



脱分化脂肪細胞が拓く歯科再生医療の未来

大阪歯科大学 歯科麻酔学講座
助教 岸本 直隆

1. 再生医療と幹細胞

我々、人間に寿命があるように、それぞれの細胞にも寿命がある。神経や腎臓の細胞のようにほぼ一生にわたり生存する細胞もあるが、皮膚や血液細胞のように数週間から数ヵ月しか生存できない細胞もある。それら寿命の短い細胞が枯渇しないのは、その元となる「幹細胞：stem cells」が体内において生理的に再生できるからである。切断を繰り返しても元通りの形態に再生可能なプラナリアや四肢を切断しても再生できるイモリなどは異なり、我々の体がもつ再生能力は非常に乏しい。しかし、遺伝子工学や分子生物学の進歩により、近年、幹細胞や増殖因子を用いた人体の組織や臓器の再生に関する研究が盛んに行われるようになり、その治療効果が期待されている。このように、機能障害や機能不全に陥った生体組織・臓器に対して、細胞を積極的に利用して、その機能の再生をはかることが「再生医療」の基本コンセプトである（図1）。

幹細胞とは未分化な状態の細胞であり、様々な細胞に分化できる多分化能をもち、組織中に細胞を供給している。幹細胞が組織を維持するためには、分化した細胞を生み出すとともに、幹細胞が枯渇しないように自己複製する必要がある。このように多分化能と自己複製能をもった細胞が幹細胞と定義されている。幹細胞として有名なものに1981年Evansらによって樹立された胚性幹細胞（ES細胞）がある¹⁾。ES細胞は受精卵の内部細胞塊に由来する細胞で、体を構成するすべての細胞へと分化できる能力（多能性：pluripotency）を保持したまま無制限に増殖することができる。しかし、その臨床応用に際しては、受精卵を材料

として用いることに対する倫理的宗教的問題や他者である受精卵から樹立されるES細胞を患者へ移植する際の拒絶反応といった大きな問題を抱えている。一方、2006年Takahashiら²⁾によって樹立された人工多能性幹細胞（iPS細胞）はES細胞のもつ問題点を解消し、ES細胞に代わる再生医療の切り札として注目されている。iPS細胞は線維芽細胞などの体細胞に4種類（3種類の報告もある）の遺伝子を導入することで樹立され、ES細胞と同様に多能性を有する。iPS細胞は受精卵を必要としないため倫理的な問題はなく、さらに患者本人の体細胞から樹立可能であることから移植に際して拒絶反応が起こらない。しかしながらiPS細胞にも腫瘍原性、遺伝子導入やウイルスベクターの使用に関する安全性、細胞樹立にかかる時間や効率性などその使用に関しては種々の問題が存在する。

幹細胞にはES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞の他に造血幹細胞や間葉系幹細胞など体を

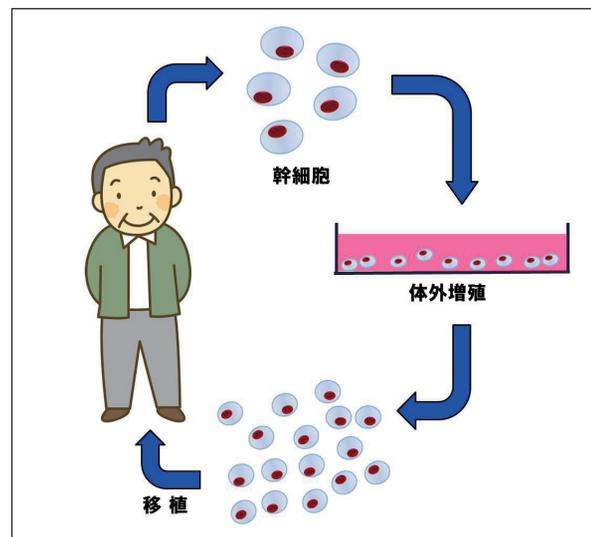


図1 再生医療の基本コンセプト

構成するすべての細胞には分化できないが、複数の種類の細胞に分化できる能力（複能性：multipotency）をもった細胞が含まれる。間葉系幹細胞は1999年Pittengerら³⁾によって骨髄中に存在することが世界で初めて発見され（骨髄間質細胞）、その後2001年Zukら⁴⁾によって脂肪組織中にも存在することが証明された（脂肪幹細胞）。その他にも現在まで体の様々な組織から間葉系幹細胞が樹立されているが、特に骨髄間質細胞と脂肪幹細胞に関する研究は多い。間葉系幹細胞は多能性をもたないが、高い増殖能や主に骨、軟骨、脂肪といった中胚葉系細胞へ分化する能力を有し、再生医療用ドナー細胞としてその有用性が期待されている。

2. 幹細胞を用いた歯科再生医療の現状

歯周組織はセメント質、歯槽骨、歯根膜、歯肉の4つの異なった組織で構成され、それぞれの組織は互いに結合して歯を支えている。歯周炎は歯周病原細菌の感染に対する宿主の免疫応答の結果、歯周組織に破壊が生じたものであり、成人が歯を失う原因の第1位となっている。現在行われている歯周炎治療は、原因である歯周病原細菌と破壊された歯周組織を取り除くことが基本となるが、理想的な目標は破壊された歯周組織を再生することである。歯周組織を再生させるアプローチとして現在guided tissue regeneration (GTR)法、エムドゲイン、fibroblast growth factor-2 (FGF-2)などのサイトカインを用いた方法が臨床応用・臨床研究されている^{5), 6)}。GTR法は組織遮断膜を用いて歯肉上皮由来および歯肉結合組織由来細胞が欠損部へ侵入すること防ぎ、歯根膜由来幹細胞を到達させ歯周組織再生を誘導しようとする治療法である。またエムドゲインやFGF-2などのシグナル因子を用いることで歯周組織再生能力のある歯根膜由来幹細胞を活性化することができる。

しかし、これらの方法はいずれも歯周組織欠損周囲に存在する歯根膜由来幹細胞の再生能力を最大限に発揮させ、歯周組織を再生させるコンセプトに基づいた治療であり適応に限られる。生体内の幹細胞数が少ない高齢者や広範囲の歯周組織欠損を伴う症例では十分な数の細胞の遊走や増殖が

難しいため、GTR法やエムドゲイン、FGF-2を用いた治療など内在性の幹細胞が持つ自己修復力を活性化する方法では対応が困難である。そこで歯周組織欠損部に他の組織から採取した幹細胞を移植することにより歯周組織を再生する治療法の研究が進められている。

これまでに動物実験で細胞移植による歯周組織再生効果が報告されているのは骨髄間質細胞、歯髄幹細胞、歯根膜幹細胞などの間葉系幹細胞、さらに多能性幹細胞であるiPS細胞である⁷⁾。また幹細胞治療の臨床応用を目指すべく、これらの細胞を用いた臨床研究もすでに実施されている。2006年7月に「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」が施行され、幹細胞を用いた新規の研究は厚生労働省の諮問委員会での審査を経ることが義務づけられおり、その内容や結果はインターネットを通じてアクセスできる (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/iryuu/iryousaisei.html>)。2013年7月現在承認されている歯科再生医療に関する臨床研究は9つあり、ドナー細胞として骨髄間質細胞、脂肪幹細胞、歯根膜幹細胞、歯髄幹細胞などを用いた歯周組織、歯髄組織や顎骨再生の研究が行われている。

このように間葉系幹細胞を用いた歯科再生医療研究は多く実施されているが、間葉系幹細胞の代表的な存在である骨髄間質細胞の樹立には骨髄穿刺が必要となり、採取に伴う侵襲が大きい。一方、脂肪幹細胞は皮下脂肪を少量採取することで樹立可能であり、より臨床応用に適した間葉系幹細胞と言える。しかし、どちらの細胞も骨髄また脂肪組織中においてはマイナーな細胞であり、樹立された間葉系幹細胞は不均一な細胞集団である。また歯根膜幹細胞や歯髄幹細胞も同じく不均一な細胞集団であり、臨床応用における安全性の観点から考えると移植に用いる細胞は純度が高い細胞集団（均一な細胞集団）であることが望ましい。そこで我々は2008年から純度が高い細胞集団である脱分化脂肪細胞（dedifferentiated fat cells：DFAT cells）を用いた再生医療、特に骨再生医療の臨床応用を目指すべく研究を開始した。

3. 脱分化脂肪細胞の特徴

現在、再生医療研究の分野において脂肪由来の幹細胞と言えば一般的に脂肪幹細胞があげられる。脂肪幹細胞に関するZukらの論文⁴⁾は2500回以上引用され、脂肪幹細胞を広く研究者に認知させる結果となった。一方、脱分化脂肪細胞は2008年にMatsumotoら⁸⁾が再生医療用ドナー細胞としての有用性を報告して以降、徐々に注目を浴びてきた細胞であるが、まだまだ研究者が少ないのが現状である。しかし我々は、脱分化脂肪細胞が骨髄間質細胞や脂肪幹細胞などの間葉系幹細胞がもつ問題点である純度の問題を改善し、またその他にも優位な点を見出したことから非常にポテンシャルの高い細胞であると考えている。

脱分化脂肪細胞は天井培養法と呼ばれる方法で脂肪組織から樹立される。まず脂肪組織を採取後、コラゲナーゼ溶液で処理し、遠心分離操作により脂肪組織を浮遊する成熟脂肪細胞と沈殿したストローマ分画に分離する。浮遊した成熟脂肪細胞のみを回収し、通常培地（ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）+ 20% ウシ胎児血清（FBS））で完全に満たしたフラスコに播種する。次いで本来のフラスコ底面が上面に来るようにフラスコを反転させ、インキュベータ内（37℃、5%CO₂）で

1週間培養する。成熟脂肪細胞は油滴を含むため浮遊し、フラスコ天井側に付着後、非対称性細胞分裂を起こし、線維芽細胞様の形態を呈する脱分化脂肪細胞が産生される。上記の方法が天井培養法である。一方、遠心分離操作にて沈殿したストローマ分画をフラスコに播種し、付着培養して得られる細胞集団が脂肪幹細胞である（図2）。遠心分離操作にて浮遊した細胞集団のほとんど（98%以上）は成熟脂肪細胞であり、これは純度が高い細胞集団である。よって純度が高い成熟脂肪細胞から天井培養法により樹立される脱分化脂肪細胞も純度が高い細胞であると考えられている。一方、ストローマ分画には脂肪幹細胞の他に平滑筋細胞、血管内皮細胞、単球など異種細胞が多く含まれ、ストローマ分画を付着培養して樹立される脂肪幹細胞は純度が低い細胞集団である⁸⁾。このように細胞集団として考えた場合の純度の違いが脱分化脂肪細胞と脂肪幹細胞の最大の違いであり、純度が高い脱分化脂肪細胞は前述した通り移植における安全性の観点から脂肪幹細胞より有用であると考えている。

脱分化脂肪細胞は成熟脂肪細胞のマーカーが完全に消失し、Runx2、Sox9、平滑筋αアクチンといった骨、軟骨、平滑筋の初期分化マーカーを発現していることから間葉系前駆細胞の形質を

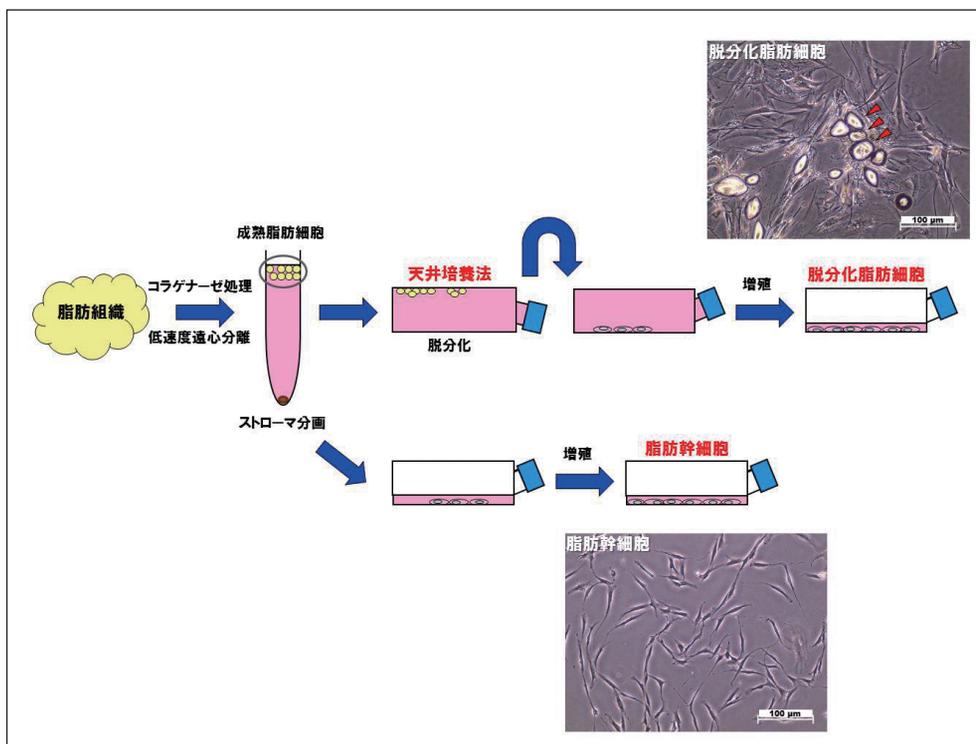


図2 脱分化脂肪細胞と脂肪幹細胞の樹立方法（矢頭：成熟脂肪細胞に含まれる油滴）

もった細胞集団であると考えられている⁸⁾。脱分化脂肪細胞の「脱分化」とは「ひとたび分化した細胞が未分化な状態に戻る」という意味であり、成熟脂肪細胞のマーカーが脱分化脂肪細胞では消失していることからこの名前が付けられた⁹⁾。脱分化脂肪細胞は適切な分化誘導培地を用いて培養することで、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞などへ分化することが報告されている⁸⁾、¹⁰⁾。さらに脱分化脂肪細胞を障害部位へ移植することで、心筋梗塞モデルにおける心機能改善効果¹¹⁾、脊髄損傷モデルにおける運動機能改善効果¹²⁾が認められ、幅広い疾患に対する有用性が期待されている。また脂肪幹細胞と同じく脂肪組織から樹立されるため、採取に伴う侵襲が少なく、全身状態が不良な患者や高齢者からも調整できるといった利点を有する。

4. 脱分化脂肪細胞を用いた骨組織再生研究

歯周病患者における歯周組織再生、インプラント手術における骨造成、また腫瘍切除後の顎骨再建など歯科再生医療において骨は重要な標的臓器の一つである。また骨髄間質細胞、脂肪幹細胞を用いた骨組織再生の研究は多く、それらと脱分化脂肪細胞の比較を行うことでさらなる有用性を見出したいと考えた。

我々はまず、ウサギの鼠蹊部から脂肪組織を採取し、天井培養法を用いて脱分化脂肪細胞を樹立した。ウサギ脱分化脂肪細胞をプレートに播種し、骨分化誘導培地 (DMEM + 10% FBS、100 nM デキサメタゾン、50 μ M L-アスコルビン酸 2リン酸、10mM β -グリセロリン酸) またはコントロール培地 (DMEM + 10% FBS) にてそれぞれ3週間培養した。骨分化誘導培地にて培養した脱分化脂肪細胞は骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシン、カルシウムの発現量がコントロールと比較して有意に上昇した¹³⁾。次に人工合成ペプチド RADA16 (PuraMatrix™) を足場材料としてウサギ脱分化脂肪細胞の3次元培養を行った。脱分化脂肪細胞/RADA16複合体を骨分化誘導培地またはコントロール培地にて3週間培養した結果、オステオカルシン、カルシウム発現量は骨分化誘導培地にて培養した群で有意に増加

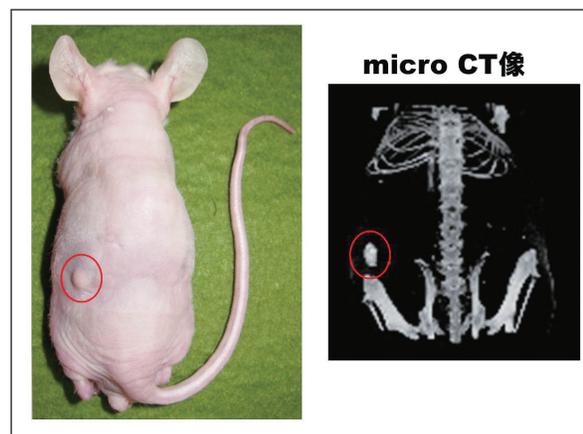


図3 ヌードマウス背部皮下に認められた石灰化物

し、骨髄間質細胞と比較してより早期に骨芽細胞へ分化することが示された。また von Kossa 染色を行い、脱分化脂肪細胞/RADA16複合体中にカルシウムの沈着が認められることを証明した¹⁴⁾。脱分化脂肪細胞/RADA16複合体をヌードマウス背部皮下に移植すると、12週間後には同部に石灰化物が確認された (図3)。さらにウサギ脱分化脂肪細胞をチタン線維の不織布である titanium fiber mesh (チタンウェブ細胞培養セルハウス) の中に播種し、骨分化誘導培地にて培養した。走査型電子顕微鏡による解析ではカルシウムの沈着を伴う石灰化物が細胞周囲に多数確認された¹⁵⁾。上記の結果から脱分化脂肪細胞は2次元、3次元培養どちらにおいても骨芽細胞へ分化することが明らかとなり、骨再生用ドナー細胞としての有用性が示唆された。

次に我々は臨床応用を目指すべく、ヒト脱分化脂肪細胞を用いた研究を開始した。大阪歯科大学医の倫理委員会による承認後、患者の同意を得て口腔外科手術時に切除され、術後廃棄予定の顎下部脂肪組織から天井培養法を用いて脱分化脂肪細胞を樹立した。また理研バイオリソースセンターよりヒト骨髄間質細胞を入手し、両細胞を骨分化誘導培地にて2週間培養した。その結果ヒト脱分化脂肪細胞はヒト骨髄間質細胞と比較してアルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、カルシウムといった骨芽細胞分化マーカーの発現量が有意に高かった¹⁶⁾。また他の患者に対する口腔外科手術時に患者の同意を得て頬脂肪体を採取し、天井培養法を用いて脱分化脂肪細胞を樹立した。図2に示す通り、同一脂肪組織から脱分化脂肪細胞と脂肪幹細胞の両方を樹立することが可能であ

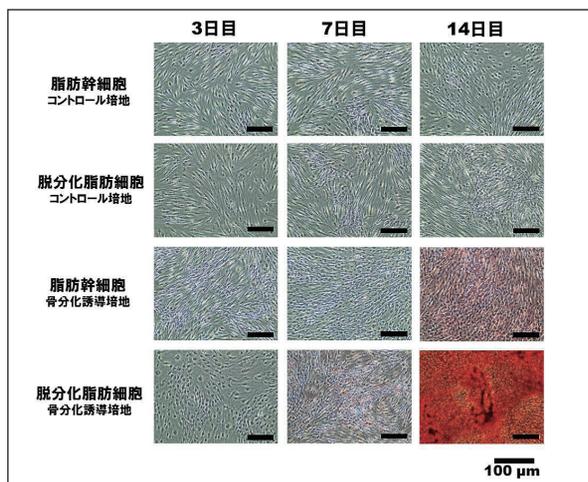


図4 アリザリンレッド染色（カルシウムが赤く染色されている）

り、患者の頬脂肪体から脂肪幹細胞も同時に樹立した。両細胞を骨分化誘導培地にて2週間培養した結果、脱分化脂肪細胞は脂肪幹細胞と比較して骨芽細胞分化マーカーの発現量が有意に高かった。さらにアリザリンレッド染色ではカルシウムの沈着を示す赤く染色された範囲が脱分化脂肪細胞を培養したプレートにおいて多く認められた¹⁷⁾ (図4)。以上のことからヒト頬脂肪体由来脱分化脂肪細胞は脂肪幹細胞より骨芽細胞分化能が高い細胞であることが示唆された。この研究で用いた脱分化脂肪細胞と脂肪幹細胞は同一患者の同一頬脂肪体から同時期に樹立された細胞である。また培養に用いた培地も同じであり、骨芽細胞分化誘導に関して同一条件下における脱分化脂肪細胞の優位性が明らかとなった。脱分化脂肪細胞が脂肪幹細胞と比較して骨芽細胞分化能が高い理由については現在調査中であるが、両細胞の純度の違いが影響している可能性がある。前述のとおり、脱分化脂肪細胞は均一な細胞集団であり、脂肪幹細胞より純度が高い⁸⁾。細胞一つ一つではなく、細胞集団として両細胞を比較した場合、脱分化脂肪細胞はほとんどが幹細胞で構成されているが、脂肪幹細胞は幹細胞と異種細胞から構成されていることになる。両細胞をほぼ同一数プレートに播種し、同じ骨分化誘導培地で培養した場合、細胞集団に含まれる幹細胞の割合が高い脱分化脂肪細胞の方が骨芽細胞分化能が高くなるのではないかと考えている。しかし、現段階ではこの仮説は証明されておらず、今後検討していきたい。

我々は脂肪組織採取部位として頬脂肪体を選択したが、皮下脂肪や内臓脂肪を採取部位として選

択した場合と比べ以下のような利点があると考えている。採取は口腔内から頬粘膜を切開して行うため、体表面に傷をつけることなく低侵襲に脂肪組織が採取可能であり、採取後の審美性にも優れている。また痩せ型の患者であっても皮下脂肪、内臓脂肪と比べ頬脂肪体はあまり減少しないことが報告されており¹⁸⁾、栄養状態が悪い高齢者からも採取が可能である。そして採取に関しては口腔内のスペシャリストである歯科医師にアドバンテージがあり、ヒト頬脂肪体由来脱分化脂肪細胞はまさに歯科再生医療に適したドナー細胞であると考えている。

5. 今後の展望とまとめ

脱分化脂肪細胞研究の歴史とその特徴、また現在までに我々が行ってきた研究成果について述べてきた。脱分化脂肪細胞は他の間葉系幹細胞と比較して優位な特徴をいくつも保持している。特に現在まで間葉系幹細胞研究の中心にある骨髄間質細胞や脂肪幹細胞と比べ、純度が高く、また骨芽細胞分化能が高い細胞である。また脂肪組織採取部位に頬脂肪体を選択すれば、採取後の審美性に優れ、あらゆる患者から低侵襲に脱分化脂肪細胞を樹立可能である。今後は小動物移植実験において、骨組織再生における有用性を検討する予定である。さらに、すでに臨床応用されているポリ乳酸等の生体分解性足場材料と組み合わせて大型動物を用いた前臨床試験における安全性と有効性を確認し、早期の実用化につなげたい。また、骨組織だけでなく、末梢神経再生、軟骨再生、唾液腺再生など歯科再生医療の対象となる様々な疾患に対する脱分化脂肪細胞の可能性についても探求していきたいと考えている。

参考文献

1. Evans MJ, Kaufman MH, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, 292: 154-156, 1981.
2. Takahashi K, Yamanaka S, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 126: 663-676, 2006.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, 284: 143-147, 1999.
4. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng*, 7: 211-228, 2001.
5. Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold P, Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration, *Aust Dent J*, 2013 (in press) .
6. Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H, Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs, *J Periodontol Res*, 38: 97-103, 2003.
7. Hynes K, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM, Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration, *Periodontol 2000*, 59: 203-227, 2012.
8. Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H, Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential, *J Cell Physiol*, 215: 210-222, 2008.
9. Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, Kano K, A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, 321: 967-974, 2004.
10. Kazama T, Fujie M, Endo T, Kano K, Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can transdifferentiate into skeletal myocytes in vitro, *Biochem Biophys Res Commun*, 377: 780-785, 2008.
11. Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama S, Kano K, Kusumi Y, Masuko T, Mitsumata M, Saito S, Hirayama A, Mugishima H, Fukuda N, Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats, *J Mol Cell Cardiol*, 47: 565-575, 2009.
12. Ohta Y, Takenaga M, Tokura Y, Hamaguchi A, Matsumoto T, Kano K, Mugishima H, Okano H, Igarashi R, Mature adipocyte-derived cells, dedifferentiated fat cells (DFAT) , promoted functional recovery from spinal cord injury-induced motor dysfunction in rats, *Cell Transplant*, 17: 877-886, 2008.
13. Kishimoto N, Momota Y, Mori R, Hashimoto Y, Imai K, Omasa T, Kotani J, Bone Regeneration Using Dedifferentiated Fat Cells with PuraMatrix™, *J Oral Tissue Engin*, 6: 127-134, 2008.
14. Kishimoto N, Momota Y, Hashimoto Y, Omasa T, Kotani J, Self-assembling Peptide RADA16 as a scaffold in Bone Tissue Engineering Using Dedifferentiated Fat Cells, *J Oral Tissue Engin*, 8: 151-161, 2011.
15. Kishimoto N, Momota Y, Hashimoto Y, Ando K, Omasa T, Kotani J, Dedifferentiated fat cells differentiate into osteoblasts in titanium fiber mesh, *Cytotechnology*, 65: 15-22, 2013.
16. Sakamoto F, Hashimoto Y, Kishimoto N, Honda Y, Matsumoto N, The utility of human dedifferentiated fat cells in bone tissue engineering in vitro, *Cytotechnology*, 2013 (in press) .
17. Kishimoto N, Momota Y, Hashimoto Y, Ando K, Omasa T, Kotani J, Comparison of osteoblastic differentiation abilities in dedifferentiated-fat-cells with adipose-stem-cells, *J Dent Res Special Issue A*, 92: Program No. 3954, 2013.
18. Farré-Guasch E, Martí-Pagè C, Hernández-Alfaro F, Klein-Nulend J, Casals N, Buccal fat pad, an oral access source of human adipose stem cells with potential for osteochondral tissue engineering: an in vitro study, *Tissue Eng Part C Methods*, 16: 1083-1094, 2010.