

ふりがな氏名	さかもと ふみと 坂本 章人
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 722 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学位論文題目	The utility of human dedifferentiated fat cells in bone tissue engineering in vitro (in vitro 骨組織工学におけるヒト由来脱分化脂肪細胞の有用性)
学位論文掲載誌	Cytotechnology 平成 26 年
論文調査委員	主査 松本 尚之 教授 副査 池尾 隆 教授 副査 武田 昭二 教授

#### 論文内容要旨

口唇口蓋裂患者の骨欠損部治療については自家骨移植が第一選択肢と考えられているが、非常に侵襲的であり骨量も制限される。代替法として、自己幹細胞と足場材料を併用した骨再生治療が注目されている。すでにヒト骨髄間葉系幹細胞（hMSCs）は骨再生医療の分野で臨床応用が始まっている。また、新たな細胞ソースとして、少ない侵襲で調整が可能であり、高い増殖能と多分化能を有するとされる脱分化脂肪細胞（Dedifferentiated fat cells : DFATs）にも着目されてきている。

本研究では、DFATs の有用性を調べることを目的として、ヒト由来の DFATs と hMSCs の骨芽細胞分化能について生化学的手法によって定量的に比較、検討した。さらに、 $\alpha$ リン酸三カルシウム（ $\alpha$ -TCP）/コラーゲン・スポンジ（CS）に DFATs を播種し *in vitro* 骨組織工学における有用性について、形態学的ならびに病理組織学的に評価を行った。DFATs は、患者の顎下部から採取した脂肪を天井培養法により作製した。DFATs と hMSCs は、 $3 \times 10^4$  個播種しコンフルエントになるまで培養し、その後、コントロール培地（CM）または骨分化誘導培地（OM）で、14 日間培養した。DFATs と hMSCs の骨芽細胞分化能については、Runx2 遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で、アルカリホスファターゼ（ALP）活性、オステオカルシン（OCN）発現とカルシウム（Ca）量を ELISA 法により測定した。 $\alpha$ -TCP/CS は、 $\alpha$ -TCP とアテロコラーゲン溶液を混和後、 $-80^{\circ}\text{C}$ 、24 時間、減圧凍結乾燥、その後、 $140^{\circ}\text{C}$ 、24 時間、真空熱架橋を行い作製した。さらに、 $\alpha$ -TCP/CS に DFATs を  $1 \times 10^5$  個播種し、3、7、14 日間 OM で培養し、走査電子顕微鏡検査（SEM）および、病理組織学的評価を行った。

CM と OM での DFATs と hMSCs は、いずれもすべてのマーカーで上昇が認められ、両細胞が骨芽細胞へ分化可能であることが確認された。OM で培養した DFATs は、Runx2 遺伝子発現量がすべての期間で hMSCs に比べ有意に高くなった。また、ALP 活性は 3、7 日目、OCN 発現は 14 日目、カルシウム量は 7 日目で

有意に高くなった。SEM 観察の結果、培養 7 日後の  $\alpha$ -TCP/CS 内で 多数の DFATs が伸展している像が確認された。14 日目では、DFATs がわずかに確認できる程度で、 $\alpha$ -TCP/CS 全体に多数の球状石灰化物が認められた。Von Kossa 染色の結果、DFATs が  $\alpha$ -TCP/CS 内で骨芽細胞に分化し、石灰化した細胞外マトリックスの堆積した培養骨様組織を呈していることが病理組織学的に明らかとなった。

本研究結果から、DFATs は、hMSCs より骨芽細胞分化能が高いという点で、組織工学の観点から非常に有用性が高いことがわかった。また、DFATs を  $\alpha$ -TCP/CS を組み合わせることで、*in vitro* で培養骨が作製でき、骨組織工学における顎裂部骨欠損の再建の移植材候補となりえることが示唆された。

## 論文審査結果要旨

本研究では、生化学的手法によりヒト由来の DFATs と hMSCs の骨芽細胞分化能について定量的に比較、検討を行い、さらに、 $\alpha$ リン酸三カルシウム ( $\alpha$ -TCP) /コラーゲン・スポンジ (CS) に DFATs を播種し *in vitro* 骨組織工学における有用性について、形態学的ならびに病理組織学的に評価を行った。DFATs は、新たな細胞ソースとして、少ない侵襲で調整が可能であり、高い増殖能と多分化能を有するとされる脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cells) のことであり、骨再生治療の分野で着目されてきている細胞である。

DFATs を、患者の顎下部から採取した脂肪を天井培養法とよばれる独特な方法で作製した。その後、DFATs と理研提供の hMSCs を、コントロール培地 (CM) または骨分化誘導培地 (OM) で、14 日間培養し、比較、検討を行った。DFATs と hMSCs の骨芽細胞分化能については、Runx2 遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で測定を行った。また、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性、オステオカルシン (OCN) 発現量とカルシウム (Ca) 量を ELISA 法により測定を行った。 $\alpha$ -TCP/CS は、 $\alpha$ -TCP とアテロコラーゲン溶液を混和後、 $-80^{\circ}\text{C}$ 、24 時間で減圧凍結乾燥し、その後、 $140^{\circ}\text{C}$ 、24 時間で真空熱架橋を行い作製した。さらに、 $\alpha$ -TCP/CS に DFATs を  $1 \times 10^5$  個播種し、3, 7, 14 日間 OM で培養し、走査電子顕微鏡検査 (SEM) および、病理組織学的評価を行った。

CM と OM での DFATs と hMSCs は、いずれもすべてのマーカーで上昇が認められ、両細胞が骨芽細胞へ分化可能であることが認められた。OM で培養した DFATs は、Runx2 遺伝子発現量がすべての期間で hMSCs に比べ有意に高くなった。また、ALP 活性は 3, 7 日目、OCN 発現量は 14 日目、カルシウム量は 7 日目で有意に高くなった。SEM 観察の結果、培養 7 日後の  $\alpha$ -TCP/CS 内で 多数の DFATs が伸展している像が確認された。14 日目では、DFATs がわずかに確認できる程度で、 $\alpha$ -TCP/CS 全体に多数の球状石灰化物が認められ、Von Kossa 染色の結果、DFATs が  $\alpha$ -TCP/CS 内で骨芽細胞に分化し、石灰化した細胞外マトリックスの堆積した培養骨様組織を呈することが病理組織学的に明らかとなった。

本研究結果から、DFATs は、hMSCs より骨芽細胞分化能が高いことが明らかとなり、組織工学の観点から非常に有用性が高いと結論づけられた。また、DFATs を  $\alpha$ -TCP/CS と組み合わせることで、*in vitro* で培養骨が作製でき、骨組織工学における顎裂部骨欠損の再建の移植材になりうることが示唆された。

以上のことから、DFATs を骨再生療法として臨床応用できる可能性があることを明らかにした点において、本論文は博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した。