

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792263

研究課題名(和文) 臨床応用を目指したヒト脱分化脂肪細胞の骨組織再生における基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research of bone tissue regeneration using human dedifferentiated fat cells for clinical application

研究代表者

岸本 直隆 (KISHIMOTO, Naotaka)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50610911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：頬脂肪体から脱分化脂肪細胞(DFAT cells)と脂肪組織由来幹細胞(ASC)を獲得し、両細胞の骨芽細胞分化能を比較した。骨芽細胞分化マーカーである骨型アルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、カルシウム発現量はASCと比較してDFAT cellsにおいて有意に高い値を示した。頬脂肪体由来DFAT cellsは骨芽細胞分化能が高い細胞であり、骨組織再生におけるドナー細胞として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We isolated human dedifferentiated fat (DFAT) cells and adipose-derived stem cells (ASC) from the buccal fat pad, and evaluated and compared the osteoblastic differentiation ability. Bone-specific alkaline phosphatase, osteocalcin, and calcium as osteoblastic differentiation markers within DFAT cell cultures were significantly higher than those in ASC cultures. The osteoblastic differentiation ability of DFAT cells is higher than that of the ASC from the buccal fat pad. We consider that DFAT cells from the buccal fat pad are useful cell source for bone tissue engineering.

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：脱分化脂肪細胞 脂肪組織由来幹細胞 頬脂肪体 骨再生 組織工学 天井培養

1. 研究開始当初の背景

骨髄間葉系幹細胞 (bone marrow mesenchymal stem cells: BMSC), 脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cells: ASC) は骨組織工学において広く用いられ, その有用性が示されている。しかし, BMSC を採取するためには疼痛を伴う骨髄穿刺が必要であり, 手技も難しいと言った問題点がある。また BMSC と ASC は heterogeneous な細胞集団であり, 臨床応用における安全性を考慮した場合, より純度の高い幹細胞が必要である。

脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells: DFAT cells) はすべての年齢層から少ない侵襲で樹立可能で, 天井培養法を用いて作製されるため, 非常に純度の高い細胞集団である。また高い増殖性, 骨, 軟骨, 脂肪などの組織に分化する多能性を有し, 再生医療用ドナー細胞として期待されている。Matsumoto ら (J Cell Physiol. 2008; 215: 210-222.) は β -TCP/コラーゲン複合体を足場材料とし, ヒト DFAT cells をヌードマウス皮下に移植し, 異所性骨形成が認められたことを報告している。しかし, 骨欠損部位におけるヒト DFAT cells の骨組織再生能に関する報告はまだない。

2. 研究の目的

ヒト類脂肪体から獲得された DFAT cells の骨芽細胞分化能を他の間葉系幹細胞と比較し, 骨組織再生用ドナー細胞としての DFAT cells の有用性を評価すること。

3. 研究の方法

ヒト DFAT cells, ASC の樹立: 大阪歯科大学附属病院 (大阪歯科大学医の倫理委員会承認番号 110714) における口腔外科手術時に口腔内より採取された類脂肪体 (約 1 g) を細切し, コラーゲナーゼ溶液中で 37℃, 振

盪下で 1 時間処理する。得られた成熟脂肪細胞を通常培地 (DMEM + 20%FBS) で完全に満たされた 25 cm² フラスコに播種し, 脂肪滴を含む浮遊した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を上方にして, 37℃, 5%CO₂ の環境下で培養する (天井培養法, 図 1)。7 日後, 培地を除去し, 細胞がフラスコ底面に位置するようにフラスコを反対にし, 通常培養を開始する。上記のプロセスを経て獲得された細胞が DFAT cells である。また同一患者の類脂肪体から脂肪組織を遠心分離することで得られる stromal-vascular fraction (図 1) をフラスコに播種し, ASC を獲得する。

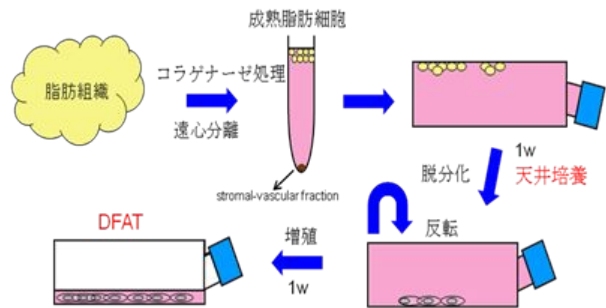


図 1: DFAT cells の樹立 (天井培養法)

in vitro における骨芽細胞分化能の評価: 獲得した DFAT cells, ASC の細胞表面抗原をフローサイトメトリーにて解析し, 得られた細胞集団が DFAT cells, ASC それぞれから成ることを確認する。次に DFAT cells を 12 well 細胞培養プレートに播種し, 骨分化誘導培地 (DMEM + 10%FBS, デキサメタゾン, β -グリセロリン酸, L アスコルビン酸 2-リン酸) 中で 14 日間培養する。また同一の条件下でヒト ASC の培養を行い, 細胞増殖能, 骨芽細胞分化能をヒト DFAT cells と比較する。細胞増殖能の評価として DNA の定量を行い, 骨芽細胞分化の評価として骨型アルカリフォスファターゼ (BAP), オステオカルシン (OCN), カルシウムの定量を行う。また骨分化誘導培地で培養した DFAT cells,

ASC のプレートを用いてアリザリンレッド染色を行い、骨芽細胞分化マーカー発現の有無を多方面から検討する。

4. 研究成果

フローサイトメトリーによる DFAT cells と ASC の細胞表面抗原はどちらも CD11b- (単球マーカー)、CD34 (造血幹細胞マーカー)、CD45- (白血球共通抗原)、CD90+ (間葉系幹細胞マーカー)、CD105+ (間葉系幹細胞マーカー) であり、どちらも間葉系幹細胞の性質を示していた。また CD11b、CD45 はどちらもネガティブであり、DFAT cells は ASC よりも異種細胞の混入が少ないという結果は得られなかった。

細胞増殖の指標である DNA 含量は培養開始 3 日目を除き、両細胞間に差はなく、細胞増殖能はほぼ同じ傾向であった。骨芽細胞分化マーカーである BAP、OCN、カルシウム発現量は骨分化誘導培地で培養した DFAT cells において、同培地で培養した ASC と比較して有意に高い値を示した。またアリザリンレッド染色では骨分化誘導培地で培養した DFAT cells のプレートにおいて ASC と比較して、カルシウムの沈着を示す赤く染色された範囲は大きかった (図 2)。

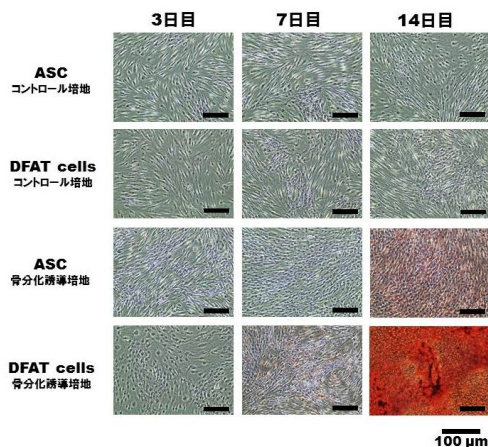


図 2 : アリザリンレッド染色
(Clin Oral Investig. 2013. In Press. 改変)

以上の結果から DFAT cells は ASC と比較して骨芽細胞分化能が高い細胞であることが示唆された。DFAT cells の骨芽細胞分化能が高い理由として、我々は当初両細胞の純度の違いによるものと考えていた。しかし、フローサイトメトリーによる結果から、DFAT cells は ASC と比較して純度が高いとの結果は得られなかった。骨芽細胞分化能の違いは現在解明されていないが、細胞の性質の違いも含めて今後解明していきたいと考えている。

本研究において脂肪組織採取部位として頬脂肪体を選択した。頬脂肪体は口腔内から局所麻酔下で、低侵襲に採取可能であり、口腔領域の専門家である歯科医師にとって採取におけるアドバンテージがあると考えている。また唯一体表面に傷をつけることなく脂肪組織が採取できる部位であり、採取後の審美性に優れている。上記のような利点を有する頬脂肪体から DFAT cells を獲得し、また ASC と比較して骨芽細胞分化能が高いことを証明した本研究の結果から、頬脂肪体由来 DFAT cells の骨再生用ドナー細胞としての有用性が明らかとなり、その意義は大きいと考えている。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

Kishimoto N, Momota Y, Hashimoto Y, Tatsumi S, Ando K, Omasa T, Kotani J. The osteoblastic differentiation ability of human dedifferentiated fat cells is higher than that of adipose stem cells from the buccal fat pad. Clin Oral Investig. 2013. In Press. 査読有

DOI: 10.1007/s00784-013-1166-1

Sakamoto F, Hashimoto Y, Kishimoto N,

Honda Y, Matsumoto N. The utility of human dedifferentiated fat cells in bone tissue engineering in vitro. Cytotechnology. 2013. In Press. 査読有
DOI: 10.1007/s10616-013-9659-y

〔学会発表〕(計 5 件)

岸本 直隆、ヒト類脂肪体由来脱分化脂肪細胞と脂肪幹細胞の細胞表面抗原解析、第 11 回日本再生歯科医学会学術大会、平成 25 年 8 月 31 日、東京

岸本 直隆、Comparison of Osteoblastic Differentiation Abilities in Dedifferentiated-Fat-Cells with Adipose-Stem-Cells 、 The 91st International Association for Dental Research General Session & Exhibition、平成 25 年 3 月 23 日、Seattle, Washington, USA

岸本 直隆、脱分化脂肪細胞を用いた顎骨再生におけるトランスレーショナル研究、第 29 回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い」、平成 25 年 1 月 12 日、東京

岸本 直隆、Osteoblastic Differentiation Ability is higher in Human Dedifferentiated Fat Cells than in Adipose Stem Cells、YABEC2012、平成 24 年 10 月 27 日、徳島

岸本 直隆、ヒト脱分化脂肪細胞は脂肪幹細胞より骨芽細胞分化能が高い、第 10 回日本再生歯科医学会学術大会、平成 24 年 9 月 2 日、神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

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・助教
研究者番号：50610911