

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390444

研究課題名(和文)脱分化脂肪細胞DFATを用いた歯周・顎骨組織欠損に対する新規再生治療法の基盤開発

研究課題名(英文)The development of new regenerative therapy for periodontal-bone tissue defects by using de-differentiated fat cells

研究代表者

野口 和行(Kazuyuki, Noguchi)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90218298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000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・骨組織の新規再生療法として脱分化脂肪細胞(de-differentiation fat cells: DFAT)を用いた細胞移植療法の基盤確立を目的としている。ラット頭蓋骨欠損モデルを用い検討した結果、乳酸・グリコール酸共重合体/ハイドロキシアパタイト複合体(PLGA/HA)を足場として用いた骨分化増地刺激ラットDFATの骨欠損への移植は骨再生に有効であることが示唆され、またin vitroにおいてBone morphogenetic protein (BMP)-9とFK506の共刺激が強力にラットDFATの骨芽細胞分化を促進する知見を得た。

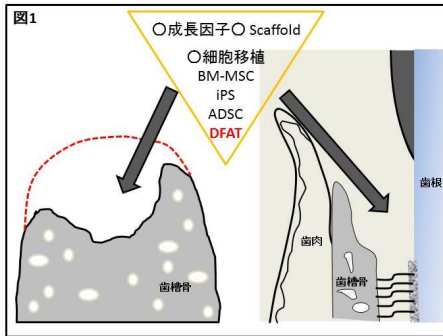
研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was established that the molecular biologic base of new cell-transplant therapy for lost of periodontal and bone tissues by using de-differentated fat cells (DFAT). Within the limits of the present study, we demonstrated that the poly lactic-co-glycolic acid/hydroxylapatite (PLGA/ HA) composite is a promising scaffold with an appropriate stiffness and resorption rate, and that its combination with osteo-differentiated rat DFAT may be effective for bone formation in rat calvarial defects model. Furthermore, in vitro study demonstrated that the combination of bone morphogenetic protein (BMP)-9 and FK506 effectively induces osteoblastic differentiation of rDFAT cells.

研究分野：歯周病学

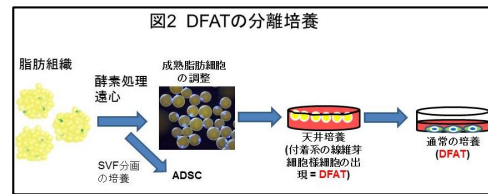
キーワード：脱分化脂肪細胞 歯周組織 骨 再生 DFAT

1. 研究開始当初の背景

歯周病により破壊される歯周組織は歯槽骨、セメント質、歯根膜といった複数の異なる組織によって構成される。また歯周病などの歯科疾患により歯が失われると、歯槽骨は次第に吸収し、口腔機能回復に様々な制約が生じる場合が多い。このような失われた歯周組織の再生や顎骨の造成を行う治療法としては、様々な骨移植剤(自家骨・合成骨・異種骨)や Signaling molecules(b-FGF, enamel matrix derivative, etc..) を作用させるなどの手法がとられている(図1)。



しかしながら 適応症が狭い 満足のいく予知性が得られない 自家骨採取における患者の苦痛 非吸収性の骨補填剤の必要性(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、効率的で理想的な歯周組織・顎骨組織の再生を目的として 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。本領域における細胞移植のソースとしては骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)を用いたヒトでの臨床試験が実施されているが、間葉系幹細胞の採取には患者に多大な侵襲を伴い、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。また iPS 細胞は、基礎研究段階であり分化のコントロールの手法は未だ確立しておらず、口腔領域への応用には時間を要すると思われる。そこで申請者は脂肪細胞に注目した。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り、脂肪組織由来間葉系細胞として、間質・血管系画分(stromal-vascular fraction, SVF)から分離した脂肪由来幹細胞(ADSC)が一般的である。しかし SVF は前駆脂肪細胞以外に血管内皮細胞、血球系細胞などが混在しており、ヘテロな細胞群である可能性は否定できない。そこで**脱分化脂肪細胞(DFAT)に着目した**。DFAT は成熟脂肪細胞から天井培養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、高い増殖能と多分化能を有しており(J Cell Physiol. 215:210-22, 2008) BM-MSC や ADSC に比べ、純度の高い細胞が入手可能で、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(図2)。



口腔内で検討されている細胞移植のソースとしては MSC, ADSC, 歯根膜由来幹細胞などがあるが、DFAT は入手の容易さ(患者負担の軽減)、細胞の純度、増殖能、脱分化による様々な組織への適応の可能性など多くの利点を有している。

2. 研究の目的

現在の歯周病やその他疾患により失われた歯周組織の再生療法や、インプラント治療時の顎骨の骨造成には、適応症の限界、異種動物由来の生物材料の必要性、自家骨採取量の制限または採取時の患者苦痛が不可避であるなど、様々な問題が残されており、広範囲の歯周組織または顎骨欠損に対し、安全で効率的な再生療法の開発が求められている。これらの問題点を解決する新規治療法として倫理的問題を克服し、かつ現実的な自家細胞移植療法が渴望されている。本研究では、このような細胞移植療法のソースとして非常に有望な、脂肪組織に由来する**脱分化脂肪細胞(De-differentiated fat cells: DFAT)**に着目し、歯周組織および顎骨再生への DFAT を用いた細胞移植療法の基盤を確立することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究は鹿児島大学動物実験委員会(MD12025, D13005, D14022)、遺伝子組換え安全委員会(機関承認: 第 24036)および鹿児島大学歯学総合研究科遺伝子解析研究倫理委員会(第 119 号)の承認のうえ、実施された。

(1) DFAT の分離培養

ラット DFAT(rDFAT): Wistar 系ラットの鼠径部より採取した脂肪を酵素処理し、脂肪細胞を採取後、天井培養にて分離培養した。

GFP 発現ラット由来 DFAT の分離培養

SD-Tg ラットの鼠径部より脂肪組織を採取し、準じて GFP 発現 DFAT(GFP-rDFAT)を分離培養した。

ヒト DFAT(hDFAT)

口腔外科手術時に採取した頬脂肪組織を酵素処理し、脂肪細胞を採取後、天井培養にて分離培養した。

(2) 遺伝子発現解析

DFAT を様々な条件下にて培養後、total RNA を抽出し、RT-PCR 法または Real-Time PCR 法を用いて各種遺伝子発現を解析した。

(3) 骨芽細胞様分化解析

DFAT を様々な条件下にて培養後、ALP 活性および ALP 染色を行った。ALP 活性についてはタンパク定量後、総タンパク量にて補正を行った。石灰化物形成は alizarin Red S 染色にて評価した。また smad1/5/8 のリン酸化

は wetsern blot 法にて解析した。

(4)DFAT の表面マーカー解析

CD11, CD29, CD45 および CD73 について、それぞれの抗体を用い Tali imaging cytometer によりその発現を解析した。

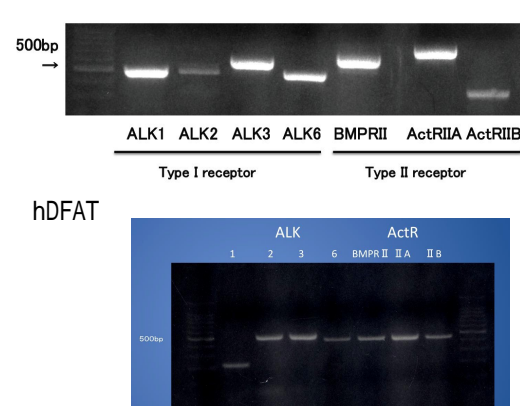
(5)ラット頭蓋骨欠損を用いた DFAT の骨形成性能の評価

麻酔下にて、トレフィンバー（直径 5mm）を用いてラット頭蓋骨左右に 5mm の骨欠損を外科的に作製し、骨欠損を以下の 4 つの実験群 (a-d) に分け処置を行った。

a: Control 群 (Scaffold 無し), b: PLGA/HA 群 (Scaffoldのみ: GC 研究用 scaffold ブロック HAP+), c: PLGA/HA + rDFAT, d: PLGA/HA + 骨分化刺激 rDFAT (OD), 8 週後に屠殺し、通常に従いパラフィン切片作成後、HE 染色を行い、骨形成について組織学的観察・解析を行った。

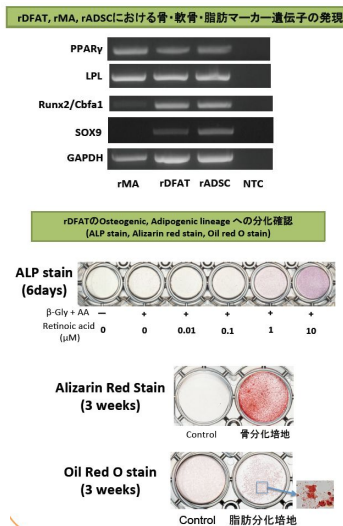
4. 研究成果

(1)DFAT の各種 BMP 受容体の遺伝子発現



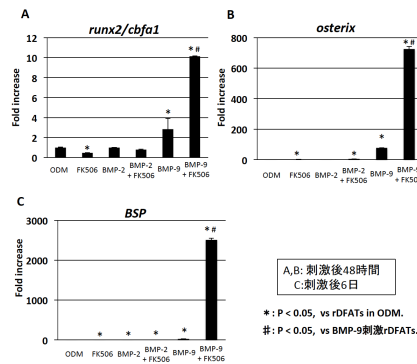
rDFAT および hDFAT いずれも主要な BMP 受容体 (ALK1, 2, 3, 6, BMPRII, ActRIIA, ActRIIB) の遺伝子発現が確認された。

(2)rDFAT の マーカー発現および骨・脂肪細胞への分化確認

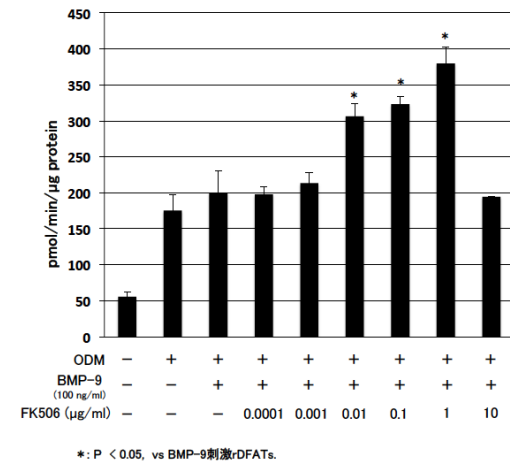


rDFAT において、PPAR γ , Runx2/Cbfa1, Sox9 の遺伝子発現が認められた。また脂肪分化・骨分化培地にて培養したところ、脂肪滴および石灰化物の形成を認め、脂肪細胞および骨芽細胞への分化が確認された。

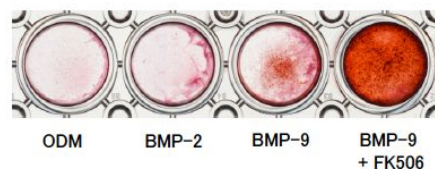
(3)rDFAT の BMP-2, BMP-9 および FK506 共刺激下における骨関連遺伝子, ALP 活性および石灰化物形成の変化



BMP-9 と FK506 共刺激群は他群と比較して著しい runx2, Osterix, Bone sialoprotein (BSP) 遺伝子の発現促進が認められた。(ODM: 骨分化培地)

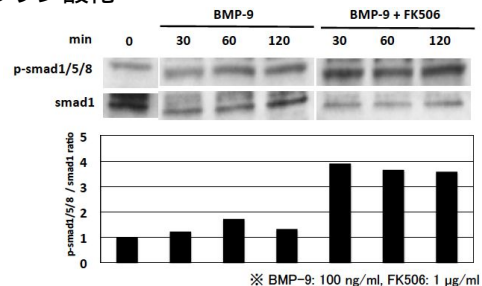


Alizarin red S 染色 (21日)

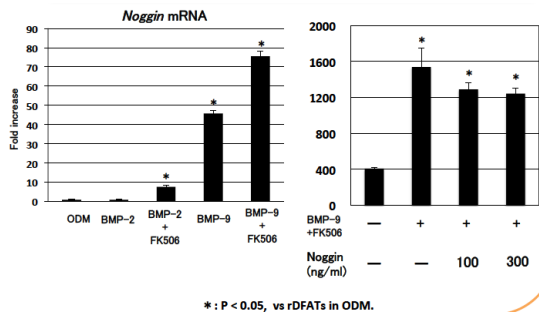


BMP-9 と FK506 共刺激群は単独刺激群と比較して著しく ALP 活性が上昇し、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の FK506 でピークが認められた。また単独刺激 (BMP-2, BMP-9) と比較して BMP-9 と FK506 共刺激群は著しい石灰化物形成の促進が認められた。

(4) rDFAT の BMP-9 刺激下における smad1/5/8 のリン酸化



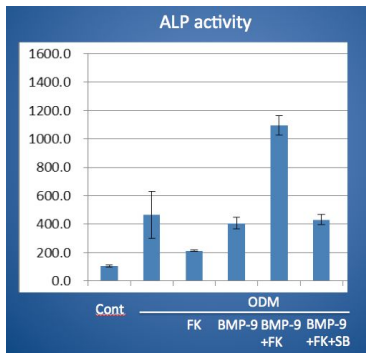
BMP-9 単独と比較して BMP-9+FK506 刺激では smad1/5/8 のリン酸化の促進が認められた。
 (5) BMP-9 刺激 rDFAT に対する Noggin の影響



BMP-2, BMP-9 ならびにそれぞれの FK506 共刺激群では Noggin の遺伝子発現は上昇したが、BMP-9+FK506 共刺激群では Noggin による ALP 活性の抑制は認められなかった。

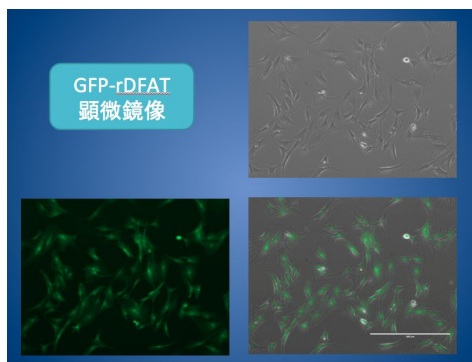
(6) rDFAT の表面マーカー解析
 CD11:1%, CD29:0%, CD4:2%5 および CD73:94% の発現が認められた。

(7) BMP-9 刺激 rDFAT における MAPkinase の影響



BMP-9+FK506 共刺激により上昇した ALP 活性は SB2035810 (p38 抑制剤) により抑制が認められた。

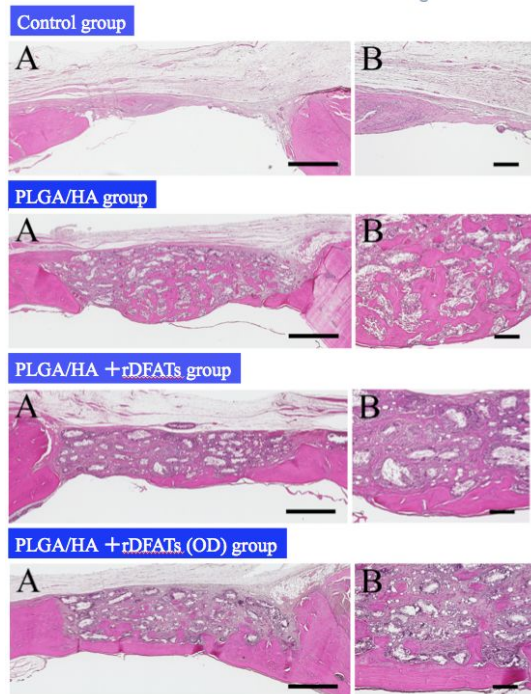
(8) GFP-rDFAT の分離、骨分化能確認



GFP-rDFAT を分離培養し、蛍光顕微鏡下で観察したところ GFP の発現を確認し、また rDFAT 同様に BMP-9+FK506 共刺激による ALP の上昇を確認した。

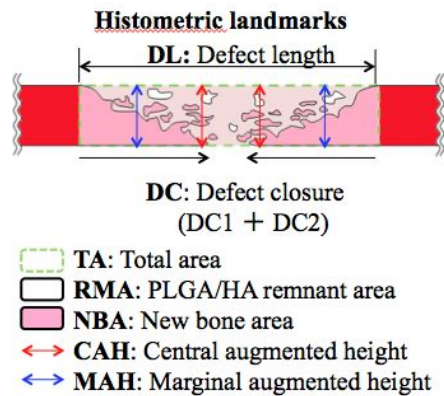
(9) ラット頭蓋骨欠損における rDFAT の滑稽性能評価

術後 8 週における各群の組織像 (HE 染色)



組織形態計測

計測項目



計測結果

Histomorphometric linear and area measurements in each group (Mean±SD).

Histomorphometric parameter	(1) Control n=9	(2) PLGA/HA n=9	(3) PLGA/HA+rDFATs n=10	(4) PLGA/HA+rDFATs(OD) n=10	Statistically significant differences P<.05
DL (mm)	4.82±0.15	4.82±0.30	4.86±0.20	4.84±0.22	NS
DC (mm)	1.93±1.39	3.02±1.19	3.26±1.58	4.03±0.70	(1) vs (4)
DC/DL (%)	40.61±29.62	62.29±23.90	67.00±32.48	83.16±13.87	(1) vs (2) (1) vs (4)
MAH (mm)	0.48±0.20	1.10±0.18	1.12±0.17	1.09±0.18	(1) vs (2) (1) vs (3) (1) vs (4)
CAH (mm)	0.22±0.09	1.22±0.22	1.18±0.24	1.21±0.29	(1) vs (2) (1) vs (3) (1) vs (4)
TA (mm ²)	4.57±0.33	4.98±0.75	4.94±0.61	5.00±0.46	NS
NBA (mm ²)	1.01±0.60	2.09±0.53	1.04±0.63	1.77±0.54	(1) vs (2) (1) vs (4) (2) vs (3)
RMA (mm ²)	NA	0.58±0.18	0.54±0.13	0.58±0.23	NS
NBA/TA (%)	22.17±13.08	42.10±9.16	21.35±13.49	35.54±11.02	(1) vs (2) (2) vs (3)
RMA/TA (%)	NA	11.65±3.34	10.94±2.43	11.45±4.13	NS

NS = non-significant NA = not applicable
 ANOVA, Bonferroni's post hoc test

術後8週でPLGA/HAの分解吸収は顕著に進んでおり、PLGA/HAを使用した3群はControl群より有意に再生組織の厚みが大きかった。PLGA/HA+rDFAT(OD)群における骨欠損の閉鎖率(83.16±13.87%)は全群間で最大であり、Control群(40.61±29.62%)より有意に高かった。骨欠損における新生骨面積はPLGA/HA群(42.10±9.16%)がControl群およびPLGA/HA+rDFAT群より有意に大きい値を示した。

(10)まとめ

本研究において多分化能を持つ組織幹細胞としてのDFATについて以下の点が示された。骨分化刺激DFATの骨欠損移植における骨再生の有用性がラット頭蓋骨欠損モデルにより示唆された。DFATの骨分化刺激因子としてBMP-9とFK506の共刺激の有効性が示唆された。

しかしながら主に動物(ラット)を用いた骨に対する評価が主であり、今後ヒト由来DFATや、複雑な組織構造を持つ歯周組織欠損についてのDFATの有効性など様々な検討課題は残されており、今後もより詳細に解析していかなければならない。

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3件)

(1) Yoshinori Shirakata*, Toshiaki Nakamura*, Yukiya Shinohara, Katsuyoshi Taniyama, Kenji Sakoda, Takehiko Yoshimoto and Kazuyuki Noguchi. An exploratory study on the efficacy of rat dedifferentiated fat cells (rDFATs) with a poly lactic-co-glycolic acid/hydroxylapatite (PLGA/HA) composite for bone formation in a rat calvarial defect model. *J Mater Sci Mater Med*, Vol.25, No.3, pp.899-908 (2014). DOI: 10.1007/s10856-013-5124-x

(2) Toshiaki Nakamura, Yukiya Shinohara, Sawako Momozaki, Takehiko Yoshimoto, Kazuyuki Noguchi, Co-stimulation with bone morphogenetic protein-9 and FK506 induces remarkable osteoblastic differentiation in rat dedifferentiated fat cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol.440, No.2, pp.289-294 (2013). DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.09.073

(3) 迫田賢二、白方良典、中村利明、野口和行. 細胞移植による歯周組織再生, 鹿児島県歯科医師会会報, Vol.110, No.689, pp.7-9 (2013).

[学会発表](計7件)

(1) 中村利明, 篠原敬哉, 桃寄佐和子, 野口和行. BMP-9とFK506の共刺激はラット脱分化脂肪細胞(rDFATs)の骨芽細胞様分化を促進する, 日本歯科保存学会2014年度春季学術大会(第140回), 2014年6月(滋賀).

(2) 中村利明. BMP-9とFK506の共刺激によるラット脱分化脂肪細胞(rDFATs)の骨芽細胞様分化, 第6回(平成25年度)口腔先端科学教育研究センター研究発表会, 2013年12月(鹿児島).

(3) 中村利明, 篠原敬哉, 桃寄佐和子, 吉元剛彦, 野口和行. BMP-9とFK506の共刺激によるラット脱分化脂肪細胞(rDFATs)の骨芽細胞様分化. 平成25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, 2013年11月(福岡(小倉)).

(4) 中村利明, 白方良典, 篠原敬哉, 谷山勝義, 迫田賢二, 吉元剛彦, 野口和行. 脱分化脂肪細胞(DFAT)と乳酸・グリコール酸共重合体/ハイドロキシアパタイトコンポジットを用いたラット頭蓋骨欠損における骨再生, 第56回秋季日本歯周病学会学術大会, 2013年9月(群馬・前橋).

(5) Yoshinori Shirakata, Yukiya Shinohara, Katsuyoshi Taniyama, Toshiaki Nakamura, Kenji Sakoda, Takehiko Yoshimoto, Kazuyuki Noguchi. An exploratory study on the efficacy of rat dedifferentiated fat cells (rDFATs) with poly lactic-co-glycolic acid/hydroxylapatite (PLGA/HA) composite for bone formation in a rat calvarial defect model, the 10th Asian Pacific Society of Periodontology (APSP) Meeting, 2013年9月(Nara, Japan).

(6) 中村利明, 迫田賢二, 谷山勝義, 篠原敬哉, 野口和行, 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いたラット頭蓋骨欠損モデルにおける骨組織再生. 第137回日本歯科保存学会2012年度秋季学術大会, 2012年11月(広島).

(7) 中村利明, 吉元剛彦, 迫田賢二, 野口和行. 脱分化脂肪細胞(DFAT)のBone morphogenetic proteins刺激による骨芽細胞様分化, 第55回春季日本歯周病学会学術大会, 2012年5月(札幌).

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

無し

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野口 和行 (NOGUCHI KAZUYUKI)
鹿児島大学・大学院・医歯学総合研究科
・ 教授, 研究者番号: 90218298

(2)研究分担者

中村 利明 (NAKAMURA TOSHIAKI)
鹿児島大学・大学院・医歯学総合研究科
・ 助教, 研究者番号:60381183

迫田 賢二 (SAKODA KENJI)
鹿児島大学・大学院・医歯学総合研究科
・ 助教, 研究者番号: 70419654

吉元 剛彦 (YOSHIMOTO TAKEHIKO)
鹿児島大学・大学院・医歯学総合研究科
・ 客員研究員, 研究者番号: 60419653