

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20541

研究課題名(和文)脱分化脂肪細胞(DFAT)由来サイトカインカクテル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 cytokine cocktail derived from dedifferentiated fat cells (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) 3,000,000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・顎骨組織の再生のために、Bone morphogenetic protein(BMP)-9とFK-506によって共刺激した脱分化脂肪細胞(DFAT)の培養上清を用いた新規骨再生法の開発を目的としている。In vitroにおいて、BMP-9とFK-506で共刺激することでラットDFAT(rDFAT)培養上清中の様々なサイトカインが増加することが認められた。またラット頭蓋骨欠損モデルにおいてBMP-9とFK-506共刺激rDFAT培養上清の移植は骨再生の可能性を示唆した。

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 de-differentiated fat cells(DFAT) culture supernatant of bone morphogenetic protein(BMP)-9 and FK506 costimulation. In vitro study demonstrated that BMP-9 and FK506 costimulation induces increase of various cytokine in rat DFAT cells culture supernatant. Furthermore, we demonstrated that rDFAT cells culture supernatant of BMP-9 and FK506 costimulation have bone regenerative potential in rat calvarial defects model.

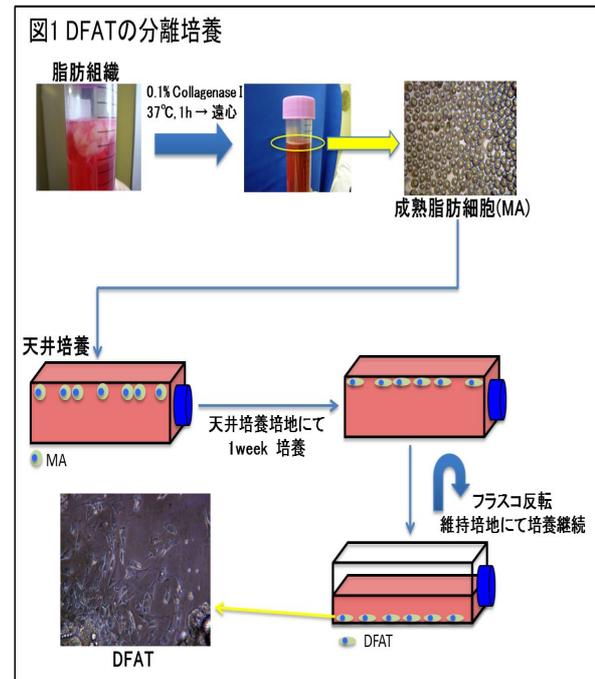
研究分野：歯周病学

キーワード：DFAT BMP-9 骨再生 歯周病 ADSC

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の再生やインプラント治療時の顎骨の骨増生のために、自家骨・異種骨・人工骨などの様々な骨移植剤が用いられている。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。しかしながら、細胞移植の臨床応用を考えると、細胞の品質・安全性を確保するために細胞培養施設 (cell processing center; CPC) の設置が必要不可欠であり、細胞培養における費用、人件費等の面からコストパフォーマンスが良いとは言いがたい。そこで、今回申請者が着目したのが、脱分化脂肪細胞 (DFAT) 培養時の培養上清を用いた骨再生療法である。細胞培養時に細胞は多数のサイトカインを培養上清中に分泌する (サイトカインカクテル)。この培養上清を適切な scaffold と共に骨欠損部に移植することで、内在性の幹細胞に作用し、細胞移植することなく骨組織再生が成功すると考えられている。近年、ヒト骨髄由来未分化間葉系幹細胞培養上清 (hMSC-CM) は、IGF-1, VEGF, TGF- β 1, HGF を含有しており、アガロースゲルと共にラット頭蓋骨欠損部に移植すると、骨形成を促進する (Tissue Eng Part A. 2012; 18: 1479-1489) 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。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。(図1)



2. 研究の目的

現在、口腔内疾患により失われた歯周・顎骨組織を再生させる手段が Tissue engineering の 3 要素を基盤に研究されている。その中で重要な役割を担う成長因子は、細胞を制御する必須の因子であり、様々な種類が検討されているが、決定的な物はいまだ存在せず、単一の成長因子では細胞の遊走・増殖・分化を十分にコントロール出来ないと考えられる。そこで本研究では、様々な液性因子を含むサイトカインカクテルとして、多分化能を持つ組織幹細胞の一つである脱分化脂肪細胞 (de-differentiated fat cell: DFAT) の培養上清に着目し、DFAT 培養上清の骨形成能を網羅的に解析し、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行う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 (D13008, D14022, D15016) の承認のうえ、実施された。

(1) DFAT の分離培養

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 週間天井培養後、フラス

コを反転し、継続して培養 rDFAT

底に沈んだペレットを通常培養 rADSC

(2)骨芽細胞様分化解析

rDFAT および rADSC を様々な条件下で培養し、ALP 染色および ALP 活性を行った。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。

(3)rDFAT 培養上清解析

rDFAT を様々な条件下で培養後、無血清培地に交換、培養上清回収し、ELISA 法にて IGF-1, VEGF, TGF- β 1, HGF に関して定量的に解析した。

(4)ラット頭蓋骨欠損モデルを用いた rDFAT 培養上清の骨形成能の評価

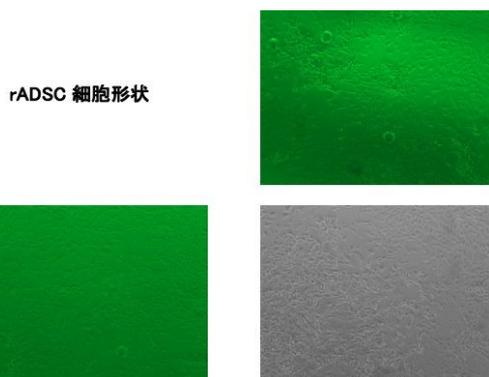
麻酔下にて、トレフィンバー（直径 5mm）を用いて、Wistar 系ラットの頭蓋骨左右に 5mm の骨欠損を外科的に作製し、骨欠損を以下の 2 つの実験群に分けてパイロット的に処置を行った。

- アテロコラーゲンスポンジ（ACS） + rDFAT 培養上清（無刺激）
- ACS + rDFAT 培養上清（BMP-9+FK-506 刺激）

8 週後に屠殺し、マイクロ CT (SKYSCAN1174) 撮影後、放射線学的解析を行った。

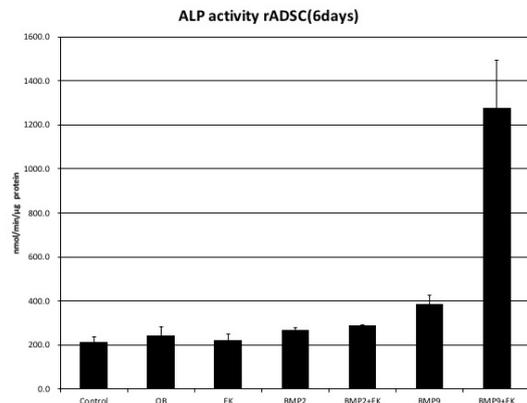
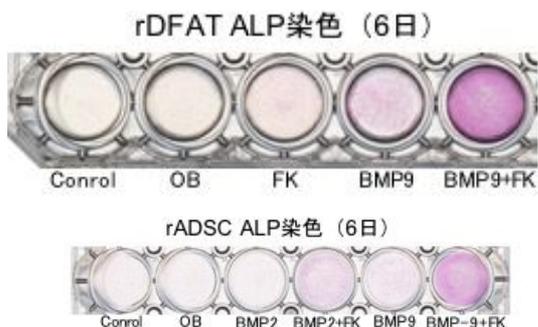
4. 研究成果

(1)rADSC 分離・培養



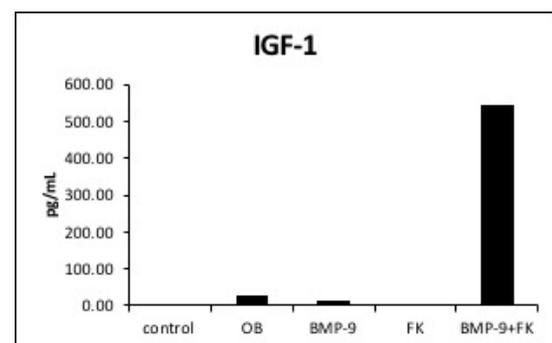
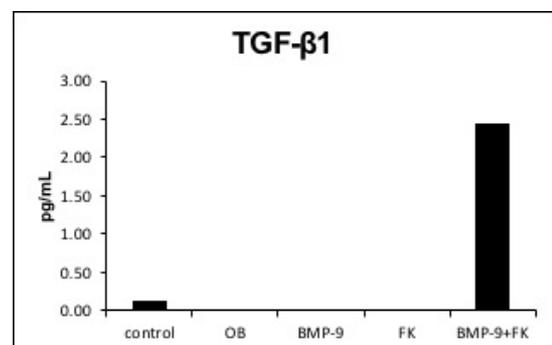
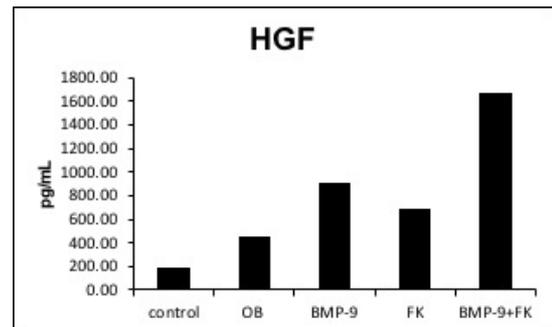
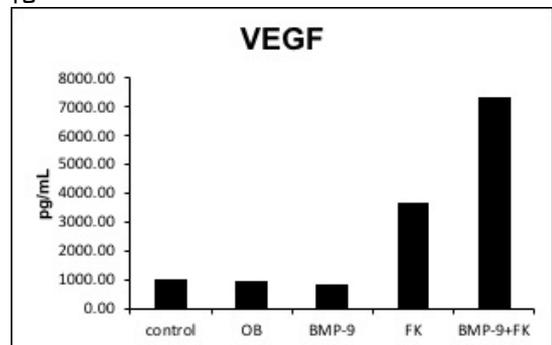
rDFAT と同様に線維芽細胞様の細胞が認められた。

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



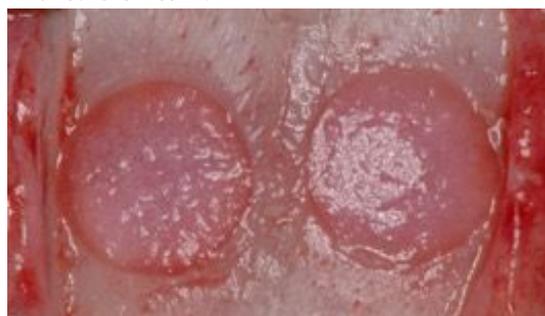
rDFAT, rADSC の両細胞において、BMP-9 と FK-506 共刺激群は単独刺激群と比較して著しく ALP 染色が亢進し、rADSC では ALP 活性においても著しい上昇を認めた。

(3) rDFAT の BMP-9 および FK-506 共刺激下における培養上清中のサイトカインの定量化

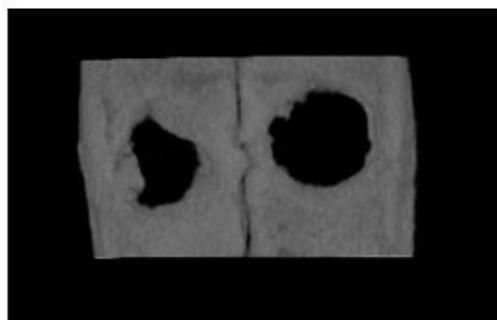


BMP-9 と FK-506 で共刺激した rDFAT 培養上清中における VEGF, HGF, TGF- β 1, IGF-1 の量は他群と比較し著しく増加していることが認められた。

(4) ラット頭蓋骨欠損モデルを用いた BMP-9 と FK-506 共刺激 rDFAT 培養上清の骨形成能の放射線学的観察



BMP-9 + FK506 培養上清 Control 培養上清



術後 8 週における ACS+rDFAT 培養上清 (BMP-9+FK-506 共刺激) のマイクロ CT 像では、ACS+rDFAT 培養上清(無刺激)と比較し、骨欠損部の辺縁から中央部に向けて申請骨の形成が認められた。

(5) まとめ

本研究において、近年組織幹細胞として注目されている DFAT に関して以下の点が示された。

DFAT および ADSC の骨分化刺激因子として BMP-9 と FK-506 の共刺激の有効性が示唆された。

BMP-9 と FK-506 の共刺激 DFAT 培養上清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おいて示唆された。

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 7 件)

(1) 町頭 三保、梅田 誠、野口 和行、中村 利明、白方 良典、中村 梢、迫田 賢二、瀬名 浩太郎、篠原 敬哉、橋口 千琴、田口 洋一郎、歯周基本治療のための新たな教育用モデルの開発、日本歯周病学会会誌、60 巻 (2018) 1 号 p. 44-51、

doi: <https://doi.org/10.2329/periodo.60.44>

査読有り

(2) Nakamura T, Shirakata Y, Shinohara Y, Miron RJ, Hasegawa- Nakamura K, Fujioka-Kobayashi M, Noguchi K.

Comparison of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -9 on bone formation in rat calvarial critical-size defects. Clin Oral Investig. 2017 Dec;21(9):2671-2679. doi:

10.1007/s00784-017-2069-3. 査読有り

(3) Takeuchi Naoshi, Shirakata Yoshinori, Shinohara Yukiya, Sena Kotaro, Noguchi Kazuyuki Periodontal wound healing following reciprocal autologous root transplantation in class III furcation defects J Periodontol. 2017 Dec;47(6):352-362. doi:

10.5051/jpis.2017.47.6.352. 査読有り

(4) Nakamura T, Shirakata Y, Shinohara Y, Miron RJ, Furue K, Noguchi K. Osteogenic potential of recombinant human bone morphogenetic protein-9/absorbable collagen sponge (rhBMP-9/ACS) in rat critical size calvarial defects. Clin Oral Investig. 2017 Jun;21(5):1659-1665. doi:

10.1007/s00784-016-1963-4. 査読有り

(5) Shirakata Y, Miron RJ, Nakamura T, Sena K, Shinohara Y, Horai N, Bosshardt DD, Noguchi K, Sculean A. Effects of EMD liquid (Osteogain) on periodontal healing in class III furcation defects in monkeys. J Clin Periodontol. 2017 Mar;44(3):298-307. doi: 10.1111/jcpe.12663. 査読有り

(6) Shinohara Y, Nakamura T, Shirakata Y, Noguchi K. Bone healing capabilities of recombinant human bone morphogenetic protein-9 (rhBMP-9) with a chitosan or collagen carrier in rat calvarial defects. Dent Mater J. 2016;35(3):454-60. doi: 10.4012/dmj.2015-242. 査読有り

(7) Fuchigami S, Nakamura T, Furue K, Sena K, Shinohara Y, Noguchi K. Recombinant human bone morphogenetic protein-9 potently induces osteogenic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. Eur J Oral Sci. 2016 Apr;124(2):151-7. doi:10.1111/eos.12249. 査読有り

〔学会発表〕(計7件)

- (1) Toshiaki Nakamura, Yoshinori Shirakata, Yukiya Shinohara, RJ Miron, Kozue Hasegawa-Nakamura A comparative study of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -9 on bone formation in rat calvarial critical size defects. Osteology Japan 2017年
- (2) 白方良典, 篠原敬哉, 瀬名浩太郎, 中村利明, 野口和行 サル2壁性骨欠損における新規エナメルマトリックスデリバティブ (Osteogain) による歯周組織再生効果 平成28年度日本歯周病学会九州5大学・日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会 2016年11月
- (3) Y Shirakata, T Nakamura, RJ Miron, Y Shinohara, K Sena, K Noguchi, A Sculean Healing of two-wall intrabony defects following treatment with a novel enamel matrix derivative formulation (Osteogain). A preclinical study in non-human primates. 2nd International Symposium Regeneration and Esthetics in Periodontology and Implant Dentistry 2016年11月
- (4) 白方良典, 瀬名浩太郎, 中村利明, 篠原敬哉, 寶来直人, 野口和行 サル根分岐部病変III度に対するOsteogainと吸収性コラーゲンスポンジを用いた歯周組織再生 第59回秋季日本歯周病学会学術大会 2016年10月
- (5) 町頭三保, 中村利明, 白方良典, 中村梢, 迫田賢二, 瀬名浩太郎, 篠原敬哉, 橋口千琴, 田口洋一郎, 梅田誠, 野口和行 歯周基本治療のための新たな教育用模型の開発 第59回秋季日本歯周病学会学術大会 2016年10月
- (6) Y Shirakata, RJ Miron, T Nakamura, K Sena, Y Shinohara, DD Bosshardt, K Noguchi, A Sculean Regenerative effect of Osteogain in class III furcations The 46th Annual Meeting of the Swiss Society of Periodontology 2016年09月
- (7) 篠原敬哉, 中村利明, 白方良典, 古江きらら, 野口和行 Recombinant human bone morphogenetic protein-9/コラーゲン担体がラット頭蓋骨欠損の骨形成に及ぼす影響 第59回春季日本歯周病学会 2016年05月

〔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〕
なし。

6. 研究組織

- (1) 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
- (2) 研究分担者
なし。
- (3) 連携研究者
なし。
- (4) 研究協力者
なし。