

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 24 年 4 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年度 ～ 2011 年度

課題番号：22791930

研究課題名（和文）：脂肪由来幹細胞組み込み型フィブリンゲルによる骨再生法の開発

研究課題名（英文）：Bone regeneration using autologous fibrin gel with adipose derived stem cells

研究代表者

田島 暢崇 (TAJIMA NOBUTAKA)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：00447492

研究成果の概要（和文）：

脂肪組織には高い増殖能と骨、軟骨等の複数の系統へ分化能を有する adipose derived stem cells(ADSCs)が含まれており、この ADSCs と fibrin gel を用いた骨再生法の開発を目的として実験を行った。ADSCs を骨分化培地で培養を行った結果、骨芽細胞系への分化は不十分で、BMP-2 の添加が必要であった。一方で上顎洞の様な閉鎖した空間では fibrin gel でスペースを確保することのみで骨再生が可能であった。

研究成果の概要（英文）：

Adipose derived stem cells (ADSCs), which have high proliferation potency and pluripotency, can be extracted from adipose tissue. The purpose of this study was to develop a bone regeneration using ADSCs and fibrin gel. When ADSCs were cultured in osteogenic medium without BMP-2, differentiation of ADSCs into osteoblastic cells was not sufficient. On the other hand, bone regeneration was seen when autologous fibrin gel was grafted into a closed cavity such as sinus making a space for bone regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：脂肪由来幹細胞、フィブリン、骨再生、PRF、インプラント

1. 研究開始当初の背景

デンタルインプラントに伴う上顎洞底挙上術の際には、自家骨移植の他、骨補填剤の移植、あるいはそれらの混合移植が広く行われているが、自家骨移植は2次的外科侵襲を必要とし、また骨補填材移植の骨形成能は不十分であった。Stefan Lundgren らは自家骨や骨補填剤などの移植を必要としない、挙上した上顎洞粘膜下へ血餅を満たしスペースメ

イキングを行うのみで骨再生を行う、新しい上顎洞底挙上術を提案した。本法で再生された骨組織は不安定で術後早期に吸収しやすいという報告もあったが、血液以外の移植材を必要としないことは大きな魅力であり、本法で主体となっている血餅、すなわちフィブリンゲルの骨再生の足場としての可能性に、われわれは以前より着目していた。一方、脂肪組織には高い増殖能と、骨、軟骨、筋、脂

肪など複数の系統への分化能を有する adipose derived stem cells(ADSCs)が含まれているということが Zuk らにより報告されており、fibrin gel を足場として ADSCs を組み込んだ複合体を上顎洞底挙上術の際に移植すれば、移植された ADSCs が骨芽細胞系へと分化し、同部の骨化を助け、さらに fibrin gel がスペースメイキングの役目を果たすとともに骨化の際の足場にもなるため、より確実に早期の骨形成が期待できるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、上記のように ADSCs と自己フィブリンゲルを用いた骨再生法を開発することであり、ADSCs の骨芽細胞系への分化および fibrin gel の骨再生への効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 脂肪由来幹細胞の抽出

Hederick らの方法を基本として(Zuk et al. 2001)、脂肪体を無菌的に採取し、滅菌した鉢によりおおまかに細切したのちに脂肪組織を 0.1 % コラゲナーゼで酵素処理を行うことで細胞を単離する。次いで 100 μ メッシュフィルターを用いて余分な組織を除去した後、遠心操作によって細胞の分離を行う。油分を多く含む脂肪組織は酵素溶液中で上に浮き、下にはその他の細胞の集合体が沈むが、その中には脂肪由来幹細胞が含まれると考えられる (Halvorsen et al. 2001)。

(2) 脂肪由来幹細胞の骨芽細胞系への分化の検討

α -MEM 培地で培養したものを control として、培地に 1. 100 μ M ascorbic acid, 10 μ M Dexamethazone, 10mM-Glycerophosphate を添加した培地で培養したものを OS 群、2. 1. の条件にさらに 300 ng/ml BMP-2 を添加した培地で培養したものを BMP-OS 群、3. α -MEM に 300ng/ml BMP-2 のみを添加した培地で培養したものを BMP 群として各々比較を行った。

(3) 脂肪由来幹細胞の骨再生能の検討

培養した ADSCs を 1.0 \times 10⁵ cells/ml の割合で HA(アパセラム AX[®])に播種し作製した複合体を移植した。

(4) 自己 fibrin の骨再生へ応用の検討

静脈血を専用機により遠心加工し、fibrin clot を作製。上顎洞底挙上術を行い、粘膜下のスペースへ fibrin clot の移植を行い骨形成量を評価した。

4. 研究成果

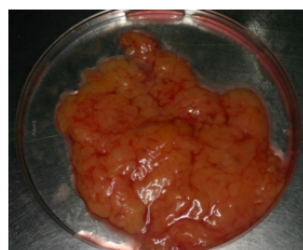
脂肪組織には高い増殖能と骨、軟骨等の複数

の系統へ分化能を有する adipose derived stem cells(ADSCs)が含まれており、今回この ADSCs と fibrin gel を用いた骨再生法の開発を目的として実験を行った。

採取した脂肪組織は細切れした後に 0.1 % コラゲナーゼ処理を行い、100 μ メッシュフィルターを用いて余分な脂肪組織を除去することで ADSCs を抽出することができた。次に、採取した ADSCs の骨系への分化能を invitro で検討した。培養 2 週の時点でアルカリフォスファターゼ活性は BMP-OS 群 > BMP 群 > OS 群 > control であった。これは arizarin red 染色でも同様の結果であった。一方で細胞増殖能は、各群間で有意差を認めなかった。In vivo での移植実験では BMP-OS 群で最も旺盛な骨形成を認め、BMP 群では BMP-OS 群より劣るものの骨形成を認めた。しかし OS 群と control では骨形成は認められず、ADSCs の骨芽細胞系への分化には BMP-2 の添加が有用であると考えられた。これは一方で ADSCs のみの移植では有効な骨形成が見込めないということが示唆された。また、細胞を用いないフィブリンゲルのみの移植による効果の検討した結果では、自己フィブリンを上顎洞のような閉鎖腔へ応用した場合、新生骨形成が確認され、これは自家骨や骨補填材の移植を必ずしも必要としないことであり、これはデンタルインプラントに伴うサイナスリフトにおける新たな可能性を示唆するものと思われた。しかし、上顎洞のような閉鎖腔でなければ同様の結果は見込みにくく、今後はやはり種々の細胞や成長因子とフィブリンを組み合わせることで、骨誘導能を持たせる工夫を行っていくことが必要であると思われた。

(1) 脂肪由来幹細胞の抽出

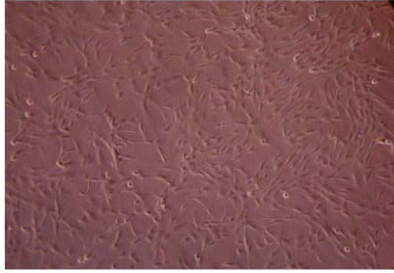
ADSCs は検討の結果上記の条件により採取可能であった。ADSCs の効率的な採取には図のごとくまず脂肪組織を可及的に細切れにすることが重要であると思われた。



脂肪細胞



コラゲナーゼを作用させた脂肪細胞



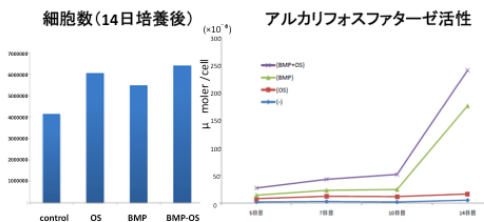
ADSCs ×100

(2) 脂肪由来幹細胞の骨芽細胞系への分化の検討

培養2週の時点でアルカリフォスファターゼ活性はBMP-OS群 > BMP群 > OS群 > controlであった。同様に Alizarin red 染色による検討でも上記結果を裏付ける内容の結果となった。

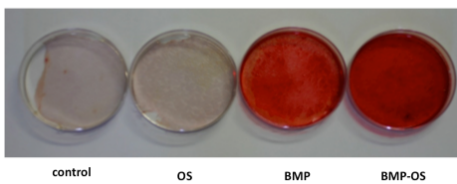
2.細胞数計測とアルカリフォスファターゼ活性

・BMP-OS, BMP, OS群で10日目以降に顕著なALP活性の増加が認められた



3; Alizarin red 染色

BMP, BMP-OS群にCa沈着の亢進を認めた

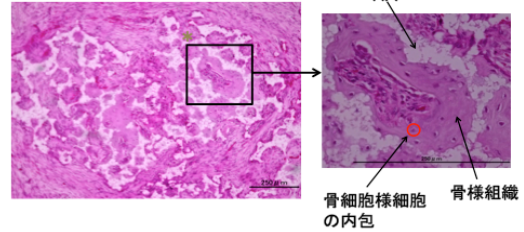


(3) 脂肪由来幹細胞の骨再生能の検討

In vivoでの移植実験ではBMP-OS群で最も旺盛な骨形成を認め、BMP群ではBMP-OS群より劣るものの骨形成を認めた。しかしOS群とcontrolでは骨形成は認められず、ADSCsの骨芽細胞系への分化にはBMP-2の添加が有用であると考えられた一方で、これはADSCsのみの移植では有効な骨形成が見込めないということを示唆するものであった。

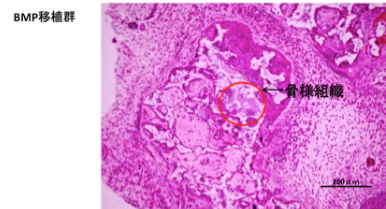
Histological appearance

・BMP-OS移植群で骨形成が観察された



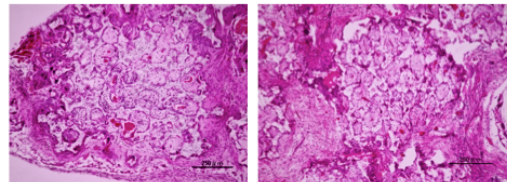
Histological appearance

BMP移植群ではわずかな骨形成が観察された



Histological appearance

OS, control移植群では明らかな骨形成は観察されなかった



OS移植群

Control群

(4) 自己 fibrin の骨再生へ応用の検討

自己フィブリンを上顎洞底挙上術の際に応用することで十分な新生骨形成が確認され、自家骨や骨補填材の移植を必ずしも必要としないことが示された。このことは臨床的に非常に大きな利点を有していると考えられた一方で、上顎洞のような閉鎖腔でなければ同様の結果は見込みにくく、今後はやはり種々の細胞や成長因子とフィブリンを組み合わせ、骨誘導能を持たせる工夫が必要であると思われた。

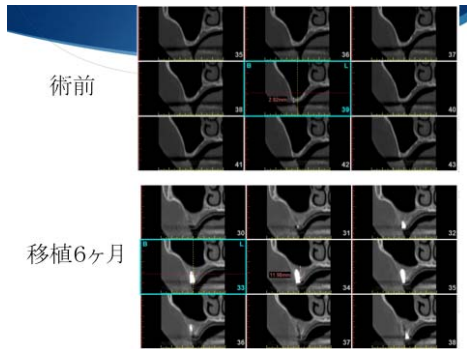


Table 1 Baseline characteristics of subjects and evaluation results of radiographic analysis and implant stability

Patient	Age	implant site	ridge width(mm)	pre-BH(mm)	post-BH(mm)	MBV(cc)	implant(mm)	HJ	IT(Nom)	ISQ
#1	82	19	7.3	4.9	11.2	0.40	4	13	189	20
	17	8.8	4.8	10.8			4	13	192	20
#2	85	18	6.6	2.8	13.7	1.41	4	11.8	218	28
	15	5.4	2.5	12.4			4	13	285	25
#3	64	14	7	2.8	12.2	0.94	4	13	272	20
	29	9.2	6.2	14.1			4	13	198	30
#4	70	18	7.4	4.8	13.8	0.82	4	13	204	20
	15	7.8	5.1	12.4			4	13	240	30
#5	53	18	9.8	4.8	12.4	0.77	4	13	205	30
	25	8	4.4	9.2	0.64	4	13	423	30	
#6	68	25	7.2	4.8	10.1		4	11.3	213	20
	17	6.5	6.1	10.9	0.39	4	11.5	403	30	
#7	28	7.8	4.3	12	0.56	4	11.5	713	30	
	27	8.8	5.1	9.1			4	11.5	589	20
#8	68	25	7.2	1.3	10.2	0.32	4	10	202	25
	Mean		7.46	4.88	11.78	0.70		12.28	323.47	23.42
SD			1.15	1.02	1.87	0.21		0.82	158.23	4.24

pre-BH: pre-implant bone height; post-BH: post-implant bone height; MBV: mean bone volume; HJ: horizontal distance; IT: vertical distance; ISQ: implant stability quotient; NED: not enough data

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)

Nobutaka Tajima, Seigo Ooba, Takashi Sawase, Izumi Asahina.

Evaluation of sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using platelet-rich fibrin as sole grafting material

International Journal of Oral & Maxillofacial Implants (査読:有)

(2012年2月 accepted 掲載巻、頁、未定)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田島 暢崇 (TAJIMA NOBUTAKA)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号: 00447492

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし