

令和元年9月8日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07306

研究課題名(和文) サケ白子由来DNAと骨芽細胞シートの併用による骨形成促進効果の検討

研究課題名(英文) Promotion of bone regeneration using osteoblastic cell sheets and salmon DNA scaffold

研究代表者

勝俣 由里 (Katsumata, Yuri)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：70626340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々が開発したDNAスキャフォールドは生体侵害性がなく、賦形性及び生体分解性を有し、加新規骨形成を亢進する骨伝導性をもつことを報告した。臨床的な細胞療法への可能性が高い脂肪組織由来の脱分化脂肪(DFAT)細胞の有用性を検討した。下顎骨欠損ラットを作成しDFAT細胞の移植による新生骨再生能を検討した。この結果、コラーゲンスポンジ以上の結果より、DFAT細胞を用いた細胞移植は自家細胞移植療法として将来有用で有り、これらを細胞シート形状として用いることでより迅速な治癒促進効果が望めることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨再生治療のためには、細胞(治療用細胞)、スキャホールド(足場)、増殖因子(サイトカイン)のこれら3つの必要条件を満たすことが重要と考えられている。これまでに、我々はサケの白子より抽出したDNAを素材としたDNAスキャホールドを開発した。このDNAスキャホールドは、生体侵害性はなく、賦形性及び生体分解性を有し、加齢マウスの頭蓋骨欠損部において新規骨形成を亢進する新規の骨伝導性をもつことを報告した。しかしながら、臨床応用を考えると高齢者や有病者の顎骨再建は治癒期間の遅延や感染リスク増大などの問題点があり、再生治癒期間を可能な限り短くする必要がある。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that the DNA scaffolds are non-biopathogenic, excipientibility and biodegradability. The scaffolds possess the osteoconductivity promoted new bone formation. We have to improve to shorten time course on regeneration and healing. In the present study, we examined the usage of adipose tissue-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells, which has high potential for clinical cell therapy. We examined regeneration ability of new bone by transplantation of collagen sponge and/or DFAT cells, compared with collagen sponge alone using mandibular bone defect model rat. The transplantation with DFAT cells significantly increased the rate of new bone formation 3 months after transplantation. The results suggest that the cell transplantation using DFAT cells is useful as autologous cell transplantation therapy in the future, and that a more rapid healing promoting effect can be expected by using these as a cell sheet shape.

研究分野：骨再生

キーワード：細胞シート DFAT

1. 研究開始当初の背景

骨再生治療のためには、細胞(治療用細胞)、スキャホールド(足場)、増殖因子(サイトカイン)のこれら3つの必要条件を満たすことが重要と考えられている。これまでに、我々はサケの白子より抽出したDNAを素材としたDNAスキャホールドを開発した。このDNAスキャホールドは、生体侵襲性はなく、賦形性及び生体分解性を有し、加齢マウスの頭蓋骨欠損部において新規骨形成を亢進する新規の骨伝導性をもつことを報告した。しかしながら、臨床応用を考えると高齢者や有病者の顎骨再建は治療期間の遅延や感染リスク増大などの問題点があり、再生治療期間を可能な限り短くする必要性がある。

2. 研究の目的

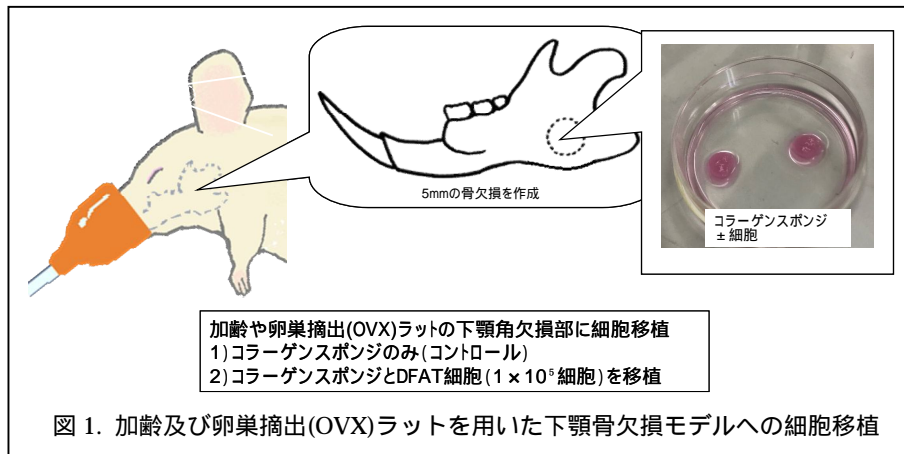
そこで、骨伝導能を持つDNAスキャフォールドと共に治療用細胞を併用することで更に骨再生治療期間を短縮させる事が可能ではないかと考えた。この再生促進効果を得るための方法として、生体状態に近く細胞外マトリックス存在し、細胞をシート状(細胞シート)として骨芽細胞を用いた再生療法の研究はいくつか報告がある。現在では、再生の足場材料に間葉系幹細胞を組み合わせによる再生療法が最も有望であることが示唆されている。自己移植の幹細胞源として脂肪組織が有用であることが知られており、脂肪組織由来の幹細胞には脂肪組織由来幹細胞(ASC)と脱分化脂肪(DFAT)細胞が知られている。この内、DFAT細胞は新たな再生療法の間葉系細胞源として注目されているが、骨再生への有用性に関し、詳細について未だ明らかではない。そこで、より臨床応用性が高いDFAT細胞が使用出来ると考えた。この細胞は、高い増殖能と間葉系幹細胞様の多能性を示すことが報告されている。既に、我々グループではDFAT細胞の単離・培養法を確立しているため、下顎骨欠損モデルを用いて、間葉系細胞の性質を有するDFAT細胞による細胞療法に骨形成効果について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

ラット脂肪組織よりDFAT細胞を単離培養し、この細胞の骨分化・基質分泌能を検討し、さらに加齢(30週以上)及び卵巣摘出による骨粗鬆症ラットを用い、下顎骨欠損モデル作成しDFATと移植による硬組織再生能を検討した。

In vitro 実験;ラット腹部脂肪組織からDFAT細胞を単離・培養し、骨分化誘導刺激(骨誘導培地やBMP-2)による基質形成能をアリザリンレッド染色法により調べた。

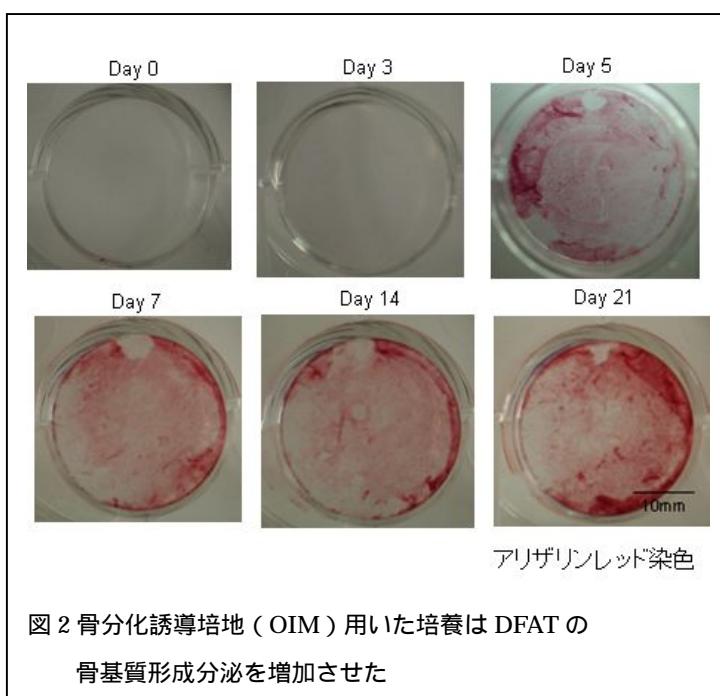
In vivo 実験;30週齢及び卵巣摘出ラットを作成し、下顎骨体部に直径5mmの骨欠損を作成しにコラーゲンスポンジ移植群(コントロール)とコラーゲンスポンジ+DFAT細胞移植群(DFAT)の新生骨形成率をマイクロCT像により継時的に撮影して比較評価を行った(図1)。すべての動物実験は、福岡歯科大学動物実験委員会(No. 18004)により定められた動物実験の倫理指針に従って行った。



4 . 研究成果

1) In vitro 実験

単離培養した DFAT 細胞の骨基質分泌能をアリザリンレッド染色にて調べた。この結果、骨誘導培地を用いた骨分化誘導刺激により 5 日目以降にカルシウム沈着によるアリザリン染色が陽性となった(図 2)。この結果はマウス骨芽細胞株(MC3T3-E1)や脂肪細胞由来幹細胞(ASC)におけるカルシウム沈着よりも少し早期におこる傾向が認められた(データ未提示)。さらに、この DFAT 細胞からの骨分化過程には従来知られている Smad1/5/8 の活性化よりも ERK の活性化を介した Smad2/3 による転写調節が主に関与することが示唆された。これらの結果より DFAT 細胞の骨分化形成過程は ASC と同程かそれ以上であることと思われる。



2) In vivo 実験

次に、DFAT 細胞の新生骨形成能を調べるために、加齢及び骨粗鬆症ラットを用い、トルフィンバーを使用して下顎角に直径 5mm の骨欠損を作製し、DFAT 移植 2, 4, 8, 12 週後の新生骨形成率をコントロールと比較した(図 3)。この結果、DFAT 細胞の移植はコントロールと比較して有意に骨形成が増加した。この DFAT 移植による新生骨形成率は 10~14 週間後に劇的に増加した。これらの変化は、3 ヶ月後採取した HE 像でも同様な結果であった。

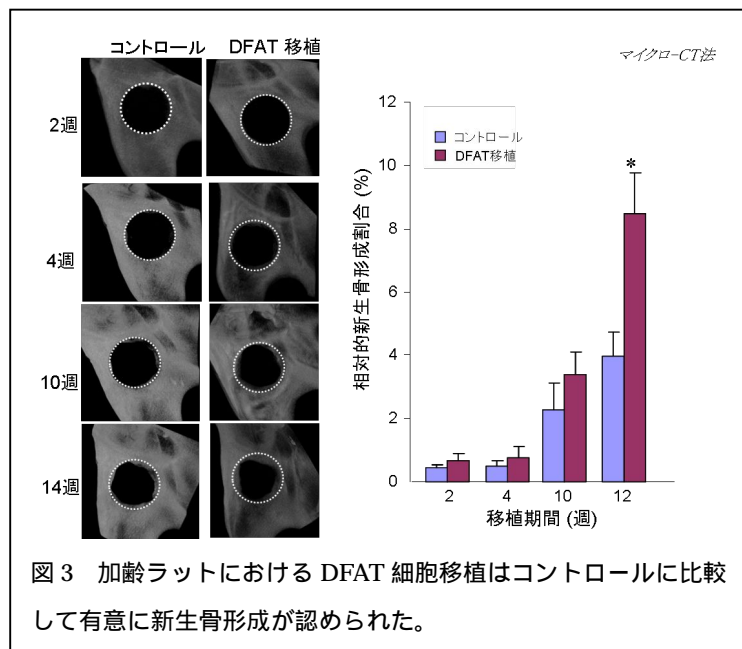


図 3 加齢ラットにおける DFAT 細胞移植はコントロールと比較して有意に新生骨形成が認められた。

以上の結果より、DFAT は下顎骨欠損に侵入し、骨芽細胞に分化し、下顎骨の新生骨形成を促進することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者名：首藤俊一、田中文恵、大林祐子、勝俣由里、佐々木三奈、橋本憲一郎、平木昭光、池邊哲郎

発表演題：口腔扁平上皮癌での PD-L2 の発現とバイオマーカーとしての有用性の検討
学会名：第 73 回 日本口腔科学会総会

発表者名：首藤俊一、鍛冶屋浩、佐々木三奈、勝俣由里、進正史、岡本富士雄、平木昭光、池邊哲郎、岡部幸司

発表演題：口腔扁平上皮癌における PD-1 リガンドの発現変化とその調節因子
学会名：第 45 回 福岡歯科大学学会総会

〔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：
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：
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

勝俣 由里 (KATSUMATA YURI)
福岡歯科大学・口腔歯学部・助教
研究者番号：70626340

(2)研究分担者

なし

(3)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。