

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463033

研究課題名(和文)顎顔面軟骨再生における頬脂肪体由来脱分化脂肪細胞のトランスレーショナル研究

研究課題名(英文)Transportation research of dedifferentiated fat cells derived from the human buccal fat pad for maxillofacial cartilage regeneration

研究代表者

窪 寛仁 (KUBO, Hirohito)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70388362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：成熟脂肪細胞を起源に持つ脱分化脂肪細胞(DFAT細胞)は、多分化能を有するなど軟骨細胞調達への優れた細胞資源と考えられている。しかし、同細胞を効率的に軟骨分化誘導させる手法はほとんど明らかになっていない。本研究では、DFAT細胞の効率的な軟骨分化誘導法の開発を目指し、Bone morphogenetic protein(BMP)含有軟骨分化培地が同細胞の軟骨分化に及ぼす影響について検討を行った。BMP-4はDFAT細胞の軟骨分化を調節する因子であることが明らかとなった。軟骨分化誘導培地へのBMP-4の添加は、DFAT由来の軟骨細胞を調達するための有望な基盤技術となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Human dedifferentiated fat (hDFAT) cells are thought to be a promising cell source for cartilage regeneration therapy. Nevertheless, the responses of hDFAT cells to bone morphogenetic proteins (BMPs) are still unclear. Recombinant BMP-4 (100 ng/mL) increased the expression of SOX9, SOX6, and aggrecan mRNAs in monolayer cells compared with that in cells treated with BMP-2 or BMP-7 on day 3. Chondrogenically differentiated hDFAT cells induced by CM containing BMP-4 showed higher expression of eight genes in monolayer cultures and nine genes in pellet cultures compared with those in control medium on day 14. Dorsomorphin attenuated the effects of BMP-4. These results showed that BMP-4 had the potential to modulate the early chondrogenesis of hDFAT cells under both monolayer and pellet cell culture conditions.

研究分野：口腔外科学

キーワード：脱分化脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

一般に、軟骨組織は自己修復能に乏しく、いったん障害を受けると自然回復は望めない。それゆえに、軟骨再生医療は、皮膚や角膜などとともに再生医療のなかでも比較的臨床応用が進んでいる分野である。顎顔面領域においては降鼻術後のシリコンインプラント抜去例や鞍鼻などに対して、患者の軟骨組織から軟骨細胞を増殖培養させた後、移植して皮下再生軟骨を得るという方法が報告されている。しかし、自己の軟骨細胞を旺盛に培養させるには成長因子のカクテルが必要で、細胞治療において、骨髄間葉系幹細胞 (BMSCs) を使用するには疼痛を伴う骨髄穿刺が必要であると言った問題点がある。さらに BMSCs は heterogeneous な細胞集団であり、臨床応用における安全性を考慮した場合、より純度の高い幹細胞が必要である。脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells : DFAT cells) はすべての年齢層から少ない侵襲で採取可能で、天井培養法 (図 1) を用いて作製されるため、非常に純度の高い (homogeneous な) 細胞集団である。また高い増殖性、骨、軟骨、脂肪などの組織に分化する多能性を有し、再生医療用ドナー細胞として期待されている。

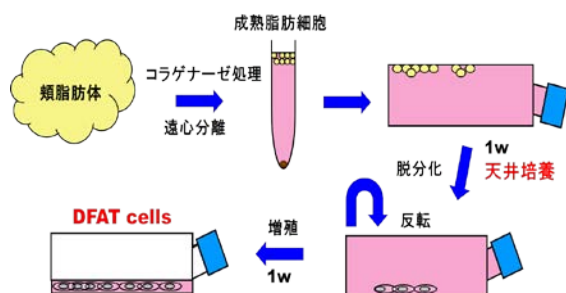


図 1.天井培養法による DFAT cells の作製方法

申請者らは DFAT cells を用いた骨組織再生の研究を行っており、ウサギ DFAT cells を 3 次元環境下で骨芽細胞分化誘導培地を用いて培養することによって、わずか 1 週間でカルシウム発現量が増加することを報告した。また、BMSCs と DFAT cells の骨芽細胞分化能を比較したところ DFATs は骨芽細胞分化のプロセスが早く、非常に分化能が高い細胞であることが示唆された。

また、軟骨再生医療の適応を、重度な軟骨損傷を伴う形態異常などへ拡大していくためには、力学的強度と適切な三次元形状を有する再生軟骨の開発が必要となる。我々はポリ乳酸のような生体高分子を紡糸し、織ることによって任意の 3 次元形状へと整形する特殊技術を保持している。

2. 研究の目的

DFAT cells を用いたオーダーメイド顎骨再生治療を臨床応用まで引き上げるには、基礎的研究 (35%) から、トランスレーショナル研究(30%)、臨床研究(35%)までが必要と考えられる。今回の期間内では、基礎研究に初期のトランスレーショナル研究を加えた、(1) 類脂肪体より獲得した DFAT cells の in vitro 軟骨再生の確立、(2) 同細胞と 3 次元担体を用いた顎口腔組織再生法の最適化、(3) 動物を用いた予備的検討を到達目標とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト類脂肪体由来 DFAT cells の獲得
ヒト DFAT cells の獲得は、研究分担者が以前にウサギ皮下脂肪から DFAT cells を作製した方法 (J Oral Tissue Engin 2011; 8: 151-161. J Oral Tissue Engin 2008; 6: 127-134.) と同様に行う。本学附属病院における口腔外科手術時に類脂肪体より採取された脂肪組織を細切し、コラゲナーゼ溶液中で処理する。得られた成熟脂肪細胞を通常培地 (DMEM + 20%FBS) で完全に満たされた 25 cm² フラスコに播種し、脂肪細胞がフラスコ内側の天井表面に接着するようフラスコの接着面を上方にして、培養する (天井培養法、図 1)。7 日後、培地を除去し、細胞がフラスコ底面に位置するようにフラスコを反対にし、通常培養を開始する。上記のプロセスを経て作製された細胞が DFAT cells である。

(2) DFAT 細胞の軟骨分化誘導

得られた DFAT 細胞の軟骨分化誘導は、下記の培地を用いて細胞を最長 14 日間刺激して行った：1. コントロール培地、2. 軟骨分化誘導培地、3. 2 の培地に 10 あるいは 100 ng/mL の BMP-2、BMP-4、BMP-7 のそれぞれを添加した培地、細胞は、単層培養法とペレット培養法の 2 種類の環境下で培養を行った。軟骨分化マーカーの遺伝子発現挙動については、定量 PCR 法を用いて調査した。

(3) αリン酸三カルシウム/コラーゲン (α-TCP/CS) 複合体の作製

α-TCP/CS はコラーゲン溶液に 150 mg/ml になるよう α-TCP を混合し、それをマイナス 80 度で凍結乾燥を行い、その後 140 度で真空熱架橋を行い、作製した。α-TCP/CS は走査型電子顕微鏡 (SEM) エックス線回折 (XRD) ならびにフーリエ変換赤外分光 (FTIR) を用いて行った。

(4) 先天性顎裂モデルの作製

異所性軟骨形成または、骨再生への応用のために先天性顎裂モデルの作製を行った。8週齢 F344 ラット雄に先天性顎裂モデルを作製する。下顎の下縁を覆って皮膚に切開を施す。下顎の中央の空間は下顎骨接合と呼ばれる。

4. 研究成果

(1) ヒト頬脂肪体由来 DFAT cells の獲得

培養5日目のフラスコに定着した細胞の顕微鏡写真を図2に示した。ASCsとDFATsに特徴的な細胞の所見が観察された。すなわち、ASCsにおいては線維芽細胞様の形態をした細胞の散在、DFATsにおいては脂肪滴の縮小、細胞質の伸展、および紡錘形の線維芽細胞様の形態などが認められた。

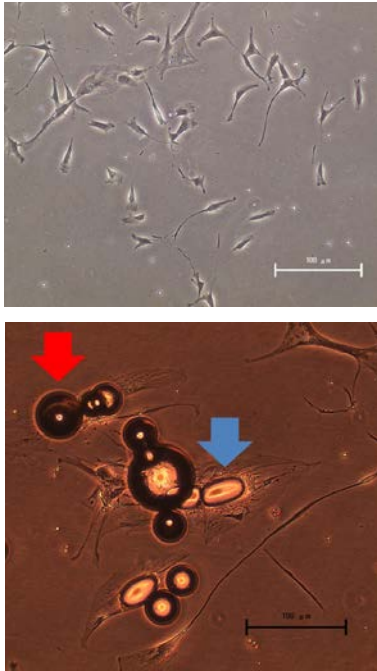


図2.天井培養法により作製されたASC(上)とDFAT cells (下) 脂肪滴 (赤矢印) DFAT cells (青矢印)

(2) DFAT 細胞の軟骨分化誘導

各 BMP を含有する軟骨分化培地 (CM) に曝された単層DFAT細胞の遺伝子発現挙動を比較した結果、BMP-4(100 ng/mL)含有軟骨誘導培地が最も早く SOX9、SOX6、アグリカン (ACN) それぞれの発現を上昇させることが明らかとなった。

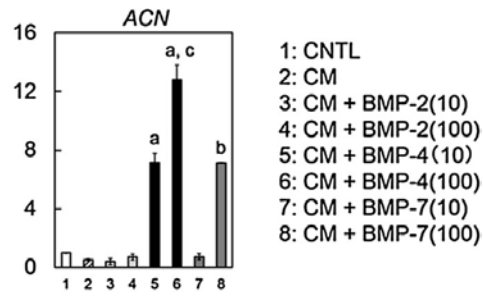
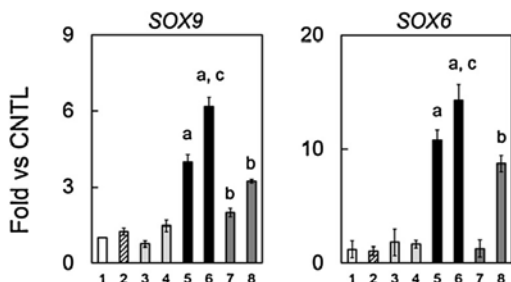


図3. 各 BMP を含有する軟骨分化培地に曝された単層DFAT細胞の遺伝子発現挙動

また、単層培養で免疫染色においてもACN、タイプIIコラーゲンの発現が上昇した(図4)。

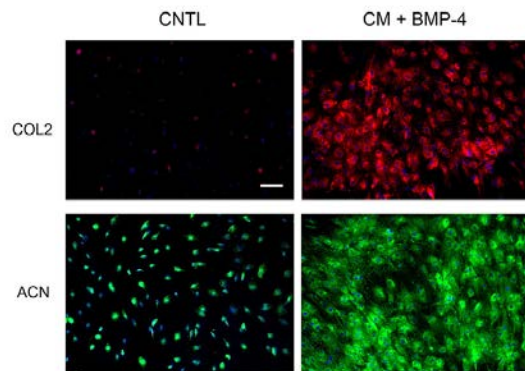


図4.免疫染色によるCMに曝された単層DFAT細胞のタンパク発現挙動

BMP-4含有軟骨培地で14日間培養されたDFAT細胞は、単層培養法とペレット培養法の両培養法のいずれの培養環境下においても共に、コントロール培地で培養された細胞に比べ、アグリカン、II型コラーゲンを含む複数の軟骨分化マーカーの発現が上昇していた。SOX5の発現は、単層培養下ではコントロール培地で刺激された細胞より低下し、一方、ペレット培養下では上昇が認められるなど相反する結果となった。

以上の結果より、BMP-4はDFAT細胞の軟骨分化を調節する因子であることが明らかとなった。更なる詳細な検討が必要であるが、軟骨分化誘導培地へのBMP-4の添加は、DFAT由来の軟骨細胞を調達するための有望な基盤技術となる可能性があることが示唆された。

(3) α -TCP/CS複合体の作製

また、当初の研究目的では、ポリ乳酸のような生体高分子を紡糸し、織ることで任意の3次元形状へと整形する足場材料を用いる予定であったが、材料が疎水性のため細胞播種が困難であり、コラーゲンを主体とする材料

へと変更した。コラーゲン線維の中に α -TCP が存在していることが図 5 よりわかる。

この足場材料に、足場内を陰圧にすることで DFAT を播種し BMP-4 含有軟骨培地で 2 週間培養しアルシアンブルー染色を施したところ青く染色されたため培養軟骨に変化したことが明らかとなった。

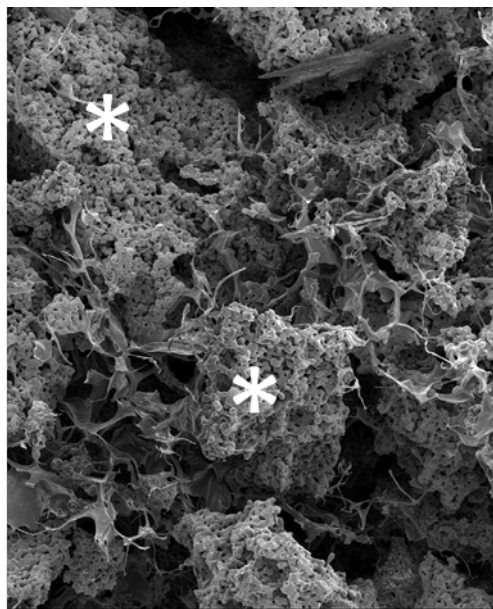


図 5. α -TCP/CS 複合体の SEM 画像 (アスタリスクは α TCP)

(4) 先天性顎裂モデルの作製

ラット雄に先天性顎裂モデルを作製することに成功し、現在移植実験を行っている。

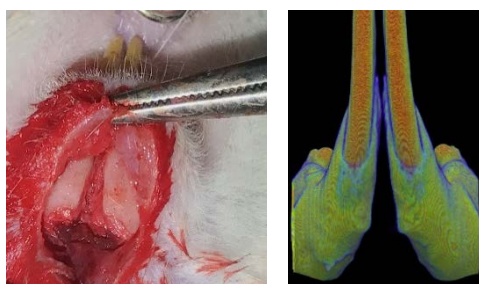


図 6. ラット先天性顎裂モデル (左) とラットによる骨増生評価

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 4 件)

- ① Azumi E, Honda Y, Kishimoto N, Hashimoto Y, Matsumoto N. Gene expression profiles of early chondrogenic markers in

dedifferentiated fat cells stimulated by bone morphogenetic protein 4 under monolayer and spheroid culture conditions in vitro. *Orthodontic Waves* 2016; 75: 97-104. 査読有

- ② Nishio A, Kubo H, Kishimoto N, Hashimoto Y, Kakudo K. Chondrocyte differentiation of human buccal fat pad-derived dedifferentiated fat cells and adipose stem cells using an atelocollagen sponge. *J Osaka Dent Univ* 2015; 49: 185-196. 査読有
- ③ Okita N, Honda Y, Kishimoto N, Liao W, Azumi E, Hashimoto Y, Matsumoto N. Supplementation of strontium to a chondrogenic medium promotes chondrogenic differentiation of human dedifferentiated fat cells. *Tissue Eng Part A* 2015; 21: 1695-1704. 査読有
- ④ Okita N, Honda Y, Hashimoto Y, Kishimoto N, Matsumoto N. Effects of strontium ions on the chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *J Oral Tissue Engin* 2014; 12: 27-35. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 黄安祺, 李佩祺, 田中知成, 橋本典也, 本田義知, 馬場俊輔, エピガロカテキングレート結合ゼラチン埋入部位におけるマトリックス分解酵素の発現様式. 第 15 回日本再生歯科医学会, 2017 年 10 月 21 日. 大阪歯科大学 (大阪市)
- ② 安積瑛子, 本田義知, 岸本直隆, 橋本典也, 松本尚之. 単層あるいはスフェロイド培養下において BMP-4 によって刺激された脱分化脂肪細胞の初期軟骨マーカー遺伝子の発現挙動. 第 553 回大阪歯科学会例会. 2016 年 12 月 10 日. 大阪歯科大学 (枚方市)
- ③ Kubo H, Nishio A, Miya Y, Hashimoto Y, Kishimoto N. Chondrocyte differentiation ability of dedifferentiated fat cells compared with adipose-derived stem cells derived from the human buccal fat pad. *International Dental Materials Congress 2016* (国際学会). 2016 年 11 月 04 日. The Stones Hotel-Legian Bali 2016 年 11 月 04 日 (Bali, Indonesia).
- ④ 西尾謙宏, 窪寛仁, 岸本直隆, 橋本典也, 覚道健治, アテロコラーゲンスポンジを用いたヒト頬脂肪体由来の脱分化脂肪細胞と脂肪幹細胞の軟骨分化. 第 545 回大阪歯科学会. 2014 年 10 月 18 日. 大阪歯科大学 (大阪府、枚方市)

- ⑤ 西尾謙宏, 窪 寛仁, 覚道健治, ヒト頬脂肪体の DFAT cells と ASCs の 3 次元培養による軟骨分化能の比較. 第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2014 年 10 月 17 日. 幕張メッセ (千葉県、千葉市)
- ⑥ Nishio A, Kubo H, Hashimoto Y, Kakudo K. Comparison of chondrocyte differentiation ability using three-dimensional culture in an atelocollagen sponge on dedifferentiated fat cells and adipose-derived stem cells from the human buccal fat pad. AAOMS 96th Annual Meeting, Scientific Sessions & Exhibition in Conjunction with the Japanese Society and Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 2014 年 09 月 08 日, Hawaii Convention Center (Honolulu, USA).

6. 研究組織

(1)研究代表者

窪 寛仁 (KUBO, Hirohito)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：70388362

(2)研究分担者

橋本典也 (HASHIMOTO, Yoshiya)
大阪歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：20228430

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし