

脱分化脂肪細胞による歯周組織再生

Mature adipocytes derived dedifferentiated fat (DFAT) cells enhanced periodontal regeneration

秋田大輔¹⁾, 加野浩一郎²⁾, 田村瑛子³⁾, 真下貴之⁴⁾, 鶴町仁奈³⁾, 鳥海 拓⁵⁾, 新井嘉則⁶⁾, 月村直樹¹⁾, 松本太郎⁷⁾, 石上友彦¹⁾, 磯川桂太郎⁸⁾, 本田雅規⁵⁾

Daisuke AKITA¹⁾, Koichiro KANO²⁾, Yoko TAMURA³⁾, Takayuki MASHIMO⁴⁾, Niina TSURUMACHI³⁾, Taku TORIUMI⁵⁾, Yoshinori ARAI⁶⁾, Naoki TSUKIMURA¹⁾, Taro MATSUMOTO⁷⁾, Tomohiko ISHIGAMI¹⁾, Keitaro ISOKAWA⁸⁾, Masaki J. HONDA⁵⁾

¹⁾ 日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座, ²⁾ 日本大学生物資源科学部応用生物科学科, ³⁾ 日本大学歯学部歯科矯正学講座, ⁴⁾ 順天堂大学歯科口腔外科講座, ⁵⁾ 愛知学院大学歯学部口腔解剖学講座, ⁶⁾ 日本大学歯学部歯科放射線学講座, ⁷⁾ 日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, ⁸⁾ 日本大学歯学部解剖学第Ⅱ講座

【要旨】

歯周炎, 外傷など種々の原因で破壊された歯槽骨ならびに歯根膜の再生には, 人工骨移植や組織再生誘導法が行われているが, その適応や効果は現時点ではまだ限定的である。近年, 再生医療の分野において細胞と生体材料を組み合わせた細胞移植治療が有望視されている。歯周組織再生の移植細胞源として有用と考えられている骨髄や歯根膜由来の幹細胞は, 細胞の採取に制限が伴うため, 口腔領域から低侵襲に採取可能で, 大量に調製可能な細胞源が模索されている。脂肪組織中の成熟脂肪細胞分画から調整される脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)は, 高い増殖能と多分化能を示すことから, ラットに作製した歯周組織欠損を応用し, DFAT 細胞の歯周組織再生能を検討した。

その結果, 歯根吸収や骨性癒着することなく, 高い再生した硬組織へのコラーゲン線維の埋入が認められた。また蛍光標識された DFAT 細胞は歯根膜組織中に多数散在しているほか, 一部の細胞は新生セメント質と新生骨中に認められたことから DFAT 細胞は歯周組織再生に有用であることが示唆された。

【背景および目的】

歯周病はう蝕と並ぶ歯科の二大疾患の一つであり, 国民の約 8 割が歯周炎に罹患していると云われている。歯周炎とはセメント質・歯肉・歯根膜・歯槽骨から構成される歯周組織の炎症性破壊を特徴とし, 進行すると歯の喪失に繋がる。破壊された歯周組織の再生には, 従来から人工骨移植や組織再生誘導法(GTR 法)が行われているが, その適応や効果は未だ限定的である。そのため, 近年では間葉系幹細胞と適切な足場材もしくは成長因子を組み合わせた再生医療が歯周組織再生の効果向上に有望視されている。

増殖能力を喪失した終末分化細胞であると捉えられてきた成熟脂肪細胞は, 培養下においては自発的に脱分化し, 高い増殖活性と多分化能を再獲得することが近年明らかにされている¹⁾。この成熟脂肪細胞由来の脱分化脂肪細胞(DFAT 細胞)は均質かつ大量に調製することが可能であるため, 細胞移植治療のソースとして有用視されている。

そのためラット下顎骨に作製した歯周組織欠損部に DFAT 細胞を移植し, 歯周組織再生能を検

討した。

【方法】

9 週齢の近交系 F344 雄性ラットの鼠径部皮下脂肪組織を採取し、細切後、0.1%のコラゲナーゼ溶液にて 1 時間酵素処理を行い、濾過および遠心分離にて余分な細胞外基質成分を除去後、成熟脂肪細胞分画を単離した。成熟脂肪細胞分画を 12.5 cm² のフラスコに 1.0×10⁴ 個ずつ播種し天井培養を行い、7 日後にフラスコを反転した。フラスコ反転後に DFAT 細胞がコロニーを形成しているのを確認後、第三継代の細胞を脂肪細胞と骨芽細胞への分化誘導培地で培養し、Oil-Red O および Alizarin Red 染色性、カルシウム沈着量などを指標に分化能の有無を検討した。

In vivo では、F344 ラットの左側下顎臼歯部頬側に吸入麻酔下で左側下顎下縁の皮膚を切開して、咬筋を切断し、剥離後に下顎骨頬側を露出させた。第 1 臼歯中央根から第 2 臼歯近心相当部をインバーテッドバーで歯周組織欠損領域(縦 2 mm×横 3 mm×深さ 1 mm)を作製し、欠損部に実験群として DFAT/PLGA 複合体を、対照群として PLGA を移植した。CT を用いて移植後の再生過程を観察し、得られた CT データから硬組織再生量の定量をおこなった。また、5 週経過後の下顎骨を摘出し、第 1 臼歯中央根および遠心根の組織学的解析から欠損部の歯周組織再生能を評価した。

さらに、蛍光色素でラベリングした DFAT を PLGA scaffold に播種して歯周組織欠損部に移植し、5 週経過後の細胞局在部位を蛍光顕微鏡観察から評価した。

【結果】

ラット鼠径部皮下脂肪組織から採取した DFAT は、分化誘導培地を用いた培養により Oil-Red O および Alizarin Red 染色性、カルシウム沈着に陽性反応を示し、脂肪細胞、骨芽細胞への分化誘導が認められた。

移植を行った両群には、歯根吸収や骨性癒着は観察されず、欠損部の硬組織形成が CT による経日的観察から認められた。硬組織定量解析の結果、移植 5 週後には DFAT/PLGA 移植群は PLGA 群よりも 2.4 倍程度高い硬組織再生量が認められた。さらに、組織学的解析から、両群において移植部の新生骨組織とセメント質様硬組織の形成のほかに、再生した硬組織へのコラーゲン線維の埋入が認められているが、組織形態計測からセメント質様硬組織と歯根膜の幅径は DFAT/PLGA 移植群では PLGA 群よりも有意に大きい値を示していた。さらに、蛍光色素で標識させた DFAT を同様に移植した際には、DFAT は新生歯根膜中に最も多く確認されたほか、新生骨・セメント質内や血管様構造物内にも陽性反応が認められた²⁾。

【結語】

これらの結果から多分化能を示す DFAT と PLGA 複合体移植が、歯槽骨、セメント質様硬組織および線維性の歯根膜組織の再生において促進的に作用することを示唆しており、破壊された歯周組織の再生に有望であることが考えられる^{3, 4)}。

【参考文献】

- 1) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210-222.
- 2) 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

- 3) Kaku M, Akiba Y, Akiyama K, Akita D, Nishimura M. Cell-based bone regeneration for alveolar ridge augmentation--cell source, endogenous cell recruitment and immunomodulatory function. *J Prosthodont Res.* 2015; **59**:96-112.
- 4) 秋田大輔, 伊藤智加, 月村直樹, 松本太郎. 脱分化脂肪細胞の臨床応用化に向けた取り組み. *日歯医師会誌.* 2019; **71**:829-839.