

白石 剛士 論文内容の要旨

主 論 文

Formation of Engineered Bone

with Adipose Stromal Cells from Buccal Fat Pad

ヒト頬脂肪体由来幹細胞 (B-ADSCs) を用いた骨形成

白石 剛士、住田 吉慶、若松 由香、長井 一浩、朝比奈 泉

JOURNAL OF DENTAL RESEARCH *in press*

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：朝比奈 泉教授)

緒 言

近年ヒト脂肪組織に、骨髄と同様な多分化能を持つ脂肪由来間葉系幹細胞 (adipose-derived stromal cells : ADSCs) が存在することが報告されている。しかし、この ADSCs から骨組織を誘導する確実な方法は現在のところ確立されていない。また、強力な骨誘導能を有することが知られている BMP-2 タンパク質を ADSCs へ添加することで、骨組織の再生が可能であるかは現在でも意見が分かれている。

最近、頬脂肪体 (buccal fat pad : BFP) にも脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSCs from BFP : B-ADSCs) が存在することが報告された。しかしながら、B-ADSCs を用いた骨組織の再生の可能性については、現在までに詳細な検討がなされていない。顎骨を始めとする頭頸部領域において、この B-ADSCs を用いた骨組織の再生が実現すれば、口腔外科医にとって極めて有用な細胞源となると考えられる。

今回、われわれは頭頸部領域で採取可能な頬脂肪体から B-ADSCs の単離を行い、リコンビナント (rh) BMP-2 を B-ADSCs の培養に応用することで、B-ADSCs の生体内における骨形成能の評価を試みた。

対象と方法

顎変形症手術の際に得られた BFP から、酵素処理とセルストレイナーを用いて細胞を単離し培養を行った (n=3)。培養後、得られた B-ADSCs の骨形成能を *in vitro*, *in vivo* において評価した。

【in vitro】

- ・ 培養 B-ADSCs の特性解析 Fluorescence activated cell sorting(FACS): B-ADSCs における CD90、CD105、Stro-1 の発現を評価した。
- ・ 培養 B-ADSCs の蛍光免疫染色: B-ADSCs における Vimentin, Stro-1 陽性細胞の局在を確認した。

以下の実験では実験群を

- 1) BMP-OS 群 (300ng/ml BMP2 を添加した骨芽細胞誘導培地 (OS) で B-ADSCs を培養)
- 2) BMP 群 (300ng/ml BMP2 のみ添加した培地で B-ADSCs を培養)
- 3) OS 群 (骨芽細胞誘導培地で B-ADSCs を培養)
- 4) コントロール群 (通常培地で B-ADSCs を培養)

に分類して行った。

- ・ 培養 B-ADSCs の細胞数計測 (WST-8): 培養開始 5、7、10、14 日後に計測した。
- ・ ALP 活性の計測: 培養開始 5、7、10、14 日後に計測した。
- ・ 培養 B-ADSCs の Ca 沈着の評価 (Alizarin red 染色): 培養 14 日後に細胞染色を行った。
- ・ 骨芽細胞、脂肪細胞マーカー遺伝子の発現評価 (RT-PCR): 培養 14 日後の *opn ocn runx2 pparγ lpl gapdh* の発現を評価した。

【in vivo】

上記 1) ～ 4) の条件で培養した B-ADSCs-ハイドロキシアパタイト (HA) 複合体を洗浄した後に、ヌードマウスの背部皮下に移植を行なった。移植した試料は 8 週後に摘出し、組織学的に観察した。

結 果

FACS の結果、間葉系幹細胞マーカーである CD90 CD105 が高く発現していた。また 1.13% と低値であったが Stro-1 の発現も確認された。蛍光免疫染色でも Stro-1 が確認された。培養中の細胞増殖率はそれぞれの群で差は認められなかった。しかし、ALP 活性は 14 日目に BMP 群、BMP-OS 群で OS 群、コントロール群と比較して有意に高い値を示した。又、Alizarin red 染色の結果、BMP 群と BMP-OS 群で Ca 沈着の亢進が認められた。さらに、骨形成関連遺伝子である *opn ocn runx2* の発現亢進が BMP 群、BMP-OS 群で確認された。一方で、脂肪組織関連遺伝子である *pparγ lpl* の発現も BMP-OS 群、OS 群で認められた。

これらの実験群をヌードマウスに移植したところ、BMP 群と BMP-OS 群において顕著な骨様組織の形成が認められた。NIH imaging を用いて骨組織形成量を計測したところ、BMP 群では ADSCs-HA 複合体の 13% に、BMP-OS 群では 40% のエリアに骨芽細胞を内包する骨様組織の形成を認めた。

考 察

これらの結果より、1) rhBMP-2 と共培養した B-ADSCs は強い骨形成能を有すること、2) rhBMP-2 と骨芽細胞誘導培地の相乗作用が B-ADSCs の骨形成能を促進させることが分かった。

また、過去の報告から、骨髄や歯髄、歯周靱帯と比較して脂肪組織には多くの MSC が含まれていることが分かっており、頬脂肪体も皮下脂肪組織と同様であることが報告されている。

以上より、B-ADSCs は骨組織の再生に極めて有用な細胞源となり得ることが示唆された。