

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	<a href="https://doi.org/10.18910/34353">https://doi.org/10.18910/34353</a>
rights	©2015. This manuscript version is made available under the CC-BY-NC-ND 4.0 license <a href="http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/">http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/</a>
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 沢 田 啓 吾 )

論文題名

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

論文内容の要旨

## 【研究目的】

現在、臨床応用されているGTR法やエナメルマトリクスタンパク、サイトカインを用いた歯周組織再生療法は、歯周組織に内在する幹細胞に依存して、歯周組織再生を図る治療法である。しかしながら、このような組織内在性の幹細胞は加齢とともにその数が減少し、増殖能や分化能も低下することが報告されている。また、重度歯周組織欠損の症例においては残存する歯根膜が減少することで、同組織内幹細胞の数が減少し、十分な再生誘導効果が得難くなる。そのため、他の組織より採取した幹細胞を歯周組織欠損部へ移植し幹細胞を補充することにより、歯周組織の再生を誘導する試みがなされている。我々の研究室では、脂肪組織に存在する未分化間葉系幹細胞に着目し、同幹細胞の移植による新規歯周組織再生療法の開発を目指して、検討を重ねてきた。本研究では、ビーグル犬歯周病モデルを用いて、脂肪組織由来多系統前駆細胞 (Adipose tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cells : ADMPC) の移植による歯周組織再生誘導効果を定量的に解析し、その有効性について検討した。また、間葉系幹細胞移植による組織再生メカニズムには、移植した幹細胞が組織を構成する各種細胞に分化するRepair効果だけでなく、移植した同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効果が存在することが明らかになりつつある。そこで、本研究では、ADMPC由来液性因子がヒト歯根膜細胞 (HPDL) の細胞機能に及ぼす影響について検討を加えた。

## 【材料および方法】

イヌの大網脂肪組織より、イヌADMPCを単離した。すなわち、細切した脂肪組織をコラゲナーゼ処理し、比重遠心を行った後、幹細胞を含む中間層を回収し、培養用ディッシュに播種した。24時間の培養後、EDTA処理により浮遊している細胞を回収し、これをADMPCとし、継代培養を行った。フローサイトメトリー法にて、イヌADMPCにおける間葉系幹細胞マーカーの発現を検討するとともに、硬組織形成細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導を行うことにより、イヌADMPCの多分化能を検討した。次に、ビーグル犬の下顎第三、第四前臼歯に2級根分岐部病変を実験的に作製し、同欠損部に生体組織接着剤として臨床応用されているフィブリンゲルを足場材として、ADMPCを移植した。細胞移植6週後に下顎骨を採取し、マイクロCT解析、組織学的解析を行うことで、ADMPC移植による歯周組織再生誘導効果を検討した。

ヒト皮下脂肪組織より、イヌADMPCと同様にヒトADMPCの単離・培養を行った。ADMPCをコンフルエントまで培養した後、10%FCS含有D-MEMにてさらに3日間培養した際の上清を回収し、ヒトADMPC培養上清を調製した。HPDLを石灰化誘導培地 (ウシ胎仔血清、 $\beta$ -glycerophosphate、ascorbic acid含有 $\alpha$ -MEM) にて硬組織形成細胞へと分化誘導する際に、ヒトADMPC培養上清を添加し、Real-time PCR法にて石灰化関連遺伝子発現、p-ニトロフェニルリン酸法にてアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、アリザリンレッド染色にて石灰化ノジュール形成を評価することで、ヒトADMPC由来液性因子がHPDLの硬組織形成細胞への分化に及ぼす影響を検討した。一方で、Human growth factor array®およびELISA法にて、ヒトADMPC培養上清に含まれる成長因子を検討した。さらに、ヒトADMPCにIGFBP6 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein-6) siRNAの導入を行った後、同細胞の培養上清を調製し、IGFBP6発現抑制ヒトADMPC培養上清あるいはヒトリコンビナントIGFBP6の添加が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加えた。

## 【結果】

イヌADMPCにおいて、間葉系幹細胞マーカーであるCD29、CD44、CD90の発現を確認した。また、イヌADMPCを硬組織形成細胞へと分化誘導することにより、経時的な石灰化関連遺伝子の発現上昇と顕著な石灰化ノジュール形成を認め、さらに歯根膜特異的遺伝子である*PLAP-1*の発現上昇を認めた。脂肪細胞への分化を誘導する条件でADMPCを培養することにより、脂肪細胞分化関連遺伝子の発現上昇、および脂肪滴の形成を認めた。また、軟骨細胞への分化を誘導する条件でADMPCを培養することにより、軟骨細胞分化関連遺伝子の発現上昇を認めた。次に、ビーグル犬に作製した実験的2級根分岐部骨欠損部に、同上ビーグル犬由来ADMPCをフィブリングルと共に移植することにより、対照側（フィブリングルのみ移植）と比較して、有意な新生骨・新生セメント質の形成を認めた。また、HPDLの硬組織形成細胞への分化誘導時に、ヒトADMPC培養上清を添加することで、対照群と比較して、石灰化関連遺伝子の発現上昇、ALP活性の増加、顕著な石灰化ノジュール形成の亢進を認めた。一方で、Human growth factor array<sup>®</sup>およびELISA法の解析により、ヒトADMPCがIGFBP6、VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)、HGF (Hepatocyte Growth Factor) を分泌することが明らかとなった。また、HPDLの硬組織形成細胞への分化誘導時に、IGFBP6発現抑制ヒトADMPC培養上清を添加することで、対照群と比較して、石灰化関連遺伝子発現の抑制、ALP活性の減少、および石灰化ノジュール形成の低下を認めた。さらに、HPDLを硬組織形成細胞へと分化誘導する際に、ヒトリコンビナントIGFBP6を添加することにより、対照群と比較して、有意な石灰化関連遺伝子の発現上昇を認めた。

## 【結論および考察】

本研究結果から、イヌADMPCが歯周組織構成細胞を含む多系統の細胞への分化能を有することが明らかとなると共に、同ADMPCをフィブリングルと共にビーグル犬の歯周組織欠損部へ移植することにより、同部に有意な歯周組織の再生を誘導する効果が認められた。そして、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が種々の液性因子を産生することで、歯周組織に存在する幹細胞や前駆細胞を活性化し、同部の組織再生を促進している可能性が示唆された。さらに、ADMPCが産生する液性因子の一つであるIGFBP6が歯根膜細胞の分化を活性化することによって、歯周組織再生誘導に関与していることが示唆された。すなわち、ADMPC移植により、幹細胞を補充するだけでなく、シグナル因子をも一部制御することで、組織再生を促進する可能性が示唆された。今後は、IGFBP6と結合することが報告されているビタミンD受容体との相互作用について検討を加えることで、IGFBP6による歯根膜細胞の分化制御メカニズムの一端が明らかになるものと期待している。

また、重度歯周組織欠損に対応し得る新規歯周組織再生療法の開発の為には、「幹細胞」「シグナル因子」「足場材」からなるTissue engineeringの概念が必要である。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、ADMPC由来液性因子が「シグナル因子」として作用することで、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、ADMPCが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。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。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 沢 田 啓 吾 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 大阪大学 教授 村上 伸也
	副 査 大阪大学 教授 天野 敦雄
	副 査 大阪大学 准教授 野杵 由一郎
	副 査 大阪大学 講師 佐藤 淳
<b>論文審査の結果の要旨</b>	
<p>本研究は、イヌ実験的歯周病モデルを用いて、脂肪組織由来多系統前駆細胞(Adipose tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cell : ADMPC)の移植による歯周組織再生誘導効果を解析すると共に、ADMPC が産生する液性因子が歯根膜細胞に及ぼす影響とその機序について解析したものである。</p> <p>その結果、ADMPC を移植することで有意な歯周組織再生が誘導されること、ADMPC が分泌する液性因子が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進的に制御すること、そしてその因子の一つとして IGFBP6 が関与することが明らかとなった。</p> <p>以上の研究成果は、ADMPC 移植による歯周組織再生誘導の分子基盤を理解する上で重要な情報を提供し、今後の ADMPC 移植による新規歯周組織再生療法の樹立・改良に寄与するものと考えられるものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。</p>	