

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893272

研究課題名(和文) 頬脂肪体由来脂肪幹細胞とナノハイドロキシアパタイトによる超短波骨再生

研究課題名(英文) A combination of low-intensity pulsed ultrasound and nanohydroxyapatite concordantly enhances osteogenesis of adipose-derived stem cells from buccal fat pad

研究代表者

長崎 理佳 (Nagasaki, Rika)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：30736616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：頬脂肪体由来脂肪幹細胞が骨欠損部に対し骨再生を認めること、さらにNHA(ナノハイドロキシアパタイト)添加とLIPUS(低出力超音波パルス)照射併用による相乗効果を認めることを明らかにするために、意図的に作製した骨欠損モデル動物で検討し、新生骨の程度を免疫組織学的定量評価をした。結果として、免疫組織学的解析を行ったところ、ヒト頬脂肪体由来脂肪幹細胞による新生骨の再生が観察された。また、NHA添加とLIPUS照射を併用することによってより優れた骨増生を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：That adipose-derived stem cells from buccal fat pad recognize the bone regeneration for bone defects, in order to clarify to admit a synergistic effect by further NHA (nano-hydroxyapatite) was added and LIPUS (Low Intensity Pulsed Ultrasound) irradiation in combination, discussed intentionally fabricated bone defect model animal, the degree of new bone was immunohistochemical quantitative evaluation. As a result, were subjected to immunohistochemical analysis, regeneration of new bone by adipose-derived stem cells from buccal fat pad was observed. Further, it was possible to find more dominant bone augmentation by combining the NHA added and LIPUS irradiation.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 骨 脂肪幹細胞

1. 研究開始当初の背景

脂肪幹細胞の供給源としての頬脂肪体

皮下組織由来の脂肪幹細胞を使用した組織再生研究は再生分野において注目され、精力的に行われている。近年、頬脂肪体は皮下組織脂肪に比べ、少量ながら効率よく脂肪幹細胞を分離することができる素材であることが明らかになった[E. Farre-Guasch et al. Tissue Engineering: Part C, Vol.16 1083-1094, 2010]。また、我々口腔外科医にとっては専門領域である口腔内から採取可能な頬脂肪体を脂肪幹細胞の供給源として使用できることは非常に大きな利点であると考えた。

申請者らは下顎枝矢状分割術時に摘出された頬脂肪体より実験に十分量の脂肪幹細胞を分離することに成功した(表1)。この細胞を *in vitro* 骨系細胞誘導し、NHA や LIPUS との相乗効果を検討したところ、NHA 添加と LIPUS 照射を併用した群が有為に良好な骨再生を認めた。

Age (years)	Weight of fat (g)	Cell number per weight (g)
18	4.5	3.9×10^4
33	2.6	7.7×10^4
18	4.7	5.5×10^4
42	4.0	6.5×10^4
37	3.4	2.0×10^4

表1 . 採取した頬脂肪体の重さ及び、分離した脂肪幹細胞の g あたりの数

in vitro 骨系細胞への分化誘導プロトコールは、cell 数 3×10^4 / 6well dish で細胞を播種し、骨分化誘導培地に NHA (ソフセラ社) を混合し、培養した。その後、LIPUS 照射群と非照射群に分け、培養開始 7、14、21 日目に細胞の形態を観察するとともに、骨形成関連遺伝子の発現および骨分化マーカーに関して定量的に解析、評価した。

これらの背景から申請者は、*in vivo*、すなわちヌードマウス骨欠損モデルを使用し、ヒト頬脂肪体由来脂肪幹細胞と NHA 添加に加え、LIPUS の照射も行うことにより、より効率的に骨の再生を誘導する研究を行う。

2. 研究の目的

幹細胞を利用した再生医療は臨床医学分野で非常に注目されている。近年では iPS 細胞から必要な分化誘導された細胞を利用することも行われているが、臨床現場で生体組織から供給される代表的幹細胞として脂肪幹細胞がある。腹部皮下組織などから簡便に採取され、かつ比較的大量に確保可能である。

また、再生の足場と成り得るハイドロキシアパタイト (HA) は歯牙・骨等の硬組織の主要成分であり、骨造成材料として既に整形・形成外科や歯科領域で臨床応用されている。さらに骨折修復時に超短波や低周波治療といった理学療法は従来の整復・固定術に組み合わせる事で骨修復の促進が図れる事が解っている。本研究では、頭頸部領域の各種疾患により形成された硬組織欠損の再生・再建に際して、頬脂肪体由来幹細胞を使用し、ハイドロキシアパタイトの中でもナノサイズ粒子形成によって表面積の増大が図られたナノハイドロキシアパタイト(NHA)添加を行い、さらに理学療法の1つである Low Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS)照射を組み合わせることにより、効率的な骨修復・再生手法を開発することにある。

3. 研究の方法

頬脂肪体由来脂肪幹細胞が骨欠損部に対し骨再生認めること、さらに NHA 添加と LIPUS 照射による相乗効果を認めることを明らかにするために(1)(2)の項目を解析する。

- (1) 頬脂肪体由来脂肪幹細胞および NHA、LIPUS 併用効果を、意図的に作製した骨欠損モデル動物で検討し、以下の項目で新生骨の程度を免疫組織学的定量評価。
- (2) 骨欠損部にチタン片を同時埋入し、チタン接触部位の骨新生やオッセオインテグレーションの様子を解析

研究期間内に明らかにすること

：頬脂肪体由来脂肪幹細胞に NHA 添加と LIPUS 照射を併用することにより、優位な骨増生を確認する

ヌードマウスの頭蓋冠に直径 5mm 程度の骨欠損を作製する骨欠損モデルを使用し、*in vivo* での脂肪幹細胞及び NHA、LIPUS 併用効果を検討する。

- ・脂肪幹細胞、NHA 添加、LIPUS 照射それぞれ単独
 - ・脂肪幹細胞 + NHA 添加
 - ・脂肪幹細胞 + LIPUS 照射
 - ・脂肪幹細胞 + NHA 添加 + LIPUS 照射
- のバリエーションを考慮する必要がある。

：インプラント治療を想定した検討

優れた骨再生が *in vitro* で認められたように三者併用(脂肪幹細胞 + NHA 添加 + LIPUS 照射)であった場合、その条件にインプラント埋入を想定したチタン片を骨欠損部に設置し、オッセオインテグレーションを含めた骨

再生を観察する。

- ・免疫組織学的検討
- ・コンピューター支援による定量的解析
- ・ μ CTによる画像解析

【研究計画・方法】

マウス頭頂骨骨欠損部

1)ヌードマウス頭頂骨に5mmの骨欠損を作製する。

その骨欠損部に以下の項目の移植を行う。

- ・脂肪幹細胞、NHA添加、LIPUS照射それぞれ単独
- ・脂肪幹細胞 + NHA添加
- ・脂肪幹細胞 + LIPUS照射
- ・脂肪幹細胞 + NHA添加 + LIPUS照射

分化誘導培地で誘導された脂肪幹細胞ペレット ($15 \times 10^4/10\text{cm dish}$) と 40nm以下のNHA150ugを新田ゼラチン社製のCellmatrixやアテロコラーゲンと混合し、骨欠損部に移植する。コントロールとしてマウス骨芽細胞(MC3T3-E1細胞)を混合したものも移植する。その後、LIPUS照射を、マウスが照射中に動いてしまわないように、イソフルレンによる吸入麻酔を施行しながら $60\text{mW}/\text{cm}^2$ 、 100Hz 、10分/日の条件で行う。

2)免疫組織学的解析

2週、4週、8週、12週、16週、24週目で組織切片を作製し、免疫染色(オステオカルシン、I型コラーゲン)H-E染色、Azan-MalloryおよびサフラニンO染色およびアルカリフォスファターゼ染色を行う。2週、4週、8週、12週、16週、24週目で脱灰標本を作製し、骨再生部における形成過程の変化や骨形成状態の観察、周囲骨組織の血管新生を観察し、骨芽細胞、歯骨細胞をはじめ血管内皮細胞の形態学的観察と共に下記骨再生に関与していると思われる関連タンパク質の免疫組織化学的解析を行う。検討タンパク質：I型コラーゲン、各種MMPの基質、基質分解酵素、EGF、TGF- β の骨形成関連タンパク質、VEGFなどの血管新生因子。

優れた骨再生が *in vitro* で認められたように三者併用(脂肪幹細胞 + NHA添加 + LIPUS照射)で認めた場合、その条件にインプラント埋入を想定したチタン片を骨欠損部に設置し、オッセオインテグレーションを含めた骨再生を観察する。

適正化されたタイミングで組織切片を作製。その後は以下のような項目を検討する。

- ・免疫組織学的検討
- ・コンピューターによる定量的解析
- ・ μ CTによる画像解析

4. 研究成果

LIPUSの照射は脂肪幹細胞の骨芽細胞様細胞への分化を促進し、NHAの添加はさらにその作用を相乗的に増加させ、ヒト類脂肪体由来脂肪幹細胞による新生骨の再生が免疫組織学的解析により観察された。

本研究において、LIPUSとNHAは相乗的に類脂肪体由来脂肪幹細胞の骨芽細胞様細胞への骨分化を促進し、ヒト類由来幹細胞による新生骨の再生も認めた。この結果は脂肪幹細胞の移植による骨再生のための新規治療法の可能性を示唆した。

また、本研究の最終的ゴールは頭頸部領域での加療に伴う硬組織欠損に対して、新規再生療法の開発にある。現在、骨欠損に対して他家骨移植もしくは自家骨移植材料を用いるのが一般的で、特に自家骨移植の場合、治療部位以外の手術侵襲による患者の負担を考慮する必要がある。顎顔面領域内で移植材料がまかなえ、さらにNHAやLIPUSを組み合わせることにより、より効率的な骨再生が確認できたため、非常に意義深いものと思われる。また、インプラント技術は、現在の頭頸部領域の機能再建において非常に有益で魅力的な選択肢の1つである。本研究によってインプラント再建への利点までは解明することができなかったため、今後研究を進めることによって明らかにできれば、より高度な骨欠損をもった患者のインプラント治療に対する可能性を広げることとなるだろう。

5. 主な発表論文等

Rika Nagasaki, *Yoshiki Mukudai, Yasumasa Yoshizawa, Masahiro Nagasaki, Sunao Shiogama, Maiko Suzuki, Seiji Kondo, Satoru Shintani, and Tatsuo Shiota. A Combination of Low-Intensity Pulsed Ultrasound and Nanohydroxyapatite Concordantly Enhances Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells From Buccal Fat Pad. *Cell Medicine*, Vol. 7, pp. 123-131, 2015

(査読あり原著論文)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長崎 理佳 (NAGASAKI, Rika)

昭和大学歯学部・

口腔外科学講座 顎顔面外科学部門

(研究者番号：30736616)

(2) 研究協力者

代田 達夫(SHIROTA, Tatsuo)

昭和大学歯学部・

口腔外科学講座 顎顔面外科学部門

(同：60235760)

近藤 誠二(KONDO, Seiji)

同上

(同：10432634)

椋代 義樹(MUKUDAI, Yoshiki)

同上

(同：50325099)