

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17089

研究課題名（和文）脱分化脂肪細胞集塊(C-DFAT)を用いた新規骨再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of new bone regeneration therapy using Cluster of DFATs/ECM complex (C-DFAT)

研究代表者

篠原 敬哉 (SHINOHARA, Yukiya)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：30761647

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、口腔内疾患により失われた歯周・顎骨組織の再生のために、脱分化脂肪細胞集塊Cluster of DFATs/ECM complex (C-DFAT)を用いた新規骨再生療法の開発を目的としている。本研究の結果として天井培養によって得られたラットDFAT(rDFAT)を用いて、rDFAT自身が産生する細胞外基質(ECM)を利用したC-DFATの形成を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織幹細胞は加齢とともに減少していくことが知られており、組織内に存在する数も非常に少なくなる。中高年者や高齢者のQOLの維持・増進を考えた時、予知性の高い新規顎骨組織再生療法の開発は歯の保存や、理想的なインプラント治療の提供につながり、社会的見地からも極めて重要な課題である。そこで本研究の目的は、C-DFATの樹立、さらに顎顔面領域における歯周組織欠損、抜歯窩、顎骨再建などの骨欠損部に対して、scaffoldを用いずにC-DFATを細胞移植することで、安全・効率的かつ予知性の高い理想的な骨再生療法の基盤確立を目指すことであった。

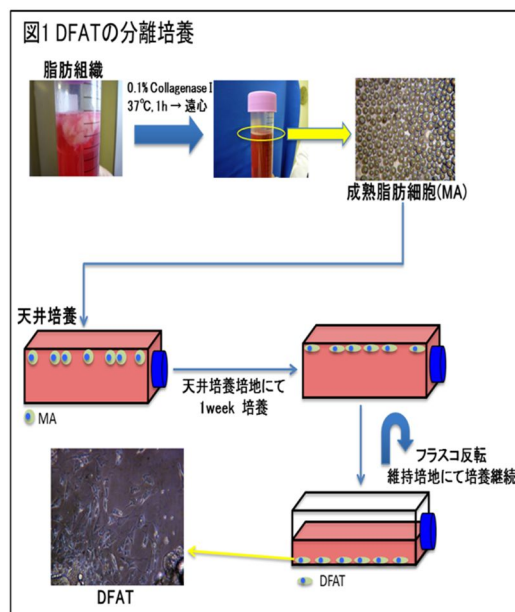
研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was development of new bone regenerative therapy for lost bone tissues due to periodontal and oral disease by using Cluster of DFATs/ECM complex (C-DFAT). I confirmed the formation of C-DFAT which used extracellular matrix (ECM) which rDFAT produced as a result of this study using rat DFAT(rDFAT) provided by ceiling culture.

研究分野：歯周病学

キーワード：DFAT C-DFAT 骨再生 歯周病

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病やその他口腔内疾患により失われた顎骨組織再生やインプラント治療時の顎骨骨増生のために、自家骨・異種骨・人工骨などの様々な骨移植材が用いられている。しかしながら(1)適応症が狭い(2)満足のいく予知性が得られない(3)自家骨採取における患者の苦痛(4)非吸収性の骨補填材の必要性(それによる体内への残存)など様々な問題が残されており、さらなる適応症の拡大と、理想的な骨組織再生を目的としてTissue engineering の3要素の観点から、A:成長因子 B:細胞移植 C:Scaffold について様々な研究が行われ、特に iPS 細胞の登場以来、細胞移植療法に注目が集まっている。もちろん、細胞移植の臨床応用を考えると、人工足場材の存在が不可欠となるが、人工足場材の細胞保持能、吸収性等の観点から、移植細胞数や細胞機能を制限するという問題点が残っており、現在のところ、これらの問題を打開できるような理想的な人工足場材は存在しない。そこで今回本研究で着目したのが、脱分化脂肪細胞集塊 Cluster of DFATs/ECM complex (C-DFAT)による細胞移植療法である。細胞はI型コラーゲンを主とする細胞外基質 (ECM) を産生している。この細胞自身が産生する ECM を利用し細胞集塊を形成することで、人工足場材を必要としない細胞移植が実現すると考えている。近年、ラット骨髄由来未分化間葉系幹細胞 (MSC) と ECM を利用して間葉系幹細胞集塊を形成し、ラット頭蓋骨欠損部に移植すると骨形成を促進する (Cytotherapy 2015;17:860-873) という報告がある。しかし、骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)の採取は患者の多大な侵襲を伴い、採取される幹細胞数も限定され複数回の採取が困難などの欠点がある。一方で、脂肪組織は脂肪吸引技術の進歩により容易に入手可能である。DFAT は成熟脂肪細胞から天井培養(図1)と呼ばれる方法で体外培養することにより生じる線維芽細胞様の細胞群で、高い増殖能と脂肪・軟骨・骨・筋などへの多分化能を有しており(J Cell Physiol.2008;215:210-22)、BM-MSC や間質・血管系画分(stromal-vascular fraction, SVF)から分離される脂肪由来幹細胞(ADSC)と比較し、高純度の細胞が入手可能で、組織採取量が微量ですむことから、高齢者からも調整可能である。よって本研究では安全かつ効率よく細胞採取が可能で、幅広いニーズに対応できる C-DFAT による細胞移植療法は顎顔面領域における骨再生療法の新時代を切り開くのではないかと期待した。



## 2. 研究の目的

組織幹細胞は加齢とともに減少していくことが知られており、組織内に存在する数も非常に少なくなる。中高年者や高齢者の QOL の維持・増進を考えた時、予知性の高い新規顎骨組織再生療法の開発は歯の保存や、理想的なインプラント治療の提供につながり、社会的見地からも極めて重要な課題である。DFAT は細胞の純度、増殖能、分化能、また入手の容易さ(患者侵襲の軽減)から高齢者からも調整可能であるなどの多くの利点を有しており、細胞移植療法のソースとして有用であるが、細胞移植する際の scaffold として移植細胞数や細胞機能を制限しない理想的な scaffold が存在しないのが実状である。そこで本研究では C-DFAT を樹立し、scaffold を用いずに細胞移植することで DFAT 自身の細胞機能や trophic 効果を十分発揮できる環境を提供できると考えた。本研究の目的は、C-DFAT の樹立、さらに顎顔面領域における歯周組織欠損、抜歯窩、顎骨再建などの骨欠損部に対して、scaffold を用いずに C-DFAT を細胞移植することで、安全・効率的かつ予知性の高い理想的な骨再生療法の基盤確立を目指すことであった。

## 3. 研究の方法

本研究は鹿児島大学動物実験委員会(D17027)の承認のうえ、実施された。

(1)rat DFAT (rDFAT)の分離培養(Matsumotoらの方法に準じる)<sup>1)</sup>

Wistar 系ラットの鼠径部より脂肪組織採取

0.1% Collagenase I を用いて、37℃、1時間 gentle shaking

Filtrate 後、135g で3分間遠心

維持培地にて1週間天井培養

フラスコを反転し、継続して培養 rDFAT

(2) 脱分化脂肪細胞集塊(C-DFAT)の樹立(Kittakaらの方法を参考)<sup>2)</sup>

rDFAT を24well plate に播種し、50 μg/ml のアスコルビン酸含有増殖培地(DMEM +

FBS20%)にて7日間培養

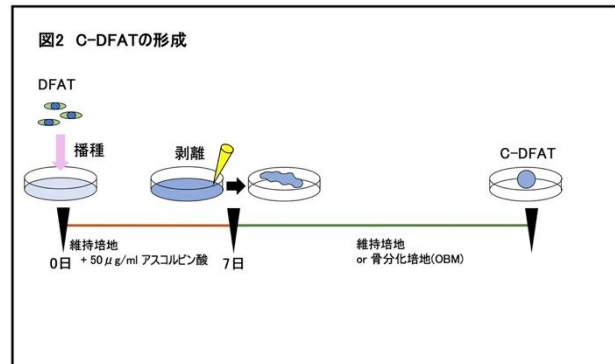
マイクロピペットチップにて rDFAT と ECM の細胞シートを剥離

rDFAT/ECM 複合体をさらに維持培地もしくは骨分化培地にて培養することで C-DFAT を形成 (図2)

<参考文献>

1)Matsumoto, T. et al; Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells Exhibit Multilineage Potential. J Cellular Physiology. 215, 2008: 210-222.

2)Mizuho Kittaka et al; Clumps of a mesenchymal stem cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration Cytotherapy, 17 (2015) 860-873



#### 4. 研究成果

(1) rDFAT 分離・培養

ラットの脂肪細胞を天上培養することにより、線維芽細胞様の細胞構造を持つ rDFAT を獲得した。

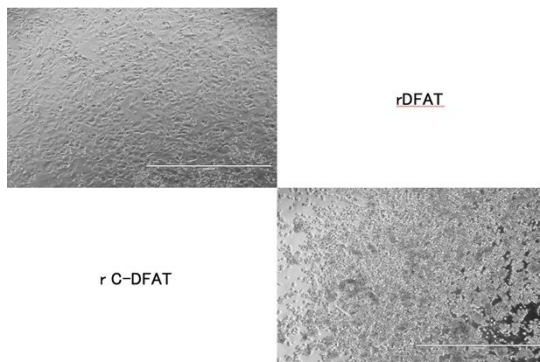
(2) rDFAT の BMP-9 および FK-506 共刺激下における ALP 染色, ALP 活性

rDFAT において、BMP-9 と FK-506 共刺激群は単独刺激群と比較して著しく ALP 染色の亢進を認めた。



(3) rC-DFAT の樹立

天井培養によって得られた rDFAT を用いて、rDFAT 自身が産生する細胞外基質(ECM)を利用した脱分化脂肪細胞集塊 Cluster of DFATs/ECM complex (C-DFAT)を形成した。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshinori Shrirakata, Toshiaki Nakamura, Yoshiko Kawakami, Takatomo Imafuji, Yukiya Shinohara, Kazuyuki Noguchi, Anton Sculean .	4. 巻 -
2. 論文標題 Healing of buccal gingival recessions following treatment with coronally advanced flap alone or combined with a cross-linked hyaluronic acid-gel. An experimental study in dogs .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcpe.13433	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshinori Shirakata, Takatomo Imafuji, Toshiaki Nakamura, Yoshiko Kawakami, Yukiya Shinohara, Kazuyuki Noguchi, Andrea Pilloni, Anton Sculean .	4. 巻 -
2. 論文標題 Periodontal wound healing/regeneration of two-wall intrabony defects following reconstructive surgery with cross-linked hyaluronic acid-gel with or without a collagen matrix. A preclinical study in dogs.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Quintessence International	6. 最初と最後の頁 308-316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3290/j.qi.b937003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Y. Shirakata, T. Nakamura, Y. Shinohara, K. Nakamura-Hasegawa, C. Hashiguchi, N. Takeuchi, T. Imafuji, A. Sculean, K. Noguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Split-mouth evaluation of connective tissue graft with or without enamel matrix derivative for the treatment of isolated gingival recession defects in dogs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00784-018-2750-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshinori Shirakata, Fumiaki Setoguchi, Kotaro Sena, Toshiaki Nakamura, Takatomo Imafuji, Yukiya Shinohara, Masayuki Iwata, Kazuyuki Noguchi.	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparison of periodontal wound healing/regeneration by recombinant human fibroblast growth factor-2 combined with -tricalcium phosphate, carbonate apatite, or deproteinized bovine bone mineral in a canine 1-wall intrabony defect model .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yoshinori Shirakata, Yukiya Shinohara .
2. 発表標題 Effects of hyaluronic acid on healing of gingival recession defects in dogs.
3. 学会等名 106th Annual Meeting American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takatomo Imauji, Yoshinori Shirakata, Yukiya Shinohara .
2. 発表標題 LIPUS enhances rhBMP9-induced bone formation in rat calvarial bone defects .
3. 学会等名 106th Annual Meeting American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今藤隆智, 白方良典, 篠原敬哉, 中村利明, 野口和行
2. 発表標題 リコンビナントヒトBMP-9とLIPUS照射がラット頭蓋骨欠損の骨再生に及ぼす影響
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今藤隆智, 白方良典, 篠原敬哉, 中村利明, 野口和行
2. 発表標題 ラット頭蓋骨欠損モデルにおけるリコンビナントヒトBMP-9と低出力超音波パルス照射による骨再生効果
3. 学会等名 令和元年度 日本歯周病学会九州五大学日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Shirakata, T. Nakamura, Y. Shinohara, K. Nakamura-Hasegawa, C. Hashiguchi, N. Takeuchi, T. Imafuji, A. Sculean, K. Noguchi
2. 発表標題 Healing of gingival recessions treated with coronally advanced flaps and subepithelial connective tissue grafts with or without enamel matrix derivative: A comparative study in dogs
3. 学会等名 Europerio 9 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関