

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20552

研究課題名(和文) 多分化能を有する脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた顎骨再建法の確立

研究課題名(英文) Establishment of jaw bone reconstruction using by pluripotent dedifferentiated fat cell

研究代表者

柳 束 (YANAGI, TSUKASA)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：60758035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脱分化脂肪細胞(DFAT)は多分化能を有し、採取効率の良い間葉系幹細胞様細胞として注目されている。しかし、DFATを骨再生研究に用いている試みは少ないため、今回DFATを用いた顎骨再建に関する研究を行った。更に、骨分化能を向上させる試みとして、三次元培養法も組み込み、細胞実験及び動物実験を行った。細胞実験の結果、脂肪由来間葉系幹細胞(ASCs)よりDFATの方が骨分化能が優れており、更に三次元培養したDFATの方が骨分化能が優れていた。また、動物実験の結果、三次元培養したDFATを移植した群が最も優れた骨再生能を示した。

研究成果の概要(英文)：Dedifferentiated fat cell (DFAT) have pluripotency and are attracting attention as mesenchymal stem cell-like cells with high collection efficiency. However, since there are few attempts to use DFAT for bone regeneration research, we have conducted research on the reconstruction of the jaw using DFAT. Furthermore, as an attempt to improve osteogenic differentiation capacity, a three-dimensional culture method was also incorporated, and cell experiments and animal experiments were carried out. As a result of cell experiments, DFAT was superior in bone differentiation ability to adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs), and DFAT further cultured in three dimensions had better bone differentiation ability. In addition, as a result of animal experiments, the group transplanted with three-dimensionally cultured DFAT showed the best bone regeneration ability.

研究分野：口腔インプラント学

キーワード：脱分化脂肪細胞 骨再生 スフェロイド 骨分化誘導

1. 研究開始当初の背景

骨再生研究には主に間葉系幹細胞(MSC)が用いられる。しかし、MSC や脂肪由来間葉系幹細胞(ASCs)は採取時に含まれる幹細胞数が少なく、細胞分画もヘテロであることがデメリットとなっていた。そこで我々は成熟脂肪細胞を天井培養する事で得られる脱分化脂肪細胞(DFAT)に着目した。DFAT は成熟した脂肪細胞のみが浮遊する環境で、成熟脂肪細胞自体が脱分化する事で得られる幹細胞様細胞であるため、採取効率も良く、細胞分画も均一になる。よってDFAT を用いる事で骨再生効率を向上させることが可能ではないかと考えた。また細胞の分化能を向上させる方法としてスフェロイド培養法が注目されている。しかし、DFAT とスフェロイド培養を組み合わせた研究は未だ見られない。

2. 研究の目的

本研究の目的は脱分化脂肪細胞 (DFAT) スフェロイドを用いて骨再生研究を行い、従来の方と比較、検討する事である。

3. 研究の方法

<in vitro>

10 週齢 SD ラット精巣周囲より脂肪沙組織を採取し、DFAT を採取した。スフェロイド培養に関しては、細胞シート技術を用いた培養ディッシュを作製した。DFAT 及び DFAT スフェロイドの分化能を比較するため、骨分化誘導条件下で qPCR 及びウェスタンブロット法にて骨関連遺伝子及びタンパクの発現を確認した。またカルシウム沈着を調べるためにアリザリンレッド染色を行った。

<in vivo>

10 週齢 SD ラット頭蓋骨欠損モデルを用いて DFAT 及び DFAT スフェロイドの骨再生能を比較した。頭蓋骨に直径 8mm の骨欠損を作製し、それぞれの細胞を Collagen Scaffold に含浸させ、移植した。3 か月後に  $\mu$ CT 撮影、屠殺、及び頭蓋骨のサンプリングを行い、病理組織学的評価を行った。

4. 研究成果

<in vitro>

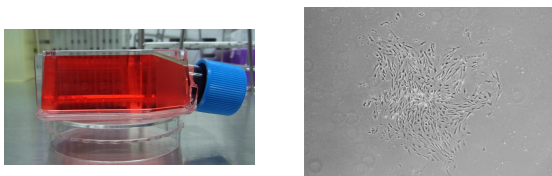


図 1.天井培養と DFAT

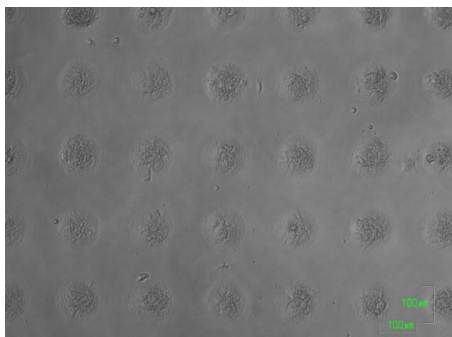


図 2 . スフェロイド作製

DFAT は図1のように天井培養する事で得られた。また、細胞シート技術を用いたディッシュを使用し、スフェロイドを作製する事で、手軽に、大量の、同一サイズのスフェロイドを作製する事が可能で、回収も容易であった ( 図 2 )。

アリザリンレッド染色

DFAT 及び DFAT スフェロイドに骨分化誘導を行い、アリザリンレッド染色を行った。DFAT 群より、DFAT スフェロイド群の方が早期に Ca 沈着像を示し、量も DFAT スフェロイド群の方が多かった ( 図 3,4 )

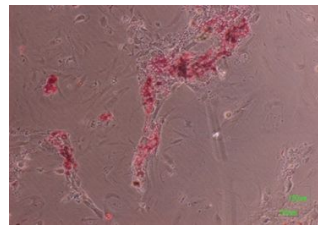


図 3 . アリザリンレッド染色(DFAT:day14)

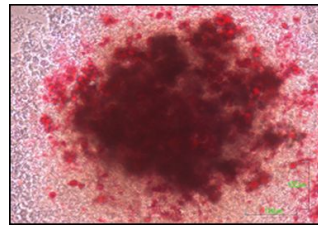
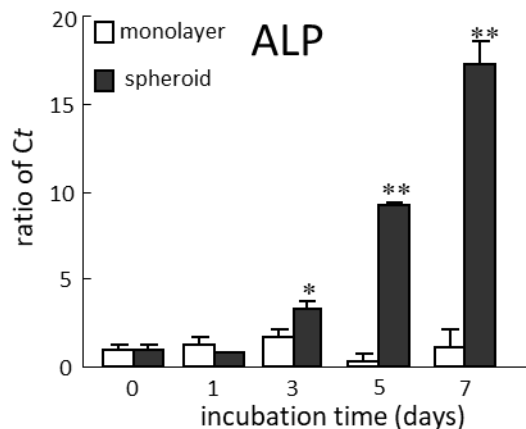


図 4 . アリザリンレッド染色(DFAT スフェロイド:day14)

qPCR

DFAT 及び DFAT スフェロイドにそれぞれ骨分化誘導を行い、Day0,1,3,5,7 をタイムポイントとしてリアルタイム RT-PCR を行った。ALP 及び Runx2 に関する qPCR の結果どちらもスフェロイド群の方が有意に発現が促進しているのが確認された。



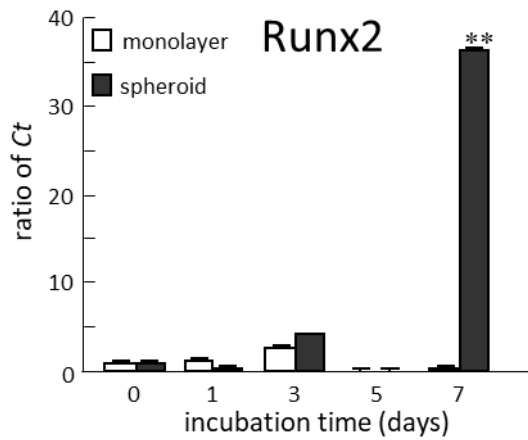


図5 . リアルタイム RT-PCR の結果

ウェスタンブロット

DFAT 及び DFAT スフェロイドに対して骨分化誘導を行い、Day0,1,3,5,7 をタイムポイントとしてウェスタンブロット法にて骨関連タンパクの発現を比較した結果、ALP、Runx2 及び OSX においてスフェロイド群の方が有意に高い発現を示した。

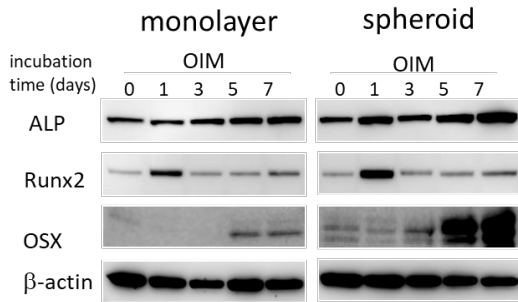


図6 . ウェスタンブロットの結果

( in vivo )

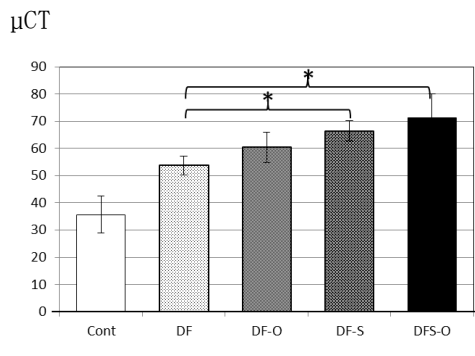


図7 . 算出した新生骨形成率 \*P<0.05

移植術3ヵ月後にμCT撮影を行い、μCT画像を基に画像解析ソフト(WINROOF)を用いて新生骨形成率を算出した(図7)。最も新生骨の形成率が多かったのは骨分化したDFATスフェロイドを移植した群であった。骨分化誘導を行ってなくても、DFスフェロイド群はDF群に対して有意に高い新生骨の形成率を示した。

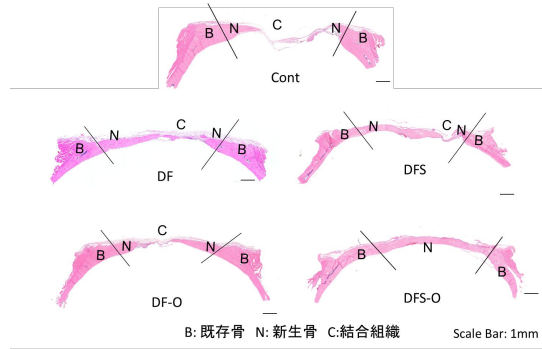


図7 H.E 染色像

H.E 染色を行った結果、骨分化誘導を行ったDFATスフェロイド群では欠損部のほとんどが骨組織に置換されていたが、他の群では欠損部に線維性結合組織が見られた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 5件)

柳東, 鍛冶屋浩, 今村彩香, 岡部幸司, 城戸寛史, 大野純.

多能性を有する脱分化脂肪細胞を用いた3次元スフェロイド培養による骨再生促進効果.

第9回トランスポーター研究会九州部会  
2016年10月

柳東, 宮口直之, 松本彩子, 安松香奈江, 城戸寛史

脱分化脂肪細胞(DFAT)の骨分化誘導法と再生医療への応用

第23回日本歯科医学会総会  
2016年10月

柳東, 鍛冶屋浩, 今村彩香, 加倉加恵, 城戸寛史, 大野純  
DFATスフェロイドを応用した骨再生  
第16回日本再生医療学会  
2017年3月

Tsukasa Yanagi, Kae Kakura, Seiichi Fujisaki, Yujiro Isobe, Hiroshi Kajiya, Jun Ohno, Hirofumi Kido

Drastic effect of the new cell transplantation strategy for bone regeneration

iACD Annual Conference  
2017年5月

Tsukasa Yanagi, Hiroshi Kajiya, Ayaka

Imamura, Kae Kakura, Koji Okabe,  
Hirofumi Kido, Jun Ohno

Enhancement of bone regeneration using  
de-differentiated fat cells spheroids

第 35 回日本骨代謝学会総会  
2017 年 7 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柳 束 (YANAGI TSUKASA)  
福岡歯科大学 口腔歯学部 助教  
研究者番号：60758035

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )