを用いて、骨と軟骨の複合構造体を作成し、新規の顎骨再建法を開発することである。下顎頭は関節軟骨と軟骨下骨から成り立っている。関節軟骨は関節面の表層から細胞成分の違いにより数層の層構造をもち、最終的に肥大軟骨細胞層から軟骨下骨へ移行する。これまで軟骨の再生は傷ついた関節軟骨のみの再生に主眼が置かれ、関節軟骨と軟骨下骨を含めた骨軟骨複合構造体としての再生法に関する報告は全くない。これは関節軟骨を支持でき、骨になりうる理想的なスキャホールドがなかったためと考えられる。

我々が人工合成に成功した炭酸アパタイトは生体骨のアパタイトに類似し、生体内で破骨細胞や骨芽細胞による骨のリモデリングを受け、骨と置換する性質を持つ。この炭酸アパタイトをスキャホールドとし、口腔内から簡単に採取でき、多分化能と高い増殖能を持つ脱分化脂肪細胞を骨、軟骨、血管へ分化誘導し細胞ソースとして利用することにより口腔機能と調和する骨軟骨複合体を作製することが最終目的である。本研究ではまず、脂肪

組織からの DFAT 採取と軟骨細胞分化、スフェロイド形成能についての検討をおこなった。

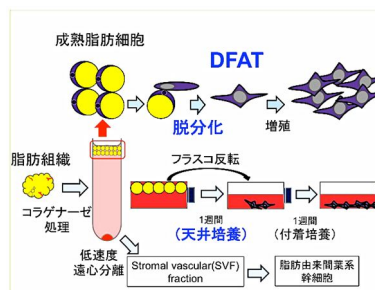
3. 研究の方法

脂肪組織からの脱分化脂肪細胞(DFAT)の単離と軟骨細胞への分化誘導実験 (in vivo)

12 週齢の雄のマウスの背部皮下から脂肪 1g を採取し、Matsumoto らの方法に準じて、0.1%コラゲナーゼなどの酵素処理によって分散した脂肪細胞から天井培養により DFAT を単離する。種々の分化誘導培地で培養し、アルシアンブルー染色を行い、軟骨細胞に分化することを確認する。

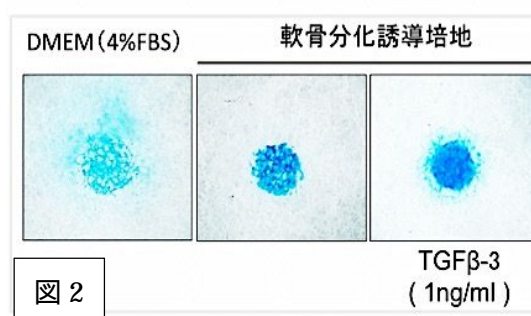
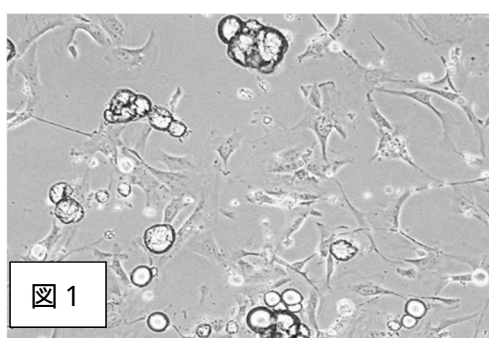
DFAT のスフェロイド化が軟骨細胞分化に与える影響の検討 (in vitro)

軟骨細胞の初期分化には細胞凝集が必要であり、細胞のスフェロイド化により骨や軟骨分化が促進される。ハンギングドロップ法、ペレット培養法を用いてスフェロイド化し回転培養を用いて分化培地中で 4 週間浮遊培養をおこなった。



4. 研究成果

脂肪組織からの DFAT の単離については上記の図のごとく行なった。12 週齢のマウスの背部皮下の脂肪を採取し、酵素処理で単一細胞化した脂肪細胞をフラスコ内で天井培養し線維芽細胞様の DFAT を単離した(図 1)。継代培養することで細胞数を増やし、継代 5 回目まで細胞増殖能に変化がないことを確認した。またこの DFAT を軟骨分化培地中でマイクロマスカルチャーを行なった。21 日後のアルシアンブルー染色で軟骨分化を確認している。さらに TGF-3 の添加により、軟骨分化能がさらに活性化されることを確認した(図 2)。



DFAT の軟骨細胞分化能を確認した後、スフェロイド培養をおこなった。ハンギングドロップ法、ペレット法では均一な大きさのスフェロイド形成を行うことが困難であった。培養皿に移すとすぐに単層培養状になるため、回転培養法を行う必要があると考えられた。回転培養法を用いたところ、均一な大きさのスフェロイド形成を得ることが可能であった。しかしながら大きさが小さく、1 週間以上の長期間の培養をおこなったが十分な大きさのスフェロイドを得ることが困難であった。今後は、培養条件の検討と血管内皮細胞などとの共培養によるスフェロイド形成をおこない、再生療法に十分な大きさと量、長期間の培養に耐えられる培養条件を検討する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------