



Title	脂肪組織由来多系統前駆細胞移植による歯周組織再生療法の開発
Author(s)	沢田, 啓吾
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34353
rights	©2015. This manuscript version is made available under the CC-BY-NC-ND 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

脂肪組織由来多系統前駆細胞移植による
歯周組織再生療法の開発

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻（歯周病分子病態学）

沢田 啓吾

（指導教官：村上 伸也 教授）

緒言

歯周組織は歯槽骨・セメント質・歯肉・歯根膜から構成され、歯を顎骨に強固に支持している。歯周病は細菌バイオフィルム（デンタルプラーク）が原因となり発症する感染症であり、病気の進行に伴い歯周組織を破壊していく慢性炎症疾患と位置付けられる。歯周治療の原則は、その原因となるデンタルプラークや歯石を歯根表面の壊死セメント質と共に機械的に除去し、さらに歯根周囲の炎症肉芽組織を除去することにより、歯周組織における炎症の軽減・消褪をはかることである。このような原因除去療法により、歯周病の進行を抑制することはできるが、歯周病により破壊された歯周組織を再生させることはきわめて困難であるといわざるをえない。そのため、歯周病により失われた歯周組織の再生誘導を目的として、いくつかの治療法が臨床応用されている。

その具体例としては、自家骨を移植する骨移植、生体親和性膜を用いる組織再生誘導法（Guided tissue regeneration 法：GTR 法）、豚歯胚からの抽出物であるエナメル基質由来タンパク（Enamel matrix derivative：EMD）の局所投与などがあげられる。さらに、これらに加えて歯周組織欠損部にヒト型リコンビナントサイトカインを局所投与することにより、歯周組織再生を積極的に誘導しようとする新たな治療法の開発が試みられている。アメリカでは、血小板由来増殖因子（Platelet-derived growth factor：PDGF）と骨伝導性足場材であるβ-リン酸三カルシウム（β-tricalcium phosphate：β-TCP）を併用したデバイスの歯周組織再生誘導効果が臨床試験で評価され、2005年にアメリカ食品医薬局（FDA）の承認を受け、商品化されている¹⁾。また、我々の研究室では、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor-2：FGF-2）に着目し、FGF-2を歯周組織欠損部に局所投与することにより、失われた歯周組織の再生を誘導する新規歯周組織再生療法の開発に取り組み²⁻⁴⁾、現在臨床応用を目指して、既に第Ⅱ相臨床試験が終了し^{5,6)}、現在第Ⅲ相臨床試験において、その有効性と安全性が評価されている。

前述の GTR 法や EMD、サイトカインの局所投与による歯周組織再生療法はすべて、内在性の歯周組織幹細胞のもつ自己修復力を活性化することにより、歯周組織の再生をはかる治療法と捉えることができる。一方、生体内の幹細胞数は加齢とともに減少し、歯周組織においても内在性幹細胞の増殖能や分化能が低下することが報告されている⁷⁾。また、重度歯周疾患に罹患した歯周組織に

においては、組織破壊により内在性の幹細胞数が減少するため、十分な組織再生誘導効果が期待できない。そこで、歯周組織欠損部に他組織から採取した幹細胞を移植する「細胞治療」が必要となる。

「細胞治療」とは、組織再生に中心的な役割を果たす幹細胞を組織欠損部位に補充することで、組織再生を誘導することを目的とした治療法である。細胞治療の実施において、移植に用いる幹細胞の選択は重要な課題である。その候補としては、胚性幹細胞（Embryonic Stem cells：ES 細胞）、人工多能性幹細胞（Induced Pluripotent Stem cells：iPS 細胞）、体性幹細胞などがあげられる。ES 細胞や iPS 細胞に関しては、倫理的な問題、腫瘍化等の安全面での問題など、まだ克服すべき問題が多く残されている^{8,9)}。そのため現時点では、患者自身の体より採取された体性幹細胞、特に間葉系幹細胞を用いた臨床研究が数多く実施されている¹⁰⁾。また、間葉系幹細胞移植による組織再生メカニズムについても、その詳細が明らかになりつつある。これまでは、主に移植した間葉系幹細胞が組織を構成する各種細胞に直接分化することで、移植部位の組織再生に寄与する Repair 効果が中心的な役割を担うと考えられてきた。しかしながら、近年、Repair 効果に加えて、移植した間葉系幹細胞が成長因子やサイトカインを分泌することにより、移植部位の組織再生を活性化する Trophic 効果の存在が示されている^{11,12)}。

歯周組織再生療法の研究領域において、細胞治療による効果が報告されているのは、骨髓由来間葉系幹細胞¹³⁾、歯根膜細胞¹⁴⁾、歯槽骨骨膜細胞¹⁵⁾を用いた治療法である。しかしながら、歯根膜細胞や歯槽骨骨膜細胞は、採取可能な組織量に制限があり、骨髓由来間葉系幹細胞は、採取時の侵襲性が高く、増幅効率が低いことが問題とされている¹⁶⁻¹⁸⁾。

このような問題点を解消する幹細胞源として、脂肪組織中の幹細胞の利用が期待されている。脂肪組織に存在する間葉系幹細胞は、他組織由来の間葉系幹細胞と比較して、低侵襲で比較的簡単に採取が可能であり、自己複製能・増殖能が高いこと¹⁷⁻¹⁹⁾や液性因子^{20,21)}を多く産生することが知られている。また、前臨床研究において、骨・軟骨などの中胚葉性の細胞だけでなく、内胚葉性や外胚葉性の細胞への分化能も有することが報告されている^{22,23)}。さらに、ヒトでの臨床研究において、脂肪組織由来間葉系幹細胞の自己移植により、尿道括約筋の機能改善効果²⁴⁾、頭蓋骨欠損²⁵⁾や上顎骨や下顎骨欠損^{26,27)}における骨再生効果、腸皮膚瘻²⁸⁾や気管瘻²⁹⁾の閉鎖効果をはじめとする多様な組織での再生

誘導効果が報告されている。

そこで、本研究では、Okura らの方法³⁰⁻³³⁾に準じて脂肪組織から単離した脂肪組織由来多系統前駆細胞 (Adipose tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cells: 以下、ADMPC と略す) を新規歯周組織再生療法の細胞源として着目し、イヌ実験的歯周病モデルにおける ADMPC 移植による歯周組織再生誘導効果を検討した。さらに、ADMPC が分泌する液性因子が歯周組織再生に重要な役割を担う歯根膜細胞の細胞機能に与える影響について検討を加えた。

材料および方法

1. 試薬

Human Recombinant Insulin-like Growth Factor Binding Protein 6（以下、IGFBP6 と略す：R&D、Minneapolis、MN、USA）を実験に供じた。

2. ADMPC の単離

ヒトからの ADMPC の単離は、大阪大学歯学部附属病院において、十分なインフォームドコンセントの上、本実験の主旨を理解し協力に同意を得た患者から皮下脂肪組織を採取することにより行った。すなわち、採取した脂肪組織 10 ml を 60 μ g/ml カナマイシン（以下、KM と略す：和光純薬工業、大阪、日本）含有リン酸緩衝生理食塩水（以下、PBS と略す：和光純薬工業）にて 2 回洗浄した後、洗浄後の脂肪組織に 0.25 % コラゲナーゼ (SIGMA-ALDRICH、St. Louis、MO、USA) 含有 PBS を 20 ml 添加し、恒温槽にて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間振盪した。脂肪組織分解産物を 2 本のチューブに等量に分注し、20 % 牛胎仔血清（以下、FCS と略す：ニチレイバイオサイエンス、東京、日本）、60 μ g/ml KM 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose（以下、DMEM-HG と略す：Gibco、Grand Island、NY、USA）を 15 ml ずつ各チューブに添加し、遠心分離（400 G、室温、10 分間）を行った。上清を吸引除去した後、10 % FCS、60 μ g/ml KM 含有 DMEM-HG を各チューブに 15 ml 添加し、懸濁した。懸濁液を 15 ml の Histopaque (SIGMA) が入ったチューブに積層し、室温にて遠心分離（20 G、3 分間→60 G、3 分間→180 G、3 分間→300 G、3 分間→570 G、20 分間）を行った。幹細胞を含む中間層を回収し、回収量の 2 倍量の PBS にて懸濁し、遠心分離（400 G、4 $^{\circ}$ C、5 分間）を行った。遠心分離後、上清を吸引除去し、10 % FCS、60 μ g/ml KM 含有 DMEM-HG を各チューブに 10 ml 添加し、合計 20 ml の細胞懸濁液を作製した。同懸濁液を 40 μ m セルストレーナー

(Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ、USA) を用いて濾過後、100 mm 細胞培養ディッシュ (Corning、NY、USA) に播種した。24 時間の培養後、浮遊した細胞を PBS で洗浄後、エチレンジアミン四酢酸（以下、EDTA と略す：ナカライテスク、京都、日本）を作用させ、剥離した細胞を ADMPC とした。なお、本研究におけるヒト ADMPC の単離は、大阪大学歯学部附属病院倫理審査委員会の承認（承認番号：H22-E21-1）を得て行った。一方で、ビーグル犬

の大網組織から脂肪組織を採取し、イヌ ADMPC の単離を行った。50～56 ヶ月齢のメスビーグル犬（北山ラベス、長野、日本）の背部に、導入麻酔として 1 ml キシラジン塩酸塩：セラクター®（バイエル薬品、東京、日本）を皮下投与し、15 分後、ペントバルビタールナトリウム：ソムノペンチル（共立製薬、東京、日本）を橈側皮静脈から 10 mg/kg の用量で投与することで、全身麻酔を行った。開腹下にて腹腔内側にある内臓脂肪である大網組織を採取し、ヒト ADMPC の単離方法に従い、イヌ ADMPC を単離した。なお、本実験におけるすべての動物実験は、大阪大学歯学研究科動物実験委員会の承認（承認番号：動歯-19-061-0）を得て行った。

3. 細胞培養

ADMPC の培養は、40 %MCDB-201 (SIGMA)、10 µg/ml Epidermal Growth Factor (Peprotech、Hamburg、Germany)、1 nM デキサメタゾン (SIGMA)、100 mM アスコルビン酸（和光純薬工業）、5 %FCS、60 µg/ml KM を含有した Dulbecco's Modified Eagle Medium-low glucose（以下、DMEM-LG と略す：Gibco、Grand Island、NY、USA）を Expansion-Medium（以下、Exp-Med と略す）として用い、100 mm フィブロネクチンディッシュ（BD）上で行った。ヒト歯根膜細胞（以下、HPDL と略す）およびヒト脂肪由来間葉系幹細胞は、Lonza 社（Basel、Switzerland）より入手した。HPDL の培養には、10 %FCS、60 µg/ml KM 含有 α -MEM（和光純薬工業）及び 100 mm 細胞培養ディッシュを用い、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞の細胞培養には、10 %FCS、60 µg/ml KM 含有 DMEM-HG 及び 100 mm フィブロネクチンディッシュを用いた。いずれの細胞も継代培養は 0.05 %Trypsin-EDTA 含有 PBS を用いて行い、継代数 4 から 8 の細胞を以下の実験に供じた。

4. 培養上清の回収

ADMPC を 100 mm フィブロネクチンディッシュに 1.0×10^6 個播種し、Exp-Med を用いて培養を行い、サブコンフルエントになった時点で、10 %FCS および 60 µg/ml KM 含有 DMEM-HG に培地交換を行い、3 日後に培養上清を回収し、これを ADMPC-Conditioned Medium（以下、ADMPC-CM と略す）とした。なお、Lonza 社の脂肪由来間葉系幹細胞からも、同一の方法で培養上清を回収した。

5. フローサイトメトリーによる間葉系幹細胞マーカーの発現解析

細胞は、0.05 %Trypsin-EDTA 含有 PBS 処理にて回収後、1 %ウシ血清アルブミン (SIGMA)、0.1 %アジ化ナトリウム (和光純薬工業) 含有 PBS (以下、FACS buffer と略す) にて洗浄したのち、5 ml ポリスチレンラウンドチューブ (BD) に 1.0×10^5 個遠心沈殿させた。その後、FITC 標識マウス IgG1-抗イヌ CD29 (EXBIO、Vestec、Czech Republic)、FITC 標識ラット IgG2a-抗イヌ CD44 (eBioscience、San Diego、CA、USA)、FITC 標識マウス IgG1 アイソタイプコントロール抗体 (eBioscience)、FITC 標識ラット IgG2a アイソタイプコントロール (eBioscience) をそれぞれ至適濃度にて添加し反応 (4 °C、30 分間) させた。

一方で、一次抗体としてラット IgG2b-抗イヌ CD90 (AbD Serotec、Oxford、UK)、マウス IgG1-抗ヒト CD105 (BD)、ラット IgG2b アイソタイプコントロール (eBioscience)、マウス IgG1 アイソタイプコントロール (eBioscience) を、それぞれ至適濃度にて添加し、反応 (4 °C、30 分間) させたのち、FACS Buffer にて 3 回洗浄後、二次抗体として、FITC 標識ラット抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (eBioscience)、FITC 標識マウス抗ラット IgG ポリクローナル抗体 (eBioscience) をそれぞれ至適濃度にて添加し、反応 (4 °C、30 分間) させた。

いずれも反応終了後、FACS Buffer にて 3 回洗浄し、再懸濁後、BD FACS Calibur (BD) およびソフトウェア BD Cell Quest Pro (BD) を用いて蛍光強度を測定、解析した。

6. 分化誘導

イヌ ADMPC の硬組織形成細胞への分化誘導は、細胞を 12 穴細胞培養プレート (Corning) に 5.0×10^4 個/well および 6 穴細胞培養プレート (Corning) に 2.5×10^4 個/well となるように播種し、3 日後に 10 mM β -グリセロリン酸 (和光純薬工業)、50 μ g/ml アスコルビン酸 (和光純薬工業)、0.1 μ M デキサメタゾン (SIGMA) を添加した石灰化誘導培地 (以下、M-Med と略す) に交換し、以後 3 日ごとに培地交換することにより行った。脂肪細胞への分化誘導は、10 %FCS および 60 μ g/ml KM 含有 DMEM-LG を用いて、硬組織形成細胞への分化誘導と同一条件で、細胞を播種した。3 日後に 500 μ M イソブチルメチルキサンチン (SIGMA)、200 μ M インドメタシン (SIGMA)、10 μ M インシュリン (SIGMA)、1 μ M デキサメタゾン、5 %FCS、60 μ g/ml KM を含有する脂肪細

胞分化誘導培地（以下、Ad-Med と略す）に交換し、以後 3 日ごとに培地交換することにより行った。軟骨細胞への分化誘導は、10 %FCS および 60 $\mu\text{g/ml}$ KM 含有 DMEM-LG を用いて、硬組織形成細胞への分化誘導と同一条件で細胞を播種した。3 日後に 10 ng/ml トランスフォーミング増殖因子- $\beta 1$ （以下、TGF- $\beta 1$ と略す：SIGMA）、6.25 ng/ml インシュリン、0.1 μM デキサメタゾン、50 μM アスコルビン酸、1 %FCS、60 $\mu\text{g/ml}$ KM を含有する軟骨細胞分化誘導培地（以下、Ch-Med と略す）に交換し、以後 3 日ごとに培地交換することにより行った。また、HPDL の硬組織形成細胞への分化誘導は、細胞を 12 穴細胞培養プレートに 1.0×10^5 個/well および 6 穴細胞培養プレートに 2.0×10^5 個/well となるように播種し、3 日後に、10 mM β -グリセロリン酸、50 $\mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸を添加した α -MEM に交換し、以後 3 日ごとに培地交換することにより行った。

7. 全 RNA の抽出および相補鎖 DNA（以下、cDNA と略す）の作製

培養細胞からの全 RNA 抽出には、核酸抽出試薬 RNA-Bee（TEL-TEST、Friendwood、TX、USA）を用いた。抽出・精製した全 RNA を鋳型として、Random Hexamer Primer（Amersham Pharmacia Biotech、Milwaukee、WI、USA）、M-MLV（Invitrogen、Carlsbad、CA、USA）を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

8. Real-time PCR 法による遺伝子発現解析

Real-time PCR 法による解析は、cDNA を鋳型として、表 1 に示す各遺伝子特異的な Real-time PCR 用プライマー（タカラバイオ、滋賀、日本および Gene design、大阪、日本）を用いて行った。PCR 反応は Fast SYBR® Green Master Mix（Applied Biosystems、Foster City、CA、USA）を用いて、Step One Plus Real-time PCR System（Applied Biosystems）にて行った。なお、各遺伝子の発現量は、*Hypoxanthinephosphoribosyltransferase* (*hprt*) をコントロール遺伝子として同遺伝子の発現量に対する相対量として算出した。

表 1 本研究で使した Real-time PCR 用プライマーの一覧

Gene (Dog)		Primer sequence
<i>Runt related transcription factor 2 (RUNX2)</i>	F	5'-TCATGGCGGGTAACGATGAA-3'
	R	5'-TCCGGCCACAAATCTCAG-3'
<i>COL1A2</i>	F	5'-GCACATGCCGAGACCTGAGA-3'
	R	5'-GCATCCATAGTGATCCTTGTTAG-3'
<i>Bone sialoprotein (BSP)</i>	F	5'-TGGAGATGGTGACAGCTCAGAAG-3'
	R	5'-TCCATAGCCAGGTGTAGCAGAGA-3'
<i>Periodontal ligament-associated protein-1 (PLAP-1)</i>	F	5'-TGCTCTGCCAAGCCATCATC-3'
	R	5'-GGTCGCCATCCATTTCATCTC-3'
<i>Leptin</i>	F	5'-CTATCTGTCTGTGTGAAGCTG-3'
	R	5'-GTGTGTGAAATGTCATTGATCCTG-3'
<i>Lipoprotein lipase (LPL)</i>	F	5'-ACACATTCAACAAGGGGTCACC-3'
	R	5'-CTCTGCAATCACACGGATGGC-3'
<i>SOX9</i>	F	5'-GCTCGCAGTACGACTACACTGAC-3'
	R	5'-GTTTCATGTAGGTGAAGGTGGAG-3'
<i>Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)</i>	F	5'-GTGGTGGACAAGATTGATGTG-3'
	R	5'-CACCCAGTTGGGATCTATCTG-3'
<i>HPRT</i>	F	5'-GGAGCATAATCCAAGATGGTCAA-3'
	R	5'-TCAGGTTTATAGCCAACACTTCGAG-3'

Gene (Human)		Primer sequence
<i>alkaline phosphatase (ALP)</i>	F	5'-GGACCATTCACGCTTTCAC-3'
	R	5'-CCTTGTAGCCAGGCCATTG-3'
<i>RUNX2</i>	F	5'-CACTGGCGCTGCAACAAGA-3'
	R	5'-CATTCGGAGCTCAGCAGAAATAA-3'
<i>COL1A1</i>	F	5'-CTGCCGTGACCTCAAGATGTG-3'
	R	5'-CACCAGTCTCCATGTTGCAGAAG-3'
<i>BSP</i>	F	5'-CTGGCACAGGGTATACAGGGTTAG-3'
	R	5'-GCCTCTGTGCTGTGGTACTGGT-3'
<i>HPRT</i>	F	5'-GGCAGTATAATCCAAGATGGTCAA-3'
	R	5'-GTCAAGGGCATATCCTACAACAAAC-3'
<i>IGFBP6</i>	F	5'-AACCGCAGAGACCAACAGAG-3'
	R	5'-TTGGGCACGTAGAGTGTGTTG-3'

9. アリザリンレッド染色による石灰化ノジュール形成能の検討

石灰化ノジュール形成能の検討は、Dahl の方法³⁴⁾に準じて行った。すなわち、細胞を硬組織形成細胞へと分化誘導した後、培養上清を除去、細胞層を PBS にて 2 回洗浄を行い、100 %エチルアルコール（和光純薬工業）にて固定（4 °C、10 分間）した。1 %アリザリンレッド S（和光純薬工業）、0.1 %水酸化アンモニウム（和光純薬工業）水溶液（pH 6.4）にて染色（室温、5 分間）した後、蒸留水にて洗浄した。染色像は、カラーイメージスキャナ GT-X750（エプソン、東京、日本）にて画像データとして取り込み、その後、画像解析ソフトウェア WinRoof（三谷商事、福井、日本）にて解析を行い、染色部面積率および色濃度を数値化し、その積を石灰化ノジュールの形成度として算出し評価した。

10. Oil Red O 染色による脂肪滴形成能の検討

ADMPC の脂肪滴形成能の検討は、Lillie と Ashburn の方法³⁵⁾に準じて行った。すなわち、細胞を Ad-Med にて培養を行った後、培養上清を除去、PBS に

て2回洗浄を行い、10%中性緩衝ホルマリン（和光純薬工業）にて固定（室温、10分間）を行った。PBSで2回洗浄した後、60%イソプロパノール（和光純薬工業）にて1分間処理し、Oil Red O 染色液（武藤化学、東京、日本）を加え、染色（室温、10分間）した。60%イソプロパノールにて1回洗浄した後、PBSで2回洗浄し、光学顕微鏡（Nikon、東京、日本）を用いて脂肪滴の形成を評価した。

11. イヌ実験的歯周病モデルの作製および ADMPC-ボルヒール®複合体の移植

50～56ヶ月齢のメスビーグル犬の下顎第三、第四前臼歯に2級分岐部歯周病モデルを作製した。すなわち、脂肪組織採取時と同一の方法にて全身麻酔を行い、口腔内をハイカットガーゼ（ニチエイ、大阪、日本）にて清拭した後、歯科用キシロカイン（デンツプライ三金、東京、日本）を片顎に対して1.8 ml 使用し、浸潤麻酔を行った。その後、第二前臼歯から第四前臼歯まで歯肉溝切開を行い、粘膜骨膜弁を形成した。第三、第四前臼歯の頬側根分岐部に頬舌径 3 mm、垂直径 4 mm の人工的 2 級根分岐部骨欠損を歯科用切削バーMGST36HP016（ベルデンタサプライ、兵庫、日本）および MGST36RA016（ベルデンタサプライ）を用いて作製し、歯科用シリコン印象材パテタイプ（GC、東京、日本）を填入し、分岐部が露出しないように、粘膜骨膜弁を復位した後、ゴアテックススーチャー®（W. L. Gore and Associates、Newark、DE、USA）を用いて単純縫合を行った。骨欠損作製 4 週後に、同一の方法にて全身麻酔を行い、歯科用キシロカインにて浸潤麻酔後、前述の部位に再度粘膜骨膜弁を形成した。シリコン印象材および肉芽組織を搔爬・除去し、骨欠損に面した歯根表面に対し、グレーシーキュレット（Hu-Friedy、Chicago、IL、USA）およびトゥースプレーニングバー（東京歯材社、東京、日本）を用いてルートプレーニングを行った。また、骨欠損作製部における近心根および遠心根の最下端部に、MGST36RA016を用いて、Notch を作製した。ADMPC の移植に際しては、生体組織接着剤として臨床応用されているフィブリン製剤のボルヒール®（アステラス製薬、東京、日本）を足場材として用いた。すなわち、ボルヒール®のフィブリノゲン液、トロンビン液をそれぞれ ADMPC の細胞懸濁液で 6 倍希釈し、各希釈液を等量混和することで最終密度 5.7×10^6 個/160 μ l の ADMPC-ボルヒール®複合体を作製した。また、コントロールとしては、ボルヒール®のフィブリノゲン液、トロンビン液を PBS で 6 倍希釈し、混和したものを用いた。骨欠損

の試験側に ADMPC-ボルヒール®複合体を、対照側にボルヒール®を移植後、ゴアテックススーチャー®を用いて緊密に縫合を行った。術後は、グルコン酸クロルヘキシジン液：マスキン®（丸石製薬、大阪、日本）で口腔内を噴霧消毒し、さらに、アンピシリンナトリウム：注射用ビクシリン®（明治製菓、東京、日本）を 60-80 mg/頭の用量で 1 週間背部皮下に投与した。細胞移植 6 週後に前述の方法で全身麻酔を行った後、頸動脈にカテーテルを挿入し放血屠殺後、下顎骨を採取し、以下の解析に供じた。

12. マイクロ CT 断層撮影および解析

ビーグル犬より採取した下顎骨は、4 %パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液（pH 7.4 : Sigma）を用いて浸漬固定を 2 週間行い、マイクロフォーカス X 線 CT 装置 : ScanXmate-E090S40 *in vivo*（コムスキャンテクノ、神奈川、日本）を用いて断層撮影を行い、ソフトウェア Xsys（コムスキャンテクノ）およびソフトウェア FanCT（コムスキャンテクノ）を用いて再構成および三次元構築を行った。さらに、新生骨を定量的に評価するために、三次元画像解析ソフトウェア TRI/3D-BON（ラトックシステムエンジニアリング、東京、日本）を用いて、骨欠損作製範囲における新生骨体積の解析を行った。

13. 組織標本の作製および組織形態学的評価

浸漬固定後の組織ブロックの脱灰処理を行うために、900 ml/l 蒸留水、100 ml/l ギ酸（和光純薬工業）、29 g/l クエン酸（和光純薬工業）、18 g/l クエン酸三ナトリウム二水和物（和光純薬工業）を用いて、10 %ギ酸クエン酸ナトリウム脱灰液を作製した。2 ヶ月間の脱灰処理後、通法に従いパラフィン包埋した。組織ブロックは矢状方向に舌側から薄切し、骨欠損作製部に達してから、さらに 750 μ m 切り進んだ位置で組織標本の作製を行った。その後、通法に従ってアザン染色液（武藤化学）にて染色を行い、組織形態学的評価を行った。組織標本の形態計測は、画像解析ソフトウェア WinRoof（三谷商事）を用いて行った。骨欠損底部から根面上に沿って再生したセメント質の長さ（以下、新生セメント質長とする）及び骨欠損作製部の根面上の長さ（以下、欠損部根面長とする）を計測し、新生セメント質長を欠損部根面長で割ることで、新生セメント質形成率を算出した。

14. 細胞増殖能の検討

HPDL の細胞増殖は、血球計算盤にて細胞数を計算することにより検討した。すなわち、6 穴細胞培養プレートに HPDL を 2.5×10^4 個/well となるように播種し、6 時間後に、培地を吸引除去し、ADMPC-CM あるいは DMEM-HG を 50 %の比率で α -MEM と混和した培地にて培養し、播種後 4 日目まで毎日計測を行った。

15. アルカリフォスファターゼ（以下、ALP と略す）活性の測定

HPDL の ALP 活性の測定は、Bessey らの方法³⁶⁾に準じて行った。すなわち、細胞の培養上清を除去した後、細胞層を PBS にて 2 回洗浄し、0.01 M トリス (SIGMA) -塩酸 (和光純薬工業) 緩衝溶液 (以下、Tris-HCl と略す、pH 7.4) を添加後、Handy Sonic model UR-20P (トミー、東京、日本) にて超音波破碎したのちに細胞破碎液を回収し、遠心処理 (280 G、4 °C、5 分間) 後に得られた上清を測定に供じた。上清に 0.006 %ポリ (オキシエチレン) オクチルフェニルエーテル (n=10、和光純薬工業)、0.5 mM 塩化マグネシウム (MgCl_2)、0.5 M Tris-HCl (pH 9.0) となるよう各溶液を混和した後、基質として 0.5 mM パラニトロフェニル-2-リン酸ナトリウム (以下、pNPP と略す：和光純薬工業) を添加した。pNPP 添加後、室温にて 60 分間反応させたのち、0.2 M 水酸化ナトリウム (和光純薬工業) 水溶液を添加することにより反応を停止させた。同溶液の波長 405 nm における吸光度を Bio-Rad Model 550 Microplate Reader (Bio-Rad、Hercules、CA、USA) にて測定した。なお、標準曲線の作成にはウシ腸管粘膜由来 ALP (SIGMA) を用い、pH 9.8、37 °C にて毎分 1 μmol の pNPP を加水分解する酵素活性を 1 Unit とし、DNA 量 1 μg 当たりの Unit 値で示した。

16. ADMPC 培養上清中の成長因子の解析

Human growth factor array[®] (RayBiotech、Norcross、GA、USA) を用いて、ADMPC-CM 中に含まれる成長因子のスクリーニングを行った。なお、Control としては、10 %FCS および 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KM 含有 DMEM-HG を用いた。すなわち、ADMPC-CM を反応させたメンブレンを Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare、Fairfield、CT、USA) にて撮影し、画像解析ソフトウェア Image Quant TL (GE) を用いてメンブレン上の各ドットの濃度を測定することで、

ADMPC-CM に含まれる成長因子のスクリーニング解析を行った。また、ADMPC-CM 中の IGFBP6、Hepatocyte Growth Factor (以下、HGF と略す)、Vascular Endothelial Growth Factor (以下、VEGF と略す) 濃度は ELISA-Kit (RayBiotech) を用いて、定量的に解析を行った。

17. IGFBP6 siRNA の導入

10 % FCS 含有 DMEM-HG を用いて、ADMPC を 12 穴細胞培養プレートに 1.0×10^5 個 /well とするよう播種し、10 nM IGFBP6 siRNA (5'-GCCCAAUUGUGACCAUCGAtt: Ambion, Carlsbad, CA, USA)、10 nM Silencer® Select Negative Control siRNA (Ambion) を共に Lipofectamine® (Ambion) 存在下にて、reverse transfection 法にて導入した。siRNA 導入を行った 24 時間後に、RNA および培養上清を回収すると同時に、10 %FCS および 60 µg/ml KM 含有 DMEM-HG に培地交換を行った。siRNA 導入後 72 時間までの RNA と培養上清を 24 時間毎に回収し、IGFBP6 の mRNA レベルでの発現を Real-time PCR 法で、タンパクレベルでの発現を ELISA 法で解析した。一方で、100 mm フィブロンекチンディッシュに ADMPC を 5.0×10^5 個/dish の条件で播種する際に、前述の濃度で IGFBP6 siRNA、Silencer® Select Negative Control siRNA をそれぞれ Lipofectamine®存在下にて、reverse transfection 法にて導入した。siRNA 導入を行った 24 時間後に、10 %FCS および 60 µg/ml KM 含有 DMEM-HG に培地交換を行い、その 72 時間後に上清を回収し、これを IGFBP6 siRNA transfection Conditioned Medium (BP6 si-CM) とした。なお、Control siRNA を導入した上清を Control siRNA transfection Conditioned Medium (Con si-CM) とした。

18. 統計学的解析

実験データは平均値 ± 標準誤差で示した。有意差検定は、2 群比較は Mann-Whitney 検定を、多群比較は Tukey 検定を用いて行い、有意水準を 5 % に設定し、*p* 値が有意水準を下回る場合に有意差ありと判断した。

結果

1. イヌ ADMPC における間葉系幹細胞マーカーの発現解析

ビーグル犬の大網組織より単離した ADMPC における間葉系幹細胞マーカーの発現について検討を行うために、CD29、CD44、CD90、CD105 各分子の特異抗体を用いてフローサイトメトリー法にて解析した。その結果、ADMPC において CD29、CD44、CD90 が陽性、CD105 が陰性であることが明らかとなった。この発現プロファイルは、これまでに報告されているイヌ間葉系幹細胞マーカーの発現³⁷⁻³⁹⁾と一致しており、本研究にて大網組織から単離した ADMPC が間葉系幹細胞マーカーを発現していることが確認された。

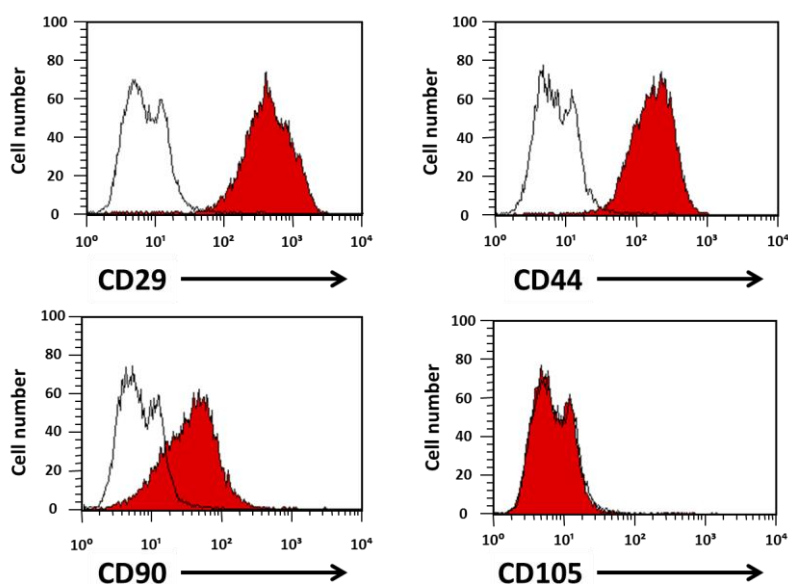


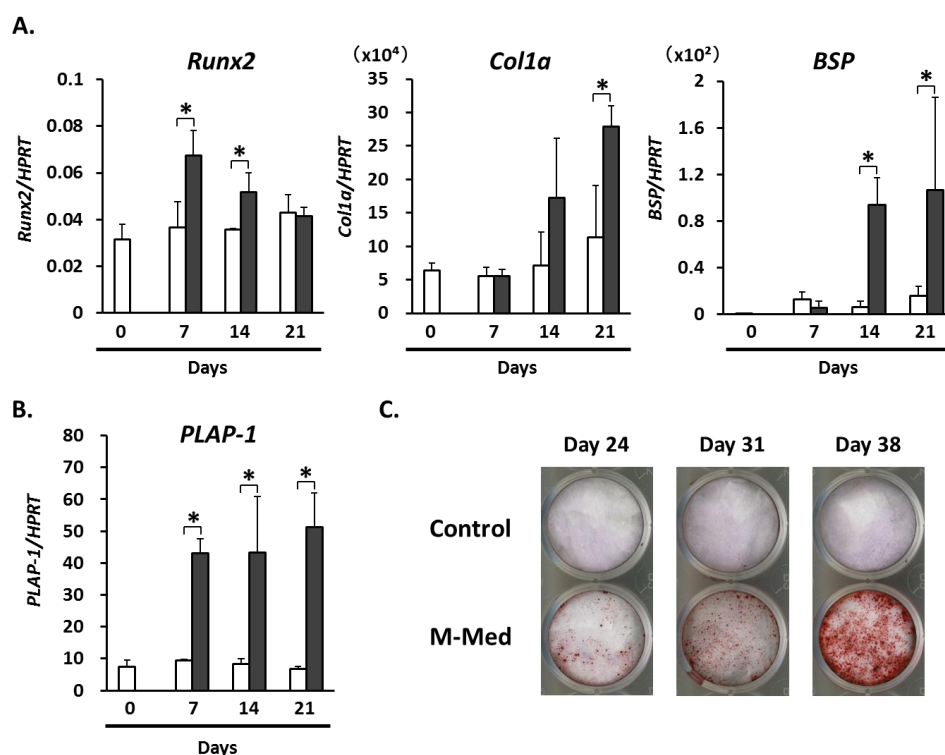
図1 イヌ ADMPC における間葉系幹細胞マーカー発現

ビーグル犬の大網組織から単離した ADMPC の CD29、CD44、CD90、CD105 発現を示す。ADMPC は赤塗りヒストグラムで、アイソタイプコントロールは実線で示す。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

2. イヌ ADMPC の多分化能の検討

イヌ ADMPC の多分化能について検討を行うために、硬組織形成細胞、脂肪細胞、軟骨細胞へと分化誘導を行った。まず、ADMPC を M-Med にて長期培養を行い、石灰化関連遺伝子である *Runx2*、*Col1a*、*BSP* mRNA および歯根膜特異的遺伝子である *PLAP-1* mRNA の発現を Real-time PCR 法にて解析した。

その結果、M-Med 群は Control と比べ、分化誘導 7、14 日目において *Runx2*、21 日目において *Col1a*、14、21 日目において *BSP* mRNA の有意な発現上昇を示した (図 2A)。興味深いことに、M-Med 群は Control と比べ、分化誘導 7、14、21 日目において *PLAP-1* mRNA の有意な発現上昇を示した (図 2B)。また、アリザリンレッド染色の結果、分化誘導 24、31、38 日目において石灰化ノジュールの形成を認めた (図 2C)。このことは、ADMPC が骨芽細胞、歯根膜細胞などの前駆細胞となりうることを示唆している。次に、Ad-Med を用いて ADMPC を培養し、脂肪細胞分化関連遺伝子である *Leptin*、*LPL* mRNA 発現を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、分化誘導 7 日目において、Ad-Med 群は Control と比べ、有意に高い *Leptin*、*LPL* mRNA 発現を示した (図 2D)。また、分化誘導 28 日目における Oil Red O 染色の結果、Ad-Med 群における脂肪滴の形成を認めた (図 2E)。続いて、ADMPC を Ch-Med にて培養を行い、軟骨細胞分化関連遺伝子である *SOX9*、*COMP* mRNA 発現を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、分化誘導 7 日目において Ch-Med 群は Control と比べ、有意に高い *SOX9*、*COMP* mRNA の発現を示した (図 2F)。以上の結果より、犬の大網組織から単離した ADMPC が骨芽細胞、歯根膜細胞、脂肪細胞、軟骨細胞の多系統の細胞種への分化能を有することが明らかとなった。



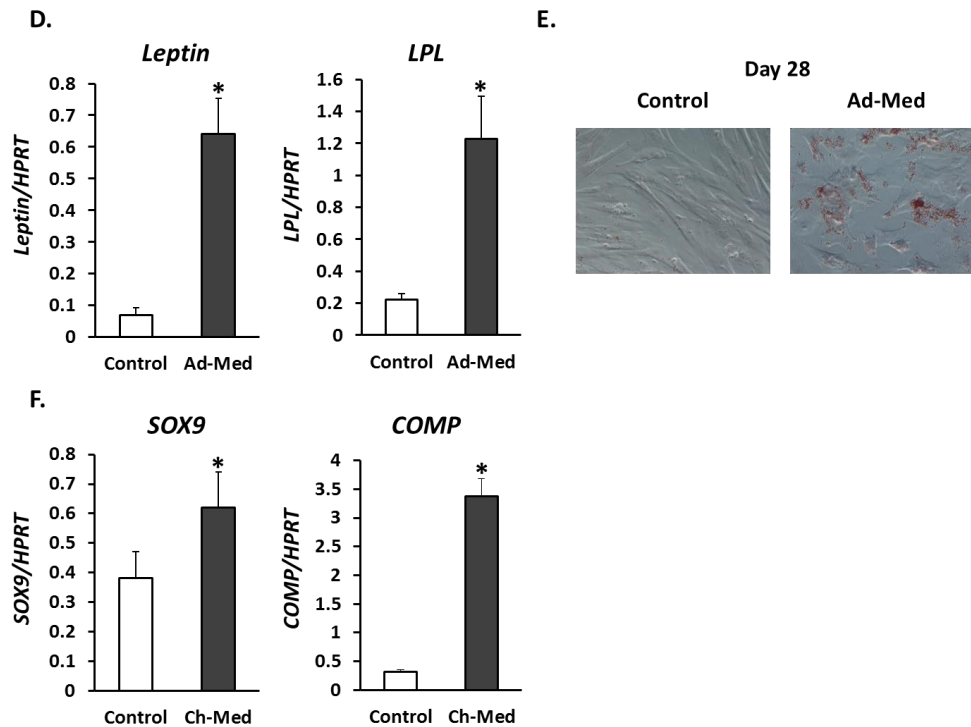


図2 イヌ ADMPC における多分化能の検討

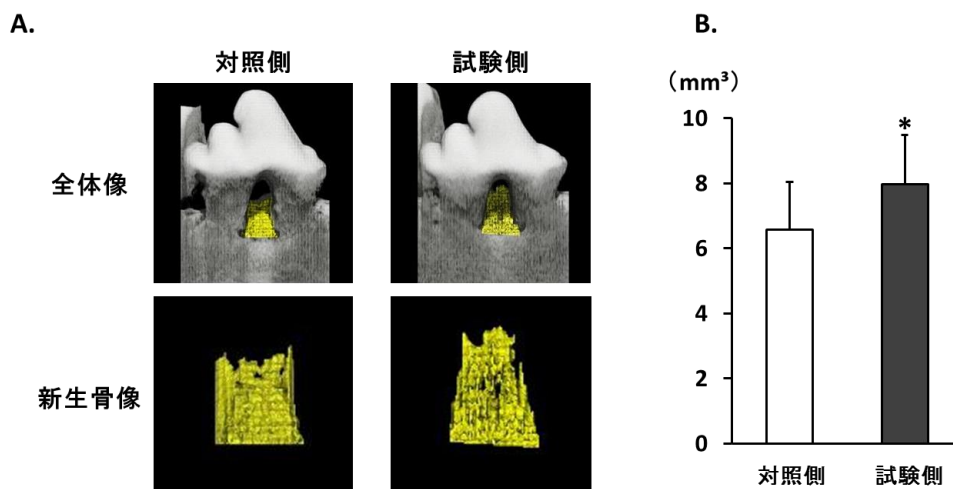
- A. ADMPC を M-Med にて培養した際の分化誘導 0、7、14、21 日目における *Runx2*、*Col1a*、*BSP* mRNA 発現を示す。□は Control、■は M-Med を示し、値は *HPRT* との相対比で示す。
- B. ADMPC を M-Med にて培養した際の分化誘導 0、7、14、21 日目における *PLAP-1* mRNA 発現を示す。□は Control、■は M-Med を示し、値は *HPRT* との相対比で示す。
- C. ADMPC を M-Med にて培養した際の分化誘導 24、31、38 日目におけるアリザリンレッド染色像を示す。
- D. ADMPC を Ad-Med にて培養した際の分化誘導 7 日目における *Leptin*、*LPL* mRNA 発現を示す。値は *HPRT* との相対比で示す。
- E. ADMPC を Ad-Med にて培養した際の分化誘導 28 日目における Oil Red O 染色像を示す。
- F. ADMPC を Ch-Med にて培養を行い、分化誘導 7 日目における *SOX9*、*COMP* mRNA 発現を示す。値は *HPRT* との相対比で示す。

以上の実験はすべて 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。* $p < 0.05$ vs Control。

3. イヌ実験的歯周病モデルにおける ADMPC 移植による歯周組織再生誘導効果の検討

ADMPC 移植による歯周組織再生誘導効果について解析するために、メスビーグル犬の下顎第三、第四小臼歯に人工的 2 級根分岐部病変を作製し、同犬より採取した ADMPC をボルヒール®を足場材として骨欠損作製部に移植した。細胞移植 6 週後のマイクロ CT 解析による三次元構築像を図 3A に示す。定量的な解析の結果、新生骨形成量は対照側において $6.58 \pm 1.46 \text{ mm}^3$ であったのに対し、試験側では $7.96 \pm 1.52 \text{ mm}^3$ と有意に多い新生骨の形成が認められた (図 3B)。次に、組織学的観察により、試験側、対照側の全ての部位において、歯根吸収や癒着等の異常治癒所見は認められず、試験側において、対照側と比較して、顕著な新生骨の形成が確認された。さらに、試験側の骨欠損作成部の歯根表面に濃紺に染色された新生セメント質の形成が確認され、既存セメント質との連続性も確認された (図 3C)。また、その新生セメント質に歯根膜組織のコラーゲン線維が垂直に埋入する所見を認めた。一方で、再生した歯槽骨表面においては、歯槽骨内に歯根膜組織からのコラーゲン線維が垂直に埋入する所見が認められた (図 3D)。そこで、新生セメント質形成率を“材料および方法”に示した方法にて組織学的に定量解析した結果、対照側において $32.1 \pm 19.8 \%$ であったのに対し、試験側では $65.3 \pm 28.7 \%$ と有意に多い新生セメント質の形成が認められた (図 3E)。以上の結果より、ボルヒール®を足場材として ADMPC を移植することで、歯槽骨、セメント質を含む歯周組織再生が誘導されることが明らかとなった。



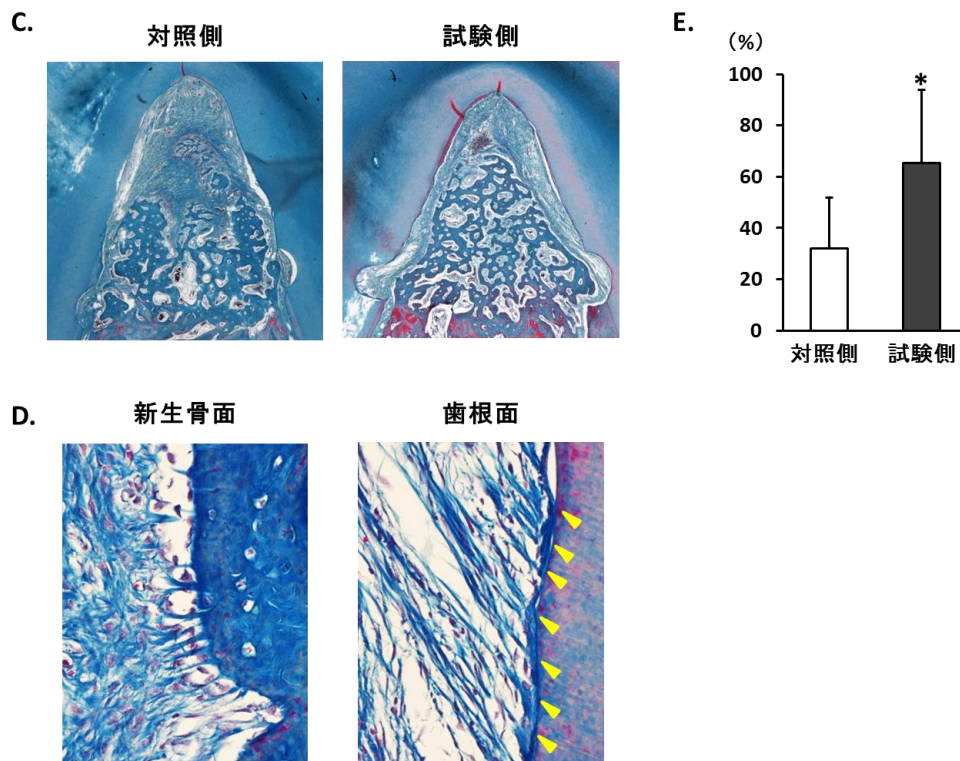


図3 イヌ実験的歯周病モデルにおける ADMPC 移植による歯周組織再生誘導効果の検討

- A. 細胞移植 6 週後における対照側および試験側のマイクロ CT 断層撮影像をもとに構築した三次元像を示す。上段に全体像、下段に新生骨像を示す。
- B. 細胞移植 6 週後における新生骨形成量を示す。解析結果は、対照側 (n=5)、試験側 (n=5) について、それぞれ平均値±標準誤差で示す。* $p < 0.05$ vs 対照側。
- C. 細胞移植 6 週後におけるアザン染色像を示す。人工的骨欠損作製部の舌側壁から 750 μm の位置における代表的な近遠心的断面像を示す。
- D. 細胞移植 6 週後における試験側における新生骨面および歯根面の拡大像を示す。黄色矢頭は新生セメント質形成部位を示す。
- E. 細胞移植 6 週後における新生セメント質を材料ならび方法に示した方法で定量的に解析した結果を示す。解析結果は、対照側 (n=5)、試験側 (n=5) について、それぞれ平均値±標準誤差で示す。* $p < 0.05$ vs 対照側。

4. ADMPC 由来液性因子が HPDL の増殖に与える影響の検討

ADMPC が歯周組織構成細胞への分化能を有していることは、同細胞が組織再生の過程において、歯周組織を構成する各種の細胞に直接分化する、すなわち、Repair 効果に寄与する可能性を示唆している。一方で、脂肪組織より単離

した幹細胞が分泌する液性因子が歯周組織の再生を活性化するか否かは明らかでない。そこで、我々は、歯周組織再生において重要な役割を担うと考えられている HPDL を用いて、ADMPC 由来液性因子が同細胞の細胞性状に与える影響を検討した。まず、HPDL の増殖に与える影響について検討するために、HPDL の培養培地に ADMPC-CM を 50 % の割合で添加し、培養 0、1、2、3、4 日目の細胞数を計測した。その結果、ADMPC-CM の添加は、Control と比較して、細胞増殖に顕著な影響を与えなかった (図 4)。

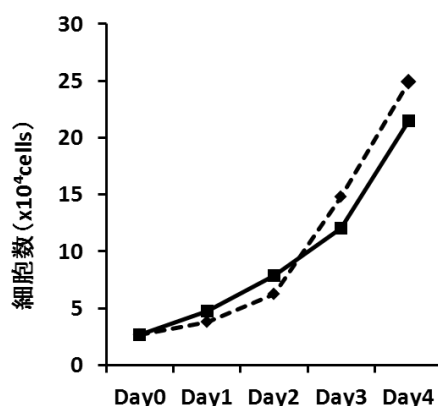


図 4 ADMPC 由来液性因子が HPDL の増殖に与える影響

HPDL を 6 穴細胞培養プレートに 2.5×10^4 個/well 播種し、ADMPC-CM あるいは 10 %FCS および 60 $\mu\text{g/ml}$ KM 含有 DMEM-HG を添加した培地で培養した際の経時的な細胞数を示す。実線は ADMPC-CM 添加群、点線は Control を示す。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

5. ADMPC 由来液性因子が HPDL の硬組織形成細胞への分化に与える影響の検討

次に、ADMPC 由来液性因子が HPDL の硬組織形成細胞への分化に与える影響について検討するために、石灰化誘導培地に ADMPC-CM を 25 % または 50 % の割合で添加することで HPDL を長期培養し、石灰化関連遺伝子である *ALP*、*Runx2*、*Colla*、*BSP* mRNA 発現について Real-time PCR 法にて解析した。その結果、分化誘導 6 日目において、Control と比べ、ADMPC-CM 添加群は、有意に高い *ALP*、*Runx2*、*Colla*、*BSP* mRNA の発現を示した (図 5A)。次に、ALP 活性を測定した結果、分化誘導 12 日目において、ADMPC-CM 添加群は、Control と比較して、有意に高い ALP 活性を示した (図 5B)。また、ADMPC-CM 添加による HPDL の石灰化ノジュール形成能への影響について検討した結果、

分化誘導 18 日目において、ADMPC-CM 添加群は Control と比較して、石灰化ノジュール形成の有意な亢進を示した (図 5C)。以上の結果から、ADMPC 由来液性因子が HPDL の硬組織形成細胞への分化を促進することが明らかとなった。

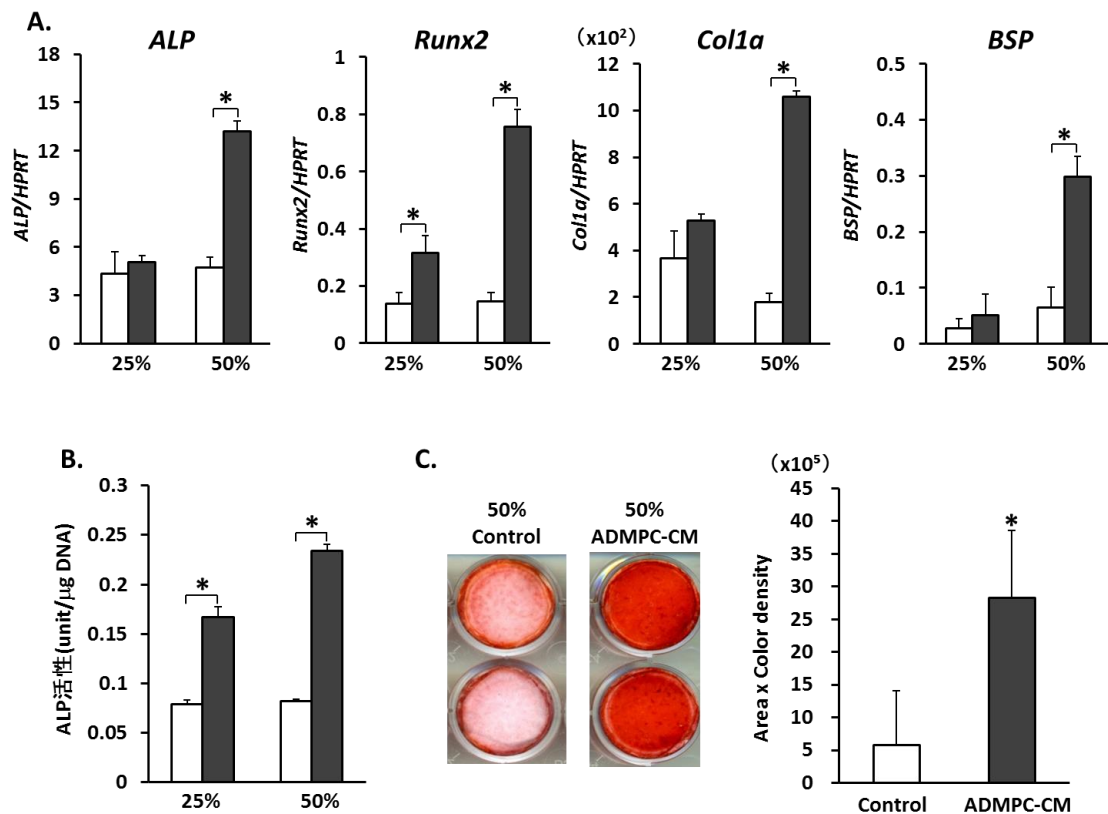


図 5 ADMPC 由来液性因子が HPDL の硬組織形成細胞への分化に与える影響

A. ADMPC-CM を 25 %あるいは 50 %含有した石灰化誘導培地にて HPDL を培養した際の分化誘導 6 日目の *ALP*、*Runx2*、*Col1a*、*BSP* mRNA 発現を示す。

□は Control、■は ADMPC-CM 群を示し、値は *HPRT* との相対比で示す。

B. ADMPC-CM を 25 %あるいは 50 %含有した石灰化誘導培地にて HPDL を培養した際の分化誘導 12 日目の ALP 活性を示す。

□は Control、■は ADMPC-CM 群を示し、値は *HPRT* との相対比で示す。

C. ADMPC-CM を 50 %含有した石灰化誘導培地にて HPDL を培養した際の分化誘導 18 日目におけるアリザリンレッド染色像 (左) と画像解析結果 (右) を示す。

以上の実験はすべて 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。* $p < 0.05$ vs Control。

6. ADMPC が分泌する成長因子の解析

次に、ADMPC-CM 中に含まれる成長因子に着目し、HPDL の硬組織形成細胞への分化促進作用について詳細に解析するために、Human growth factor array®を用いてスクリーニングを行った。その結果、ADMPC-CM 中に IGFBP6、HGF、VEGF が含まれることが明らかとなった（図 6A、B）。そこで、ADMPC が分泌するこれら 3 分子の濃度を定量的に検討するために、ELISA 法にて解析を行った。その結果、図 6C に示すように ADMPC-CM 中に IGFBP6、HGF、VEGF が含まれることが確認された。興味深いことに、Lonza 社より購入した脂肪組織由来間葉系幹細胞の培養上清に含まれる成長因子は同様の成長因子発現プロファイルを示したものの、その濃度は ADMPC と比較して低値であることが明らかとなった。

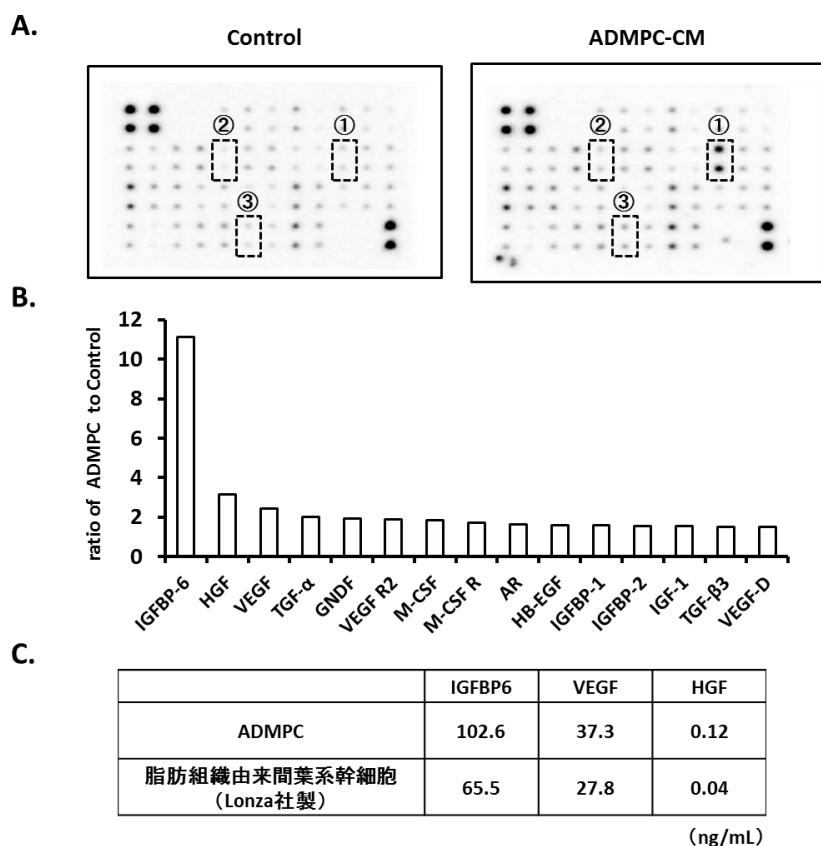


図 6 ADMPC が分泌する成長因子の同定

A. ADMPC-CM および Control の Dot Blot 法による解析結果を示す。

①は IGFBP6、②は HGF、③は VEGF のプロットィングを示す。

B. ADMPC-CM の Dot Blot 法による各成長因子の画像解析結果を示す。

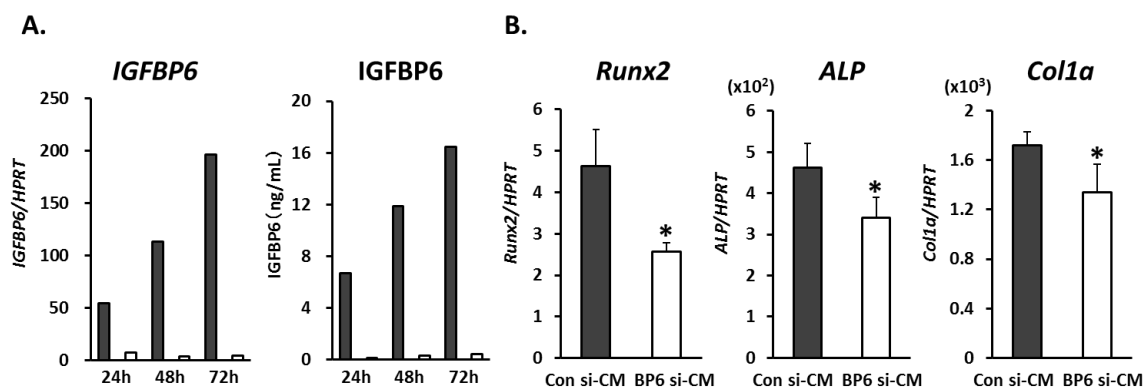
グラフには、ADMPC-CM における各成長因子の Control に対する相対比を示す。

C. ADMPC および Lonza 社より購入した脂肪組織由来間葉系幹細胞の培養上清中の IGFBP6、HGF、VEGF 濃度を示す。

以上の実験はすべて 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

7. ADMPC 由来 IGFBP6 が HPDL の硬組織形成細胞への分化促進作用に与える影響の検討

ADMPC が分泌する成長因子の中で、最も多く検出された IGFBP6 に着目し、同分子が HPDL の硬組織形成細胞への分化促進作用に関与するか否かについて検討を行った。まず、ADMPC に IGFBP6 siRNA を導入し、その導入効率を検討したところ、siRNA 導入 72 時間後までの IGFBP6 の mRNA レベル、タンパクレベルでの発現抑制が確認された (図 7A)。次に、BP6 si-CM を HPDL の石灰化誘導培地に 50 %の割合で添加して HPDL の長期培養を行い、石灰化関連遺伝子である *Runx2*、*ALP*、*Col1a* mRNA 発現について Real-time PCR 法にて解析した。その結果、分化誘導 12 日目において、BP6 si-CM 添加群は、Con si-CM 添加群と比較して、有意に低い *Runx2*、*ALP*、*Col1a* mRNA 発現を示した (図 7B)。次に、ALP 活性について検討した結果、分化誘導 12 日目において、BP6 si-CM 添加群は、Con si-CM 添加群と比較して、有意に低い ALP 活性を示した (図 7C)。また、BP6 si-CM 添加による HPDL の石灰化ノジュール形成能への影響をアリザリンレッド染色にて解析した結果、分化誘導 18 日目において、BP6 si-CM 添加群は、Con si-CM 添加群と比較して、石灰化ノジュール形成の有意な抑制を示した (図 7D)。以上の結果から、ADMPC 培養上清による HPDL の硬組織形成細胞への分化促進作用に IGFBP6 が関与していることが明らかとなった。



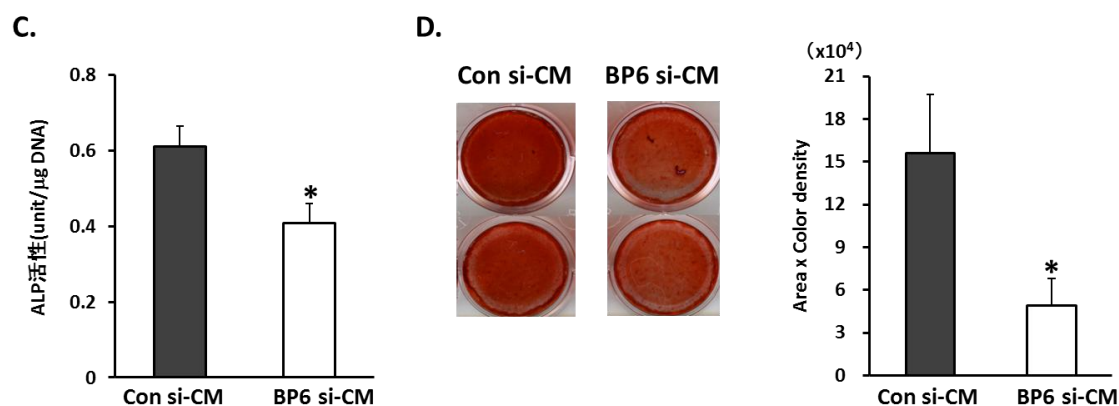


図 7 ADMPC 由来 IGFBP6 が HPDL の硬組織形成細胞への分化に与える影響

- A. ADMPC に IGFBP6 siRNA 導入を行って 24 時間後から 72 時間後の *IGFBP6* mRNA 発現及び培養上清中の IGFBP6 濃度を示す。■は Control siRNA 導入群、□は IGFBP6 siRNA 導入群を示す。mRNA 発現の値は *HPRT* との相対比で示す。
- B. BP6 si-CM を 50 %含有した石灰化誘導培地にて HPDL を培養した際の分化誘導 12 日目の *Runx2*、*ALP*、*Colla* mRNA 発現を示す。値は *HPRT* との相対比で示す。
- C. BP6 si-CM を 50 %含有した石灰化誘導培地にて HPDL を培養した際の分化誘導 12 日目の ALP 活性を示す。
- D. BP6 si-CM を 50 %含有した石灰化誘導培地にて HPDL を培養した際の分化誘導 18 日目におけるアリザリンレッド染色像（左）とその画像解析結果（右）を示す。

以上の実験はすべて 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。* $p < 0.05$ vs Con si-CM。

8. IGFBP6 が HPDL の硬組織形成細胞への分化に与える影響の検討

IGFBP6 が HPDL の硬組織形成細胞への分化に及ぼす影響について検討を行うために、HPDL を石灰化誘導培地にて培養を行い、ヒトリコンビナント IGFBP6 を 100、200、400 ng/ml の濃度で添加し、石灰化関連遺伝子である *Runx2*、*ALP*、*Colla* mRNA 発現について Real-time PCR 法にて解析した。その結果、IGFBP6 400 ng/ml 添加群は、IGFBP6 非添加群と比較して、分化誘導 9 日目において、有意に高い *Runx2*、*ALP*、*Colla* mRNA 発現を認めた(図 8)。この結果より、リコンビナント IGFBP6 は、HPDL の硬組織形成細胞への分化を促進的に制御することが示唆された。

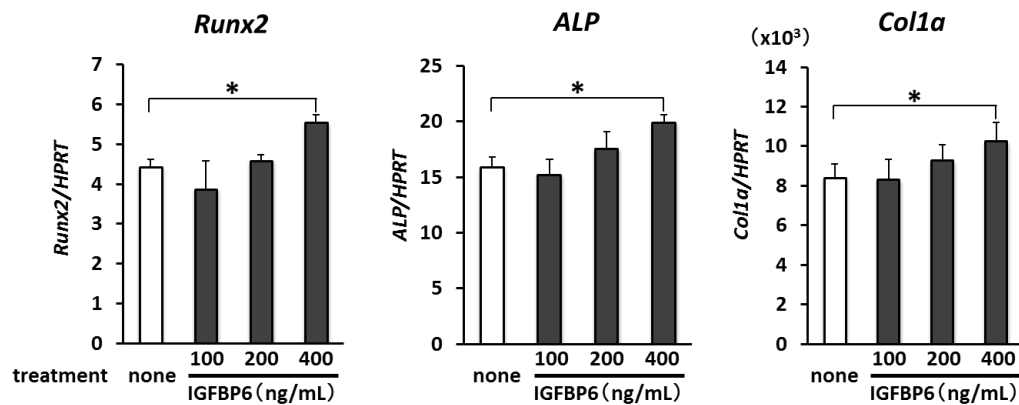


図 8 IGFBP6 が HPDL の硬組織形成細胞への分化に与える影響

ヒトリコンビナント IGFBP6 (100、200、400 ng/ml) 含有あるいは非含有の石灰化誘導培地にて HPDL を培養した際の分化誘導 7 日目における *Runx2*、*ALP*、*Col1a* mRNA 発現を示す。なお、値は *HPRT* との相対比で示す。3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。* $p < 0.05$ vs treatment: none。

考察

歯周治療の最終目的は、歯周病によって失われた歯周組織の解剖学的構造と機能を歯周病罹患前の状態に復元することであると言える。しかしながら、歯周病の原因除去療法による炎症のコントロールや現在臨床応用されている歯周組織再生療法では、この目的を達成させることは困難である。この原因の一端として、組織再生に中心的な役割を担う幹細胞の不足が挙げられ、現在、その補充療法として、骨髄由来幹細胞¹³⁾や歯根膜細胞¹⁴⁾、歯槽骨骨膜細胞¹⁵⁾等を用いた細胞治療による歯周組織再生誘導の可能性が検討されている。本研究では、幹細胞移植による歯周組織再生療法開発のための細胞源としての ADMPC の有用性について明らかにしたとともに、その再生メカニズムにおける Trophic 効果について ADMPC 由来液性因子が歯根膜細胞の細胞機能に及ぼす影響について解析を行った。

本研究では、Okura らの方法³⁰⁻³³⁾に準じて、脂肪組織より ADMPC を単離した。すなわち、従来の Zuk ら²²⁾が報告した脂肪組織に含まれる幹細胞の単離方法を改良し、幹細胞を含む細胞群に対し EDTA 処理を行い、幹細胞とその他の間葉系細胞の培養皿への接着力の差を利用し、幹細胞群を単離した。Okura らは、ADMPc の特徴として、未分化マーカーである Isl-1 の発現と、その一部が c-myc、oct3/4、klf4、nanog を発現していることを報告している^{30, 31)}。このことは、ADMPc が、従来の方法にて単離された脂肪組織由来間葉系幹細胞と比べ、より未分化性が高いことを示唆している。一方で、我々は、EDTA 処理により単離された ADMPC と EDTA 処理を行わずに培養を継続した細胞をそれぞれ石灰化誘導培地にて培養した。その結果、ADMPc において、より高い石灰化能を認めた（結果には示さず）。さらに、図 1 に示したように ADMPC が単一の表面抗原プロファイルを有していることから、本研究で用いた ADMPC の単離方法は、従来の方法と比べ、純度の高い幹細胞集団をより効率よく培養する方法であると考えられる。

本研究では、犬の皮下脂肪組織の採取が困難であることから、大網組織から ADMPC を得て、同細胞を移植することにより有意な歯槽骨およびセメント質の再生を認めた。脂肪組織内に存在する幹細胞は、その由来となる脂肪組織の部位によって、増殖能や分化能が異なることが報告されている⁴⁰⁻⁴³⁾。ヒト皮下脂肪組織とヒト大網組織それぞれより単離した間葉系幹細胞の細胞機能につい

て解析した報告では、皮下脂肪組織由来の細胞において、より高い増殖能と硬組織形成細胞への分化能が示されている⁴¹⁻⁴³⁾。現在、予定されている臨床試験では、安全かつ十分量の組織採取が可能である皮下脂肪組織より ADMPC を単離することを予定している。これらのことから、ヒトでの臨床試験においては、本研究で得られた歯周組織再生効果よりもさらに良好な結果が得られるものではないかと期待される。

本研究では、ADMPc 移植に用いる足場材としてフィブリン製剤のボルヒール[®]を選択した。歯周組織再生療法に用いる幹細胞の足場材としては、安全性、吸収性、スペースメイキング能力、賦形性の四要素が重要であると考えられる。ボルヒール[®]は、心臓血管外科領域や消化器外科領域で既に数多くの臨床実績があり、日本国内由来の献血から製造されているため、安全性は高いと考えられる。また、本研究に先立ち行ったイヌ 3 壁性骨欠損モデルを用いた解析および本研究のイヌ実験的歯周病モデルにおける対照側の解析結果から、歯周組織骨欠損部へボルヒール[®]単体を投与した際、4 週後にはその吸収が確認され、また 6 週後に至るまで、炎症の惹起を疑う肉眼所見や歯根吸収や癒着等の組織学的異常治癒所見、さらには歯肉の欠損部への落ち込み等は認められなかった（結果には示さず）。このことは、ボルヒール[®]の吸収性、安全性とスペースメイキング能力を示すものと考えられる。さらに、複雑な骨欠損に対応するために足場材の賦形性は必須であるが、フィブリンノゲン溶液とトロンビン溶液の 2 液を混和することにより硬化させる本剤は、賦形性に優れているといえる。以上のことから、ボルヒール[®]は歯周組織再生療法における足場材の一つとしての有用であると評価できる。しかしながら、さらに重度で広範囲の歯周組織欠損に対しては、より高度なスペースメイキング能力を持ち合わせた材料の使用が求められる。歯周組織再生療法の足場材としては、 β -TCP⁴⁴⁾、自家骨⁴⁵⁾、凍結乾燥他家骨⁴⁶⁾やハイドロキシアパタイト⁴⁷⁾などが、前臨床あるいは臨床にて用いられているが、なかでも β -TCP はイヌ 3 級根分岐部歯周病モデル⁴⁸⁾やイヌ 1 壁性骨欠損モデル⁴⁹⁾において優れたスペースメイキング能力が示されており、今後、より重度な歯周組織欠損部位に対して ADMPc の移植による効果を検討する際の足場材候補になるのではないかと考えている。

間葉系幹細胞を移植することによる組織再生のメカニズムは、前述のように、幹細胞の Repair 効果と Trophic 効果の両者が関与すると考えられている。本研究では、*in vitro*において ADMPc の硬組織形成細胞への分化能が確認される

とともに、歯根膜特異的マーカーである PLAP-1 の発現誘導が認められた。このことは、ADMPC が歯周組織構成細胞である硬組織形成細胞、歯根膜細胞への分化能を有することを示唆している。

また、本研究では ADMPC 移植に際して *in vitro* にて一定量まで増殖させた後に、分化誘導を行うことなく歯周組織欠損部に移植することにより歯周組織再生効果を得た。このことは、ADMPC が移植部位において周囲環境の影響を受けて歯周組織を構成する各種細胞に分化を遂げた可能性を示唆している。今後、GFP 等で標識した ADMPC を移植し、同細胞が歯周組織構成細胞へ分化し得ることを *in vivo* にて確認することが必要であると考えられる。幹細胞を用いた組織再生誘導法の開発においては、幹細胞を標的とする組織の構成細胞あるいはその前駆細胞へと、事前に *in vitro* にて分化誘導した後に移植することで Repair 効果による組織再生効率を上昇させようとする試みがなされている^{50, 51)}。しかしながら、歯周組織は、骨芽細胞、セメント芽細胞、歯根膜細胞などの多様な細胞からなる組織であるため、特定の細胞種への分化誘導が全体としての組織再生効率を上昇させるか否かについては検討の余地があるのではないかと考えられる。しかしながら、歯根膜組織中に存在することが知られている歯周組織幹細胞の特徴がさらに明らかとなり、ADMPC を同幹細胞に *in vitro* にて分化誘導する方法が確立されれば、より効果的な歯周組織再生が期待できるのではないかと考えている。

一方で、脂肪組織由来間葉系幹細胞の Trophic 効果については、前臨床研究においてその重要性が報告されている⁵²⁻⁵⁴⁾。具体例として、後肢虚血部への同細胞の移植では VEGF、HGF が⁵⁵⁾、皮膚創傷部への移植において VEGF、FGF-2 が組織の再生、修復作用を担っていることが示唆されている⁵⁶⁾。本研究では ADMPC が IGFBP6、HGF、VEGF を分泌していることが明らかとなった。これらの因子の中でも、VEGF は組織再生において血管新生の初期から発現し、発生後期の血管の安定化を含むすべての段階に関わる重要な因子であり、血管内皮細胞の生存は VEGF の濃度に依存していることから、血管形成の主軸を担うと考えられる。また、歯周組織においても、VEGF およびその受容体の発現が歯根膜細胞および歯肉線維芽細胞において確認され⁵⁷⁾、VEGF の添加により、ヒト歯根膜細胞の増殖・遊走、骨芽細胞への分化が促進される^{57, 58)}。一方で、HGF は、血管内皮細胞の増殖や遊走に関与することが知られている⁵⁹⁾。また、マウス後肢虚血モデルにヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を移植した際には、同

細胞が分泌する HGF が移植部周囲の細胞を活性化することにより、同部の血流改善を誘導することが示唆されている⁶⁰⁾。このような知見は、ADMPC が分泌する VEGF や HGF が、歯周組織の移植部位において、周囲の細胞を活性化することで、歯周組織再生に寄与することを示唆している。

本研究では、ADMPC 由来液性因子に含まれる IGFBP6 が HPDL の分化を促進的に制御していることが明らかとなった。IGFBP は、IGF と選択的に結合するタンパクで、これまでに IGFBP1 から 6 までがクローニングされている⁶¹⁾。IGFBP は、癌細胞をはじめ様々な細胞での発現が確認されており、その構造における N 末端および C 末端領域で、血液や組織中の IGF-1、2 と結合しており、IGF 受容体との結合性を制御することによって、IGF の半減期や組織への移行性を調節し、その活性制御に重要な役割を果たすことが報告されている⁶²⁾。なかでも、IGFBP6 は、IGF-2 と特異的に結合する分子として、ヒト脳脊髄液から精製された分子量 34 kDa のタンパクである⁶³⁾。IGF-2 との結合機序としては、IGFBP6 特異的な C 末端領域構造が IGF-2 との結合に関与すると報告されている⁶⁴⁾。IGF-2 は、前骨芽細胞の骨芽細胞への分化を促進的に制御することが報告されており⁶⁵⁾、さらに予備実験の結果から、HPDL を硬組織形成細胞へと分化誘導すると、HPDL 由来の IGF-2 濃度が上昇する傾向を認めた（結果には示さず）。そこで、IGFBP6 による HPDL 分化促進作用に IGF-2 が関与するのではないかと考え、HPDL の硬組織形成細胞への分化誘導時に、外因性に IGF-2 と IGFBP6 を同時に添加した結果、IGF-2 と IGFBP6 による HPDL の分化促進における協調的な作用は認められなかった（結果には示さず）。現在、IGF-2 抑制 HPDL を用いて、内因性 IGF-2 と IGFBP6 の関連について解析を継続している。しかしながら、ADMPC-CM における IGFBP6 濃度は約 100 ng/ml であるのに対し、リコンビナント IGFBP6 は 200 ng/ml を石灰化誘導培地に添加しても分化促進作用を認めなかったこと（400 ng/ml にて、石灰化関連遺伝子の発現上昇を認めた）、また、ADMPC-CM に含まれる IGF-2 濃度は測定閾値（約 30 ng/ml）以下であったことを考慮すると ADMPC-CM 中に含まれる IGFBP6 は、IGF-2 非依存的な機序により、HPDL の分化を制御している可能性があると考えられる。興味深いことに、Cui らは、IGFBP6 がビタミン D 受容体に結合し、ビタミン D シグナルを抑制することを報告した⁶⁶⁾。ビタミン D は骨芽細胞の分化を促進的に制御することが知られている一方で⁶⁷⁾、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程においては抑制的な役割を担うことが報告

されている⁶⁸⁾。これらの知見は、本研究にて明らかとなった IGFBP6 の作用機序にビタミン D シグナルが関与している可能性を示唆している。今後、ビタミン D の由来や IGFBP6 との相互作用について検討を加える予定である。

重度の歯周組織欠損に対応可能な再生療法の開発には、生体組織工学 (Tissue Engineering) の概念に基づき、「幹細胞」「足場材」「シグナル因子」の 3 因子を効果的に融合させることが必須であると考えられている。本研究では、ADMPC が「幹細胞」として、歯周組織再生を誘導することを明らかにした。また ADMPC 由来液性因子が「シグナル因子」として、オートクライン・パラクライン的に作用することで、歯周組織再生誘導を促進的に制御している可能性が示唆された。今後の展望としては、ADMPC と歯周組織構成細胞の相互作用およびその分子メカニズムを詳細に解析し、歯周組織再生のための「幹細胞」としての機能を最大限に発揮できるような「足場材」「シグナル因子」の選定につながる情報を得たいと考えている。また、ADMPC の効果を増強させる「シグナル因子」の一つとして、高い歯周組織再生誘導能だけでなく、間葉系幹細胞の増殖促進能を併せ持つ FGF-2 が⁶⁹⁾、その候補分子の一つとなり得るかもしれない。これらの情報をもとに、この三者の理想的な組み合わせを創出することにより、1 壁性骨欠損や水平性骨吸収などの重度歯周組織欠損に対して十分な組織再生誘導効果を得ることができる Periodontal tissue engineering が創生されるものと期待される。

結論

本研究の結果より、以下の結論を得た。

1. ビーグル犬の大網組織から単離した ADMPC における間葉系幹細胞マーカーの発現および多分化能を確認した。
2. ビーグル犬 ADMPC をボルヒール®と共にビーグル犬実験的歯周組織欠損部へ移植することにより、歯槽骨、セメント質を含む有意な歯周組織の再生誘導効果を認めた。
3. ヒト ADMPC 培養上清が HPDL の硬組織形成細胞への分化を促進することが明らかとなった。
4. ヒト ADMPC が IGFBP6、HGF、VEGF 等の成長因子を分泌することが明らかとなった。
5. ヒト ADMPC 培養上清による HPDL の硬組織形成細胞への分化促進作用に IGFBP6 が関与していることが明らかとなった。
6. IGFBP6 は、HPDL の硬組織形成細胞への分化を促進的に制御することが示唆された。

以上のことから、歯周組織欠損部への ADMPC の移植が歯周組織の再生を誘導し、その再生誘導メカニズムにおいて、ADMPc 自身が歯周組織構成細胞に分化するだけでなく、ADMPc が産生する液性因子が、組織再生を促進的に制御していることが示唆された。そして、その作用機序に、ADMPc が分泌する IGFBP6 が関与していることが明らかとなった。すなわち、ADMPc 移植により、幹細胞のみならず、シグナル因子をも補充することで、歯周組織再生が促進される可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の進行にあたり、直接御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、竹立匡秀助教に心より感謝申し上げます。

本研究の実施に御協力を頂きました科研製薬株式会社総合研究所薬理研究部寺嶋昭夫先生、安斎純先生、永安利江先生に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々な御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Nevins M, Giannobile WV, McGuire MK, Kao RT, Mellonig JT, Hinrichs JE, McAllister BS, Murphy KS, McClain PK, Nevins ML, Paquette DW, Han TJ, Reddy MS, Lavin PT, Genco RJ, Lynch SE: Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial. *J Periodontol*, **76**, 2205-2215 (2005).
- 2) Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, Terashima A, Asano T, Okada H: Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res*, **34**, 425-430 (1999).
- 3) Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, Kitamura M, Okada H: Periodontal regeneration by FGF-2 (bFGF) in primate models. *J Dent Res*, **80**, 2075-2079 (2001).
- 4) Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H: Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res*, **38**, 97-103 (2003).
- 5) Kitamura M, Nakashima K, Kowashi Y, Fujii T, Shimauchi H, Sasano T, Furuuchi T, Fukuda M, Noguchi T, Shibutani T, Iwayama Y, Takashiba S, Kurihara H, Ninomiya M, Kido J, Nagata T, Hamachi T, Maeda K, Hara Y, Izumi Y, Hirofuji T, Imai E, Omae M, Watanuki M, Murakami S: Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. *PLoS One*, **3**, e2611 (2008).
- 6) Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofuji T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Kido J, Nagata T, Kurihara H, Takashiba S, Shibutani T, Fukuda M, Noguchi T, Yamazaki K, Yoshie H, Ioroi K, Arai T, Nakagawa T, Ito K, Oda S, Izumi Y, Ogata Y, Yamada S, Shimauchi H, Kunimatsu K, Kawanami

- M, Fujii T, Furuichi Y, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Omae M, Yamada S, Watanuki M, Murakami S: FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. *J Dent Res*, **90**, 35-40 (2011).
- 7) Zheng W, Wang S, Ma D, Tang L, Duan Y, Jin Y: Loss of proliferation and differentiation capacity of aged human periodontal ligament stem cells and rejuvenation by exposure to the young extrinsic environment. *Tissue Eng Part A*, **15**, 2363-2371 (2009).
 - 8) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663-676 (2006).
 - 9) Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, **448**, 313-317 (2007).
 - 10) Salibian AA, Widgerow AD, Abrouk M, Evans GR: Stem cells in plastic surgery: a review of current clinical and translational applications. *Arch Plast Surg*, **40**, 666-675 (2013).
 - 11) Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y: Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*, **3**, e1886 (2008).
 - 12) Gneccchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ: Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*, **103**, 1204-1219 (2008).
 - 13) Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S: A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*, **26**, 363-369 (2006).
 - 14) Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Chen JH, Wang BB, Huang GT, Wang S, Shi S: Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Dis*, **16**, 20-28 (2010).
 - 15) Yamamiya K, Okuda K, Kawase T, Hata K, Wolff LF, Yoshie H: Tissue-engineered cultured periosteum used with platelet-rich plasma and hydroxyapatite in treating human osseous defects. *J Periodontol*, **79**, 811-818 (2008).

- 16) Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, Aschero S, Gammaitoni L, Aglietta M, Madon E, Fagioli F: Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem*, **97**, 744-754 (2006).
- 17) Vishnubalaji R, Al-Nbaheen M, Kadalmani B, Aldahmash A, Ramesh T: Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. *Cell Tissue Res*, **347**, 419-427 (2012).
- 18) Katsuno T, Ozaki T, Saka Y, Furuhashi K, Kim H, Yasuda K, Yamamoto T, Sato W, Tsuboi N, Mizuno M, Ito Y, Imai E, Matsuo S, Maruyama S: Low serum cultured adipose tissue-derived stromal cells ameliorate acute kidney injury in rats. *Cell Transplant*, **22**, 287-297 (2013).
- 19) Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K: Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, **24**, 1294-1301 (2006).
- 20) Taghi GM, Ghasem Kashani Maryam H, Taghi L, Leili H, Leyla M: Characterization of in vitro cultured bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their ability to express neurotrophic factors. *Cell Biol Int*, **36**, 1239-1249 (2012).
- 21) Nakanishi C, Nagaya N, Ohnishi S, Yamahara K, Takabatake S, Konno T, Hayashi K, Kawashiri MA, Tsubokawa T, Yamagishi M: Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. *Circ J*, **75**, 2260-2268 (2011).
- 22) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, **7**, 211-228 (2001).
- 23) Pikula M, Marek-Trzonkowska N, Wardowska A, Renkielska A, Trzonkowski P: Adipose tissue-derived stem cells in clinical

- applications. *Expert Opin Biol Ther*, **13**, 1357-1370 (2013).
- 24) Yamamoto T, Gotoh M, Kato M, Majima T, Toriyama K, Kamei Y, Iwaguro H, Matsukawa Y, Funahashi Y: Periurethral injection of autologous adipose-derived regenerative cells for the treatment of male stress urinary incontinence: Report of three initial cases. *Int J Urol*, **19**, 652-659 (2012).
 - 25) Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, Hedrick MH, Berthold L, Howaldt HP: Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg*, **32**, 370-373 (2004).
 - 26) Mesimaki K, Lindroos B, Tornwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R, Miettinen S, Suuronen R: Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **38**, 201-209 (2009).
 - 27) Sandor GK, Tuovinen VJ, Wolff J, Patrikoski M, Jokinen J, Nieminen E, Mannerstrom B, Lappalainen OP, Seppanen R, Miettinen S: Adipose stem cell tissue-engineered construct used to treat large anterior mandibular defect: a case report and review of the clinical application of good manufacturing practice-level adipose stem cells for bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg*, **71**, 938-950 (2013).
 - 28) Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodriguez-Montes JA: A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum*, **48**, 1416-1423 (2005).
 - 29) Alvarez PD, Garcia-Arranz M, Georgiev-Hristov T, Garcia-Olmo D: A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax*, **63**, 374-376 (2008).
 - 30) Okura H, Komoda H, Fumimoto Y, Lee CM, Nishida T, Sawa Y, Matsuyama A: Transdifferentiation of human adipose tissue-derived stromal cells into insulin-producing clusters. *J Artif Organs*, **12**, 123-130 (2009).
 - 31) Okura H, Matsuyama A, Lee CM, Saga A, Kakuta-Yamamoto A,

- Nagao A, Sougawa N, Sekiya N, Takekita K, Shudo Y, Miyagawa S, Komoda H, Okano T, Sawa Y: Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model. *Tissue Eng Part C Methods*, **16**, 417-425 (2010).
- 32) Okura H, Komoda H, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Hamada Y, Fumimoto Y, Lee CM, Ichinose A, Sawa Y, Matsuyama A: Properties of hepatocyte-like cell clusters from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*, **16**, 761-770 (2010).
- 33) Okura H, Saga A, Fumimoto Y, Soeda M, Moriyama M, Moriyama H, Nagai K, Lee CM, Yamashita S, Ichinose A, Hayakawa T, Matsuyama A: Transplantation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Tissue Eng Part C Methods*, **17**, 145-154 (2011).
- 34) Dahl LK: A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc Soc Exp Biol Med*, **80**, 474-479 (1952).
- 35) Lillie RD, Ashburn LL: Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by Herxheimer's technique. *Archives of pathology*, **36**, 432-440 (1943).
- 36) Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ: A method for the rapid determination of alkaline phosphates with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem*, **164**, 321-329 (1946).
- 37) Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M: Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant*, **19**, 279-289 (2010).
- 38) Lee WS, Suzuki Y, Graves SS, Iwata M, Venkataraman GM, Mielcarek M, Peterson LJ, Ikehara S, Torok-Storb B, Storb R: Canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells suppress alloreactive lymphocyte proliferation in vitro but fail to enhance engraftment in canine bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, **17**, 465-475 (2011).

- 39) Takemitsu H, Zhao D, Yamamoto I, Harada Y, Michishita M, Arai T: Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res*, **8**, 150 (2012).
- 40) Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F, Bani D, Liotta F, Francini F, Perigli G, Serio M, Luconi M: Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *Faseb j*, **23**, 3494-3505 (2009).
- 41) Van Harmelen V, Rohrig K, Hauner H: Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism*, **53**, 632-637 (2004).
- 42) Toyoda M, Matsubara Y, Lin K, Sugimachi K, Furue M: Characterization and comparison of adipose tissue-derived cells from human subcutaneous and omental adipose tissues. *Cell Biochem Funct*, **27**, 440-447 (2009).
- 43) Baglioni S, Cantini G, Poli G, Francalanci M, Squecco R, Di Franco A, Borgogni E, Frontera S, Nesi G, Liotta F, Lucchese M, Perigli G, Francini F, Forti G, Serio M, Luconi M: Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PLoS One*, **7**, e36569 (2012).
- 44) Shirakata Y, Setoguchi T, Machigashira M, Matsuyama T, Furuichi Y, Hasegawa K, Yoshimoto T, Izumi Y: Comparison of injectable calcium phosphate bone cement grafting and open flap debridement in periodontal intrabony defects: a randomized clinical trial. *J Periodontol*, **79**, 25-32 (2008).
- 45) Stein JM, Fickl S, Yekta SS, Hoischen U, Ocklenburg C, Smeets R: Clinical evaluation of a biphasic calcium composite grafting material in the treatment of human periodontal intrabony defects: a 12-month randomized controlled clinical trial. *J Periodontol*, **80**, 1774-1782 (2009).
- 46) Parashis A, Andronikaki-Faldami A, Tsiklakis K: Clinical and

- radiographic comparison of three regenerative procedures in the treatment of intrabony defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*, **24**, 81-90 (2004).
- 47) Kenney EB, Lekovic V, Sa Ferreira JC, Han T, Dimitrijevic B, Carranza FA, Jr.: Bone formation within porous hydroxylapatite implants in human periodontal defects. *J Periodontol*, **57**, 76-83 (1986).
 - 48) Saito A, Saito E, Kuboki Y, Kimura M, Nakajima T, Yuge F, Kato T, Honma Y, Takahashi T, Ohata N: Periodontal regeneration following application of basic fibroblast growth factor-2 in combination with beta tricalcium phosphate in class III furcation defects in dogs. *Dent Mater J*, **32**, 256-262 (2013).
 - 49) Anzai J, Kitamura M, Nozaki T, Nagayasu T, Terashima A, Asano T, Murakami S: Effects of concomitant use of fibroblast growth factor (FGF)-2 with beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) on the beagle dog 1-wall periodontal defect model. *Biochem Biophys Res Commun*, **403**, 345-350 (2010).
 - 50) Mimura T, Dezawa M, Kanno H, Yamamoto I: Behavioral and histological evaluation of a focal cerebral infarction rat model transplanted with neurons induced from bone marrow stromal cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, **64**, 1108-1117 (2005).
 - 51) Kojima K, Ignatz RA, Kushibiki T, Tinsley KW, Tabata Y, Vacanti CA: Tissue-engineered trachea from sheep marrow stromal cells with transforming growth factor beta2 released from biodegradable microspheres in a nude rat recipient. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **128**, 147-153 (2004).
 - 52) Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M: Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng Part A*, **18**, 1479-1489 (2012).
 - 53) Shohara R, Yamamoto A, Takikawa S, Iwase A, Hibi H, Kikkawa F, Ueda M: Mesenchymal stromal cells of human umbilical cord

- Wharton's jelly accelerate wound healing by paracrine mechanisms. *Cytotherapy*, **14**, 1171-1181 (2012).
- 54) Suga H, Glotzbach JP, Sorkin M, Longaker MT, Gurtner GC: Paracrine Mechanism of Angiogenesis in Adipose-Derived Stem Cell Transplantation. *Ann Plast Surg*, (2013).
 - 55) Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y: Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 2542-2547 (2005).
 - 56) Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, Park JS: Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*, **48**, 15-24 (2007).
 - 57) Yanagita M, Kojima Y, Kubota M, Mori K, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S: Cooperative Effects of FGF-2 and VEGF-A in Periodontal Ligament Cells. *J Dent Res*, **93**, 89-95 (2014).
 - 58) Lee JH, Um S, Jang JH, Seo BM: Effects of VEGF and FGF-2 on proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Cell Tissue Res*, **348**, 475-484 (2012).
 - 59) Morishita R, Aoki M, Yo Y, Ogihara T: Hepatocyte growth factor as cardiovascular hormone: role of HGF in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Endocr J*, **49**, 273-284 (2002).
 - 60) Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Liang Z, Traktuev D, Cornetta K, Ingram DA, Rosen ED, March KL: Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells*, **25**, 3234-3243 (2007).
 - 61) Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG: The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev*, **20**, 761-787 (1999).
 - 62) Firth SM, Baxter RC: Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev*, **23**, 824-854 (2002).

- 63) Roghani M, Hossenlopp P, Lepage P, Balland A, Binoux M: Isolation from human cerebrospinal fluid of a new insulin-like growth factor-binding protein with a selective affinity for IGF-II. *FEBS Lett*, **255**, 253-258 (1989).
- 64) Headey SJ, Keizer DW, Yao S, Wallace JC, Bach LA, Norton RS: Binding site for the C-domain of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-6 on IGF-II; implications for inhibition of IGF actions. *FEBS Lett*, **568**, 19-22 (2004).
- 65) Hamidouche Z, Fromigue O, Ringe J, Haupl T, Marie PJ: Crosstalks between integrin alpha 5 and IGF2/IGFBP2 signalling trigger human bone marrow-derived mesenchymal stromal osteogenic differentiation. *BMC Cell Biol*, **11**, 44 (2010).
- 66) Cui J, Ma C, Qiu J, Ma X, Wang X, Chen H, Huang B: A novel interaction between insulin-like growth factor binding protein-6 and the vitamin D receptor inhibits the role of vitamin D3 in osteoblast differentiation. *Mol Cell Endocrinol*, **338**, 84-92 (2011).
- 67) Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R: Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocr Rev*, **23**, 763-786 (2002).
- 68) Chen YC, Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Miyazawa H, Nakamura H: 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits osteoblastic differentiation of mouse periodontal fibroblasts. *Arch Oral Biol*, **57**, 453-459 (2012).
- 69) Chiou M, Xu Y, Longaker MT: Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **343**, 644-652 (2006).