

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20519

研究課題名(和文) DFAT細胞の歯周組織再生への応用

研究課題名(英文) Application of DFAT cell for periodontal regeneration

研究代表者

秋田 大輔 (AKITA, Daisuke)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：00736879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：重度の歯周疾患は高度顎堤吸収を伴うため、補綴装置が不安定となり、歯科治療は困難を極める。近年、細胞を用いた再生医療も盛んに研究されているが、多くの組織は採取に制限を伴うため、現実的な細胞源が模索されている。成熟脂肪細胞を天井培養した際に出現する脱分化脂肪細胞(DFAT)は、均一かつ高純度な細胞が簡便かつ大量に調整できるうえ、口腔内からも採取・調製可能なため、申請者らはDFATのラット歯周組織再生能の検討を行い、再生促進効果を報告した。現在は前臨床試験を検討しており、移植した欠損部一部の歯周組織再生が認められたが、飼育の利便性や、適齢期の試料体の確保などから使用動物を変更して進めている。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis makes dental treatment difficult because prosthesis device becomes unstable by highly ridge absorption. Recently, mesenchymal stem cell-based approaches have been researched for regenerative medicine. However, tissue harvesting is limited. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells (DFAT) which established by ceiling culture methods are easily isolated from a small amount of adipose tissue and are homogeneous cell population with high purity. DFAT cells can be established from buccal fat, we revealed that DFAT cells facilitate periodontal regeneration in inbred rat fenestration defects. Furthermore, we investigated the periodontal regenerative potential of DFAT cells in swine as preclinical examine. In consequence, newly formed periodontal ligament, cementum and alveolar bone were observed in DAFT cells transplantation group. However, we couldn't but change an animal to use because of easily controls rearing and the number of the suitable samples.

研究分野：歯科補綴学一般

キーワード：脱分化脂肪細胞 歯周組織再生

1. 研究開始当初の背景

歯科補綴学領域において、重度の歯周疾患は高度顎堤吸収による補綴装置の機能回復を困難にさせるため、支台歯周囲の歯周組織の状態が補綴治療の質と予後に大きく影響を及ぼす。

この困難な状態に対して、近年では組織・細胞を用いた再生医療も盛んに研究されている。組織再生には目的組織を構成する細胞に分化可能な細胞と、それを支持する生体材料のほか、適切な成長因子が必要と考えられており、口腔内組織に存在する間葉系幹細胞は歯周組織再生のための現実的な細胞源となりうる。口腔内から採取可能な組織は、歯（歯髄と歯根膜）、顎骨、骨膜、骨髄、脂肪などがあるが、歯や骨片を含めた骨や骨膜を採取することは患者の侵襲も大きいため、細胞源としての有用性は低い。

一方で、脂肪組織は脂肪細胞と間質細胞から構成され、類脂肪体として成人の中顔面に広く存在しており、比較的低侵襲に採取可能な器官である。申請者らは以前に、脂肪間質細胞群 (ASCs) と乳酸 - グリコール酸共重合体 (PLGA) の複合体が歯周組織再生に有用であることを明らかにした (Akita D et al. Biomed Res. 2014;35(2):91-103.)。

しかし、ASCs は平滑筋や血管内皮細胞が混在した不均一な細胞集団であるため、移植用細胞として必須な品質の維持や安定した移植効果が必ずしも望めないと考えられる。

対照的に、成熟脂肪細胞は長年増殖能力を失った終末分化細胞と考えられていたが、天井培養下でフラスコ天井側に付着すると非対称な細胞分裂により、線維芽細胞様細胞が出現し、高い増殖能と骨・軟骨・脂肪・血管・心筋細胞などの間葉系幹細胞と同等の分化能を有するため、DFAT 細胞 (図 1) と名付けられている (Matsumoto T et al. J Cell Physiol. 2008;215(1):210-22.)。

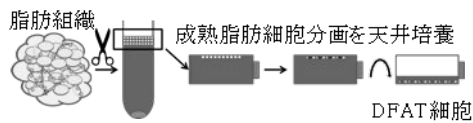


図1

DFAT 細胞の利点は、遺伝子導入や特別な試薬・手法を用いることなく、脱分化させることが可能であること、天井に浮遊する細胞は成熟脂肪細胞のみから構成されることから、均一かつ高純度な間葉系幹細胞を得られること、同量の脂肪組織から DFAT 細胞は ASCs よりも数倍多く採取可能なことが挙げられる。

さらに、障害部位への DFAT 細胞移植により、脊髄損傷モデルにおける運動機能の改善 (Ohta Y et al. Cell Transplant. 2008;17(8):877-86.)、骨粗鬆症モデルに対する骨密度増加促進 (Kikuta S et al. Tissue Eng Part A, 2013;19(15-16):1792-802.)、ラット急性心筋梗塞モデルに対する血管新生

促進 (Jumabay M et al. J Mol Cell Cardiol. 2009;47(5):565-75.)、など幅広い分野での移植効果を明らかにしている。

DFAT 細胞は、臨床応用を考えた場合に歯周組織においても移植細胞源として有用であると考え、申請者らは DFAT 細胞と PLGA 複合体のラット歯周組織再生能の検討を行ってきた (図 2)。

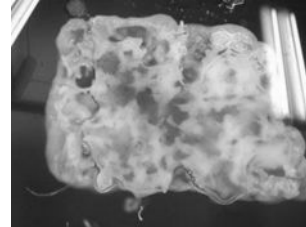


図2

その結果、DFAT 細胞と PLGA の複合体は、ASCs と PLGA の複合体や PLGA のみを移植したグループより移植後の硬組織再生量が有意に高かった (図 3) が、DFAT 細胞がセメント質、歯根膜、歯槽骨に分化する能力があるかどうかは明らかにされていない。

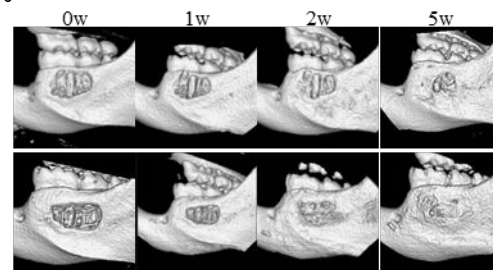


図3

(上段) 非移植群: 欠損部は継続的な硬組織再生が認められるが、完全な修復は到達していない。
(下段) DFAT 移植群: 欠損部は継続的な硬組織再生を示し、移植後5週ではほぼ完全に修復される。

2. 研究の目的

本研究では蛍光標識した DFAT 細胞を歯周組織欠損部に移植し、細胞の局在部位を解析するほか、GFP ラット由来の DFAT 細胞を同様に移植して免疫抗体染色から DFAT 細胞が歯周組織を構成する細胞に分化する能力があるかどうかを検討する。

さらに、日本大学では DFAT 細胞の医学領域への活用を見据えて、大型動物による前臨床試験が行われており、DFAT 細胞による組織再生メカニズムの解明やポリマー・メチルセルソースを用いた三次元スフィアや最適なスキャフォールドの開発、皮膚欠損モデルに対する DFAT 細胞の至適移植法が検討されている。

申請者らはこれらの研究協力者と共にブタ歯周組織欠損モデルに対する DFAT 細胞の移植方法を確立し、臨床応用に発展させた。

3. 研究の方法

(1) 歯周組織欠損部における DFAT 細胞の

局在部位の解析

蛍光標識させたラット DFAT 細胞を PLGA に播種し、作製した歯周組織欠損部に移植し、5 週後の再生組織内における細胞の局在部位を明らかにする。さらに GFP ラット由来の DFAT 細胞を同様に歯周組織し、免疫抗体染色から DFAT 細胞にセメント質・歯根膜・歯槽骨への分化能力を検討する。

(2) プタ歯周組織欠損モデルへの DFAT 細胞移植による効果の検討

日本大学では DFAT 細胞の臨床応用化、バンキング化を見据えて大型動物（イヌ・ネコ・ブタ）による前臨床試験を開始している。前述の細胞局在部位の解析が終了次第、ミニブタの下顎第二小臼歯歯根分岐部に規格的な歯周組織欠損モデルを作製し、DFAT 細胞を移植して、歯周組織再生能および生体安全性の検討を行う。

5 月齢のミニブタ（メス 6 頭：体重 25-30kg 程度）の皮下脂肪組織の採取と下顎右側第 2 小臼歯頰側の根分岐部に（縦 5mm×横 4mm×深さ 3mm）の欠損を作製後、ポリエーテル印象材で充填（= 1 次オペ）。4 週後に 1×10^6 の細胞を播種した（5mm×5mm×5mm）のコラーゲンスポンジを欠損部に移植後、メンブレン膜で被覆（実験群）。

コラーゲンスポンジのみを移植したグループを対照群として、縫合し旧位に復す（= 2 次オペ）。移植 12 週後、試料を摘出し、それぞれのプロービングデプス（ポケット深さ）およびアタッチメントレベルの測定を行う。さらに GFP 細胞移植による細胞局在部位の解析を行う。CT 撮影、組織学的解析（H&E・Azan 染色）と免疫蛍光染色解析（オステオカルシン・オステオポンチン・Runx2・ペリオスチン）から歯周組織再生能を検討する（図 4）。

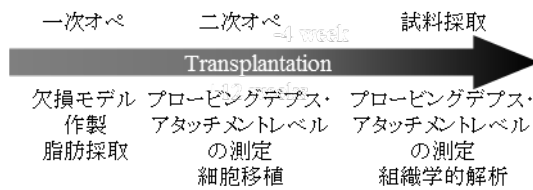


図4

4. 研究成果

移植 5 週後の DFAT 細胞移植群の硬組織再生量は対照群よりも有意に高い硬組織再生量を示した（図 5）。

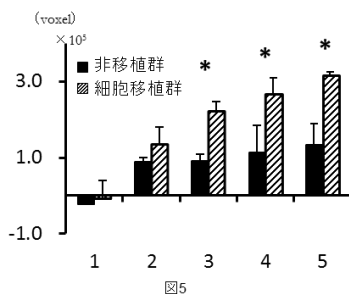


図5

組織学的解析から、両群において担体基質の残存と新生骨組織およびセメント質様組織の形成に加えて、再生した硬組織へのコラーゲン線維の埋入が認められた（図 6）。DFAT 細胞移植群における第 1 臼歯中央根および遠心根の新生セメント質様組織上には、対照群よりも太く発達した線維束が観察された（図 7）。

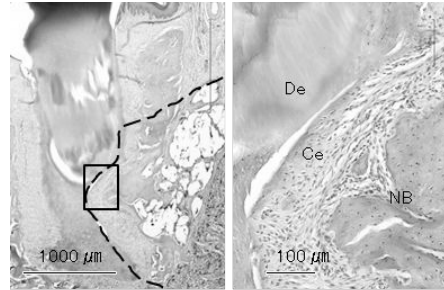


図6

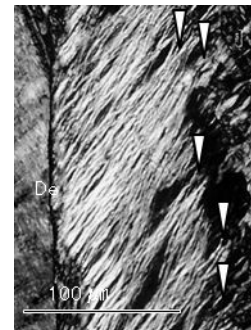


図7

また蛍光標識された DFAT 細胞は歯根膜組織中に多数散在しているほか、一部の細胞は新生セメント質と新生骨中に認められた（図 8）。

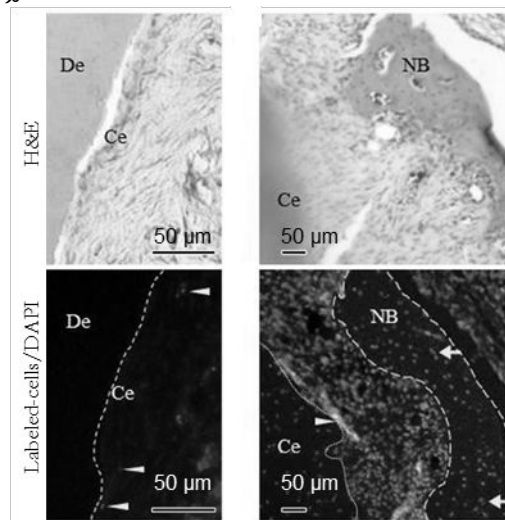


図8

ブタ歯周組織炎モデルへの移植後の DFAT 細胞の移植実験では 12 週間後の両群に歯根分岐部の歯周ポケットの改善とアタッチメントレベルの改善が認められた。また、組織学的解析から、両群において歯槽骨の再生が認められた。また DFAT 細胞移植群において、作製した歯根分岐部の一部に新生セメント

質と歯根膜様組織が観察された(図9)。

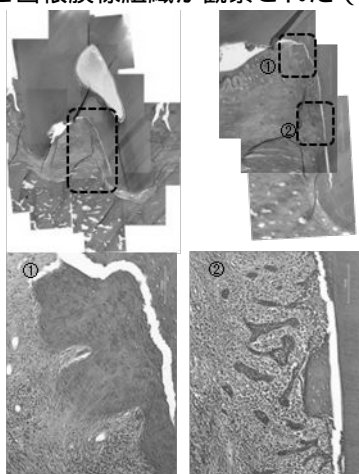


図9
細胞移植12週後の組織標本像
(弱拡大・中拡大・強拡大1・強拡大2)

しかしながら、飼育の利便性や、適齢期の試料体の確保などから使用動物を変更(マイクロナビタ)して進めている。

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)

Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Toriumi T, Kazama T, Oki Y, Tamura Y, Tonogi N, Shimizu N, Honda M (2018) Effect of collagenase concentration to isolate small adipocytes from human buccal fat pad. J Oral Sci, 査読有, 60(1):14-23.

Suzuki D, Akita D, Tsurumachi N, Kano K, Yamanaka K, Kaneko T, Kawano K, Iguchi S, Toriumi T, Arai Y, Matsumoto T, Sato S, Honda M (2017) Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells into three-wall defects in the rat periodontium induces tissue regeneration. J Oral Sci, 査読有, 59(4):611-620.

Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Toriumi T, Kazama T, Oki Y, Tamura Y, Tonogi M, Isokawa K, Shimizu N, Honda M (2016) Small buccal fat pad cells have high osteogenic differentiation potential. Tissue Eng Part C Methods, 査読有, 22(3):250-9.

Akita D, Kano K, Saito-Tamura Y, Mashimo T, Sato-Shionome M, Tsurumachi N, Yamanaka K, Kaneko T, Toriumi T, Arai Y, Tsukimura N, Matsumoto T, Ishigami T, Isokawa K, Honda M (2016) Use of rat mature adipocyte-derived

dedifferentiated fat cells as a cell Source for periodontal tissue regeneration. Front Physiol, 査読有, 7:50.

〔学会発表〕(計 1件)

秋田大輔, 月村直樹, 館野 敦, 大谷賢二, 永井栄一, 石上友彦. DFAT 細胞と乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) による歯周組織再生能の検討. 第 125 回日本補綴歯科学会 (2016),

〔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 1件)

名称: 脱分化脂肪細胞の取得方法
発明者: 本田雅規, 鶴町仁奈, 秋田大輔, 外木守雄, 加野浩一郎, 松本太郎
権利者: 学校法人 日本大学
種類: 特許
番号: 5991687号
取得年月日: 2016, 8, 26.
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋田 大輔 (AKITA, Daisuke)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号: 00736879

(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

鳥海 拓 (TORIUMI, Taku)
新井 嘉則 (ARAI, Yoshinori)
松本 太郎 (MATSUMOTO, Taro)
加野 浩一郎 (KANO, Koichiro)