

# ヒト頬脂肪体から脱分化脂肪細胞を獲得する酵素処理条件の検討

Effect of collagenase concentration on the isolation of small adipocytes from buccal fat pad

鶴町仁奈<sup>1)</sup>, 秋田大輔<sup>2)</sup>, 加野浩一郎<sup>3)</sup>, 松本太郎<sup>4)</sup>, 鳥海 拓<sup>5)</sup>, 風間智彦<sup>4)</sup>, 沖 嘉尚<sup>3)</sup>, 田村瑛子<sup>1)</sup>, 外木守雄<sup>6)</sup>, 清水典佳<sup>1)</sup>, 本田雅規<sup>5)</sup>

Niina TSURUMACHI<sup>1)</sup>, Daisuke AKITA<sup>2)</sup>, Koichiro KANO<sup>3)</sup>, Taro MATSUMOTO<sup>4)</sup>, Taku TORIUMI<sup>5)</sup>, Tomohiko KAZAMA<sup>4)</sup>, Yoshinao OKI<sup>3)</sup>, Yoko TAMURA<sup>1)</sup>, Morio TONOGI<sup>6)</sup>, Keitaro ISOKAWA<sup>7)</sup>, Noriyoshi SHIMIZU<sup>1)</sup>, Masaki J. HONDA<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup> 日本大学歯学部歯科矯正学講座, <sup>2)</sup> 日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座, <sup>3)</sup> 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, <sup>4)</sup> 日本大学生物資源科学部応用生物科学科, <sup>5)</sup> 愛知学院大学歯学部口腔解剖学講座, <sup>6)</sup> 日本大学歯学部口腔外科学講座

## 【要旨】

成熟脂肪細胞を天井培養することで産生される線維芽細胞様細胞は、間葉系幹細胞に類似した性質を持ち、脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)と呼ばれている。また、ヒト頬脂肪体から単離した成熟脂肪細胞には 40 μm未満の大きさの細胞が多く存在し、天井培養法で調製された DFAT 細胞は高い骨芽細胞分化能を有することが示唆されている。しかしながら、この小さな成熟脂肪細胞を調整する際の適切な酵素条件に関する報告はこれまでにない。そこで、本研究では、コラゲナーゼ濃度による差異が脱分化脂肪細胞の調整に及ぼす影響について検討した。その結果、0.02%の酵素処理したグループが小さな成熟脂肪細胞を多く獲得できるだけでなく、0.1%で調整した DFAT 細胞と差異がなかったことから、至適酵素濃度は 0.02%であることが示唆された。

## 【背景および目的】

歯科口腔領域では、古来より口腔内器官の欠損に対して人工材料を補填することで機能の回復を図る治療がおこなわれてきた。近年、疾病や外傷によって損傷を受けた器官・組織に対して機能回復を目指す再生医学が飛躍的に発展し、歯科領域においても口腔機能の向上に対してその有用性が着目されている。現在では、骨造成や歯周組織の再生を代表的に臨床応用されているだけでなく、効果の向上を目指した基礎研究も盛んに行われている。現在の再生医療では、特に幹細胞や前駆細胞を用いた組織再生や機能回復を目指すことに重点がおかれ、骨髄以外の口腔内組織にも間葉系幹細胞が存在することが明らかとなっている。口腔内には骨髄や歯髄・歯根膜・骨膜などに間葉系幹細胞が存在し、組織再生のための現実的な細胞源となりうるが、どの組織も採取に制限があると考えられる。

脂肪組織は腹部のみならず人体の至るところに存在し、頬脂肪体(buccal fat pad: BFP)は歯科医師が局所麻酔下で比較的簡便に採取可能なため、再生医療に用いる細胞源として注目されている。BFP は、上顎突起と下顎骨・頬骨の間に存在する脂肪塊であり、成人になっても個体差や栄養状態に関係なくほぼ一定量存在すると報告されている<sup>1)</sup>。また、前腕皮弁と比較して、感染・脱落などの合併症が少なく、良好な組織生着性を示すことから、口腔腫瘍の切除後に生じた上顎欠損部への移植弁として再建に利用されている<sup>2)</sup>。成熟脂肪細胞は長年、終末分化し増殖能を失った細胞と考えられていたが、天井培養法により非対称分裂に生じる線維芽細胞様細

胞が間葉系幹細胞に類似した性質を持つことが明らかにされ、脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)と名付けられている。DFAT 細胞は高い増殖能と、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、心筋細胞、神経細胞等への多分化能を有していることから組織工学や再生医療の細胞源として有用である<sup>3)</sup>。また、BFP から単離した成熟脂肪細胞には 40 μm未滿の小さな細胞集団が多く存在し、早期に DFAT 細胞へと脱分化することと、高い骨芽細胞分化能を有する細胞集団が調製されることが報告されており<sup>4)</sup>、歯科口腔領域における骨組織や歯周組織の再生<sup>5)</sup>に有用な細胞源であることが示唆されているが、この小さな成熟脂肪細胞を調製する際の適切な酵素条件に関する検討はこれまでにない。そこで、本研究では、コラゲナーゼ濃度による差異が脱分化脂肪細胞の調整に及ぼす影響について比較検討を行った。

### 【方法】

日本大学歯学部附属歯科病院に来院した健常な顎変形症患者 10 名の下顎枝矢状分割術時に摘出される BFP を用いた。0.01%、0.02%、0.1%、0.5%コラゲナーゼ溶液に分けて酵素処理後、遠沈管上部に浮遊した脂肪細胞数と直径をコールターカウンターを用いて測定した。その後、単離された成熟脂肪細胞を天井培養し、1 週間後にフラスコを反転した。さらに 3 日後に継代した際の細胞数の測定を行った。さらに 0.1%と 0.02%で酵素処理して調整した DFAT 細胞の遺伝子発現、細胞表面抗原、細胞周期、骨芽細胞および脂肪細胞への分化能について検討し、特性を比較した。

### 【結果】

0.02%コラゲナーゼ濃度で酵素処理したグループが他のグループと比較して 2.5 倍以上の脂肪細胞数が計測され、その多くの直径は 30μm 以下であった。また、成熟脂肪細胞分画を天井培養に反転して 3 日後に継代を行った際には、0.02%の濃度で酵素処理したグループが 0.1%で酵素処理したグループよりも 1.6 倍ほど多くの細胞数が測定された。さらに、0.02%と 0.1%の濃度で調整した DFAT 細胞の遺伝子発現、細胞表面抗原、細胞周期および脂肪細胞への分化能を検討した結果、CD271 以外の 7 種の細胞表面抗原については陽性細胞の割合はほぼ同等の値を示した。遺伝子発現解析の ES 細胞マーカーである c-MYC, KLF4, OCT3/4, SOX2 の遺伝子発現は同様の発現パターンを示した。また、コロニー形成能、細胞増殖能および細胞周期に関しては、有意な差は認められなかったが、骨芽細胞誘導開始 3 日目におけるアルカリホスファターゼ活性は 0.02%で調整したグループが高い傾向を示した。しかしながら、アリザリンレッド S 染色やカルシウム沈着量は両群で有意な差は認めませんでした。さらに、脂肪細胞分化誘導能は同程度であった。

### 【結語】

本研究より、0.02%の酵素処理したグループが小さな成熟脂肪細胞を多く獲得できるだけでなく、0.1%で調整したDFAT細胞と差異がないことから、至適酵素濃度は0.02%であることが示唆された<sup>6)</sup>。一連の結果からDFAT細胞を口腔領域に臨床応用する際の具体的な酵素処理条件が確立された。

### 【参考文献】

- 1) Baumann A, Ewers R. Application of the buccal fat pad in oral reconstruction. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; **58**: 389-392, 2000.
- 2) 松井祐興, 小池修治, 那須隆ら. 頬脂肪体を用いて再建を行った口腔癌の 2 症例. *頭頸部外科*; 2017;**27**:37-43.

- 3) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210-222.
- 4) Tsurumachi N, Akita D, Kano K, et al. Small Buccal Fat Pad Cells Have High Osteogenic Differentiation Potential. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016; **22**: 250-9.
- 5) Akita D, Kano K, Saito-Tamura Y, et al. Use of Rat Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells as a Cell Source for Periodontal Tissue Regeneration. *Front Physiol* 2016; **7**: 50.
- 6) Tsurumachi N, Akita D, Kano K, et al. Effect of collagenase concentration to isolate small adipocytes from human buccal fat pad. *J Oral Sci*. 2018; **60**:14-23.