The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	脂肪組織由来間葉系幹細胞の移植による歯周組織再生
Author(s)	小笹, 匡雄
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57597
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【16】

氏　　名	小　笹　匡　雄（おざさまさお）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２３７３６　号
学位授与年月日	平成22年３月23日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学　位　論　文　名	**脂肪組織由来間葉系幹細胞の移植による歯周組織再生**
論文審査委員	(主査) 教　授　村上　伸也 (副査) 教　授　豊澤　　悟　　准教授　松本　　憲　　講　師　松本　卓也

論　文　内　容　の　要　旨

［研究目的］

間葉系幹細胞は高い自己複製能と多分化能を有することから再生医療における細胞源として注目を集めている。しかしながら、歯周組織再生医療の分野においては未だ幹細胞移植の実用性、有用性の詳細は十分に検討されてはいない。そこで本研究では、採取に際して患者への負担が少なく安全性も高いと考えられる脂肪組織中に存在する間葉系幹細胞(ADSC)に着目し、ADSC の単離方法、細胞表面抗原、硬組織形成細胞への分化能および安全性について検討を行った。さらにビーグル犬を用いた実験的歯周組織欠損モデルにおいて、同一ビーグル犬脂肪組織より単離したADSC の移植による歯周組織再生誘導効果について検討を行った。

［材料および方法］

1) ADSC の単離方法：大阪大学医学部附属病院において手術予定の患者からインフォームドコンセントを得た後、手術時に廃棄となる皮下脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織を 0.075%コラゲナーゼにて 37℃、1 時間インキュベート後、HISTOPAQUE®を用いた比重遠心により血球成分を除去した。従来の方法ではこの段階で得られた細胞集団を脂肪組織由来間葉系幹細胞としていた（従来法）が、本研究においては、得られた細胞集団をフィブロネクチンへの接着力の差を利用して、さらに精製し（新法)、最終的に得られた細胞を ADSC とし以下の実験に供じた。

2) 細胞表面抗原の解析：フローサイトメトリーを用いて、ADSC における CD44 、CD73、 CD105、CD166、SSEA4、STRO-1、CD34、CD45 の発現解析を行った。

3) 硬組織形成細胞への分化能の解析：ADSC を 24 穴培養プレート（6.0×10^4個/well）および 6 穴培養プレート（3.0×10^5個/well）に播種後、硬組織誘導培地(10 mM β-グリセロリン酸、50 μg/ml アスコルビン酸、10 %FCS 添加 D-MEM)にて 28 日間培養し、7 日おきにリアルタイム PCR を用いて *RUNX-2* および歯根膜細胞特異的マーカー*PLAP-1* の mRNA 発現、アルカリフォスファタ

ーゼ(ALPase)活性、およびアリザリン染色による石灰化ノジュール形成を経時的に解析を行った。
4) ヒトADSCにおける増殖能および安全性の検討:初代培養後、継代培養を繰り返しpopulation doubling法を用いて増殖能を解析し、さらに増殖能が消失するまで継代培養を続けた後、G-band法、SKY法にて染色体検査を行った。
5) ビーグル犬脂肪組織からのADSC単離
脂肪採取にあたりビーグル犬より開腹下にて腹腔内側にある内臓脂肪である大網を採取し、ヒトADSCの単離方法に従いADSCを単離した。
6) ビーグル犬を用いた実験的歯周組織欠損モデルの作製およびADSCの移植
①実験的2級根分岐部骨欠損モデル:ビーグル犬1頭を用い、全身麻酔下にて第四前臼歯頬側分岐部に頬舌径3mm、深さ5mmの人工的2級根分岐部骨欠損を作製し、シリコン材を填入、その後4週目に、シリコン材の除去およびルートプレーニングを行い、セメント質をすべて除去した。同上骨欠損のうち左側を実験側として、ADSC含有フィブリンゲルを移植した。一方、対照側である右側にはフィブリンゲルのみを移植した。移植6週後に屠殺し、マイクロＣＴ断層撮影および組織切片を作製して組織学的に歯周組織再生効果を評価した。
②実験的2壁性骨欠損モデル:ビーグル犬5頭を用い、左右両側の下顎第四前臼歯を抜歯し、約3ヶ月間の治癒期間を経た後に両側の第一後臼歯の近心頬側部の歯槽骨を、頬舌径3mm、近遠心径5mm、深さ4mmとなるように規格化を行い、2壁性骨欠損を作製した。さらに、露出した第一後臼歯近心根にはルートプレーニングを行い、セメント質を全て除去した。同上骨欠損のうち右側を実験側としてADSC含有フィブリンゲルを移植した。一方、対照側である左側にはフィブリンゲルのみを移植した。移植6週後にマイクロＣＴ断層撮影および3次元解析、組織学的計測を行い、歯周組織再生誘導効果を評価した。
［結果］
ヒトADSCの単離方法の検討において、従来法では培養14日目においても石灰化ノジュール形成を認めなかったが、新法においては培養11日目にて石灰化ノジュール形成を認め、新法により得られたADSCは従来法に比べ硬組織形成細胞への高い分化能を有することを確認した。ADSCにおける細胞表面抗原の発現についてFACSを用いて検討を行った結果、間葉系幹細胞マーカーであるCD44、CD73、CD105、CD166、SSEA4の陽性を示した。また造血幹細胞マーカーであるCD133、間葉系幹細胞マーカーの一つであるSTRO-1、血球系マーカーのCD34、CD45の発現は認められなかった。硬組織形成細胞への分化能の検討において、硬組織形成細胞への分化過程における遺伝子発現を検討したところ、硬組織形成細胞分化マーカーである*Runx2*、および歯根膜マーカーの*PLAP-1*の発現上昇を認め、さらにALPase活性の上昇と石灰化ノジュールの形成が認められ、ADSCが歯根膜細胞及び硬組織形成細胞への分化能を有していることが示唆された。ADSCは、継代8代目まで高い増殖能を示し、さらに継代培養を続けた時継代14代目まで培養可能であることが示された。また安全性の検討において培養初期に当たる継代4代目と培養後期にあたる継代14代目のADSCにおいて、カリオタイプを比較した結果、継代を重ねても染色体異常は認められなかった。実験的2級根分岐部骨欠損モデルおよび実験的2壁性骨欠損モデルにおいて、対照側と比しADSCの移植による著明な歯槽骨の添加を認めた。さらに実験的2壁性骨欠損モデルにおいてADSC移植側に有意なセメント質新生が認められ、新生したセメント質と新生骨にはコラーゲン線維束の埋入が示された。さらにADSC移植側において歯肉上皮の下方増殖の有意な抑制を認めた。
［結論および考察］
ヒトADSCは歯根膜細胞を含む硬組織形成細胞への分化能を有し、継代14代目まで培養可能で、その間染色体異常を示さなかった。さらに、イヌ実験的歯周組織欠損部にADSCを移植することにより、歯槽骨、セメント質の新生と歯肉上皮下方増殖抑制を伴う歯周組織再生が誘導された。以上のことから、ADSC移植により歯周組織再生が誘導し得ることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)に着目し、ADSCの性質、およびビーグル犬実験的歯周組織欠損部へのADSC移植による歯周組織再生誘導効果について検討を加えたものである。

その結果、ADSCが歯根膜細胞や硬組織形成細胞への分化能を有することが示された。さらに、ADSCの高い増殖能と培養後期における染色体の安定性が示された。また、上記歯周組織欠損部にADSCを移植することにより、歯槽骨とセメント質の新生、および歯肉上皮下方増殖抑制を伴う歯周組織再生が誘導されることが明らかとなった。

これらの知見は、ADSCを用いた新規歯周組織再生療法を確立する上で重要な知見を提供するものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。