

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11864

研究課題名(和文)顎骨再生における頬脂肪由来脱分化脂肪細胞・PRP複合体のトランスレーショナル研究

研究課題名(英文) Translational study of dedifferentiated fat cells from the buccal fat pad / PRP complex in in mandibular regeneration

研究代表者

窪 寛仁 (Hirohito, Kubo)

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは骨髄由来間葉系幹細胞に代わるドナー細胞として、より低侵襲で多数の細胞を採取できる脂肪由来脱分化脂肪(DFAT)細胞に着目して、これまで研究した。今回、活性化多血小板血漿(aPRP)と組み合わせた細胞増殖率、骨芽細胞分化能、骨再生能力を評価した。aPRPを添加することで増殖率は上昇し、骨芽細胞分化を促進した。また、ラット頭蓋骨骨欠損モデルで骨再生能も上昇した。今回の結果より、DFATsにaPRPを併用することで有効な骨の再生が可能であ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

PRPを成長因子と足場材料として用い、臨床に即したDFATs自家移植モデル(イヌ)においても評価し、臨床応用に向けたトランスレーショナルリサーチを行う点が本研究における独創的な点である。もし、これらの課題を克服し、顎骨組織再生治療が実現すれば、次世代に残された課題と言われる広域顎骨組織欠損治療にむけた新たな基盤技術を提供することが可能となり、患者のQOLを大きく向上させる可能性を持つ。

研究成果の概要(英文)：Bone regeneration using mesenchymal stem cells has several limitations. We investigated adipose-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells as an alternative, and evaluated their cell proliferation rate, osteoblast differentiation, and bone regeneration ability in combination with activated platelet-rich plasma (aPRP). Alizarin red staining was positive 21 days after the start of induction, with significantly higher Runx-related transcription factor 2 (Runx2) and osteocalcin (OCN) expression levels than those in the controls. A 9 mm critical defect was largely closed (60.6%) after four weeks of gelatin sponge implantation with DFAT and aPRP. Therefore, materials combining DFAT cells and aPRP may be an effective approach for bone regeneration. Further research is needed to explore the long-term effects of these materials.

研究分野：再生歯学

キーワード：脂肪由来脱分化脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

欠損補綴、顎顔面補綴においてはインプラントによる形態、機能回復が拡大傾向にある。このような状況の中で治療経過を大きく左右する要素として喪失した骨、軟組織をいかにインプラント治療に適した環境に改善するかという点に着目されており、現在の骨補填材に代わり、今後は細胞を用いた再生医療による安全で確実な骨増生が望まれている。再生医療に用いる再生組織をあらかじめ工業的に大量生産して、必要時にいつでも利用可能にするには、培養系を用いた *in vitro* 組織再生が望ましい。しかし、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 : DFATs) 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。

PRP は自己血液から生成されるため、免疫拒絶などの問題が起こりにくいと考えられている。さらに、PRP は塩化カルシウムとトロンピンを用いることでゲル状に固まる特性をもっていることから幹細胞の足場材料としても有効である。BMSCs と PRP がイヌを用いた動物実験および臨床応用としてインプラントのための歯槽骨再生に有効であることは報告されている。また、最近、ラット頭蓋骨骨欠損モデルにおいて脂肪幹細胞 (ASCs) と PRP の組み合わせが骨再生に対して骨増生的な影響を与えることが明らかとなった。しかし、DFATs と PRP の組み合わせが骨再生に対してどのように影響を与えるかを調べた研究は国内外で見当たらない。

2. 研究の目的

口蓋裂などの先天異常や、炎症、腫瘍あるいは外傷などで顎顔面に骨欠損が生じると、審美的、機能的にも著しい支障をきたす。従来、欠損部への骨再生のためのドナー細胞として骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) が関与する研究が行われてきたが、細胞採取時の侵襲度や採取量に制限が指摘されてきた。そこで、われわれは BMSCs に代わるドナー細胞として、より低侵襲で多数の細胞を採取できる脂肪由来脱分化脂肪 (DFAT) 細胞に着目して、これまで研究した。今回、活性化多血小板血漿 (aPRP) と組み合わせた細胞増殖率、骨芽細胞分化能、骨再生能力を評価した。

3. 研究の方法

F344 系ラット (雄 8 週齢) の鼠径部から脂肪組織を採取してラット DFATs (rDFATs) を作製した。術後 4 週後に同ラットから心臓採血して aPRP を作製し、全血と aPRP との血球数を測定した。次に、aPRP 添加培地 (3%、5%、7%、10% : 各質量%濃度) で rDFATs を培養し、各々を WST-8 で細胞の増殖率を 5 日間測定した。さらに、通常培地 (DMEM+10%FBS、1%PS)、骨芽細胞分化培地 (対照群 ; 以下 ODM : BMP-2、Dexamethasone、-glycerophosphate、L-ascorbic acid+10%FBS、1%PS)、骨芽細胞分化培地 (ODM+10%FBS)+aPRP (実験群 ; 3%、5%、7%、10% : 各質量%濃度) で rDFATs を培養し、誘導開始後 3、7、21 日で real time RT-PCR による骨芽細胞マーカー (Runx2 およびオステオカルシン (OCN)) の遺伝子発現を検索し、さらに 21 日後に Alizarin red 染色で Ca 産生能を評価した (n = 4)。また、動物実験でラット頭蓋骨にトレフィンバーで直径 9 mm の臨界骨欠損モデルを作製し、1) no implant 群 2) ゼラチンスポンジ (GS) 群 3) rDFATs+GS 群 4) rDFATs+aPRP+GS 群 (各 n = 4) を移植し、4 週間後に頭蓋骨の再生能を micro-CT および Hematoxylin-eosin (HE) 染色によって評価した。

4. 研究成果

調製した rDFAT で実施したフローサイトメトリーの結果は、CD90 (+)、CD105 (+)、CD44 (±)、および CD45 (-) であった。間葉系幹細胞の CD マーカーは、CD44、90、105 が陽性、CD45 が陰性の CD マーカーとほぼ同じであった (図 1)。

WST-8 による細胞増殖率は、aPRP を添加することで大幅に増加した。Alizarin red 染色は誘導開始の 21 日後にすべての実験群で陽性であったが、Runx2 と OCN の発現レベルは対照群よりも 7% aPRP 添加条件が最も高かった (図 2、3、4)。

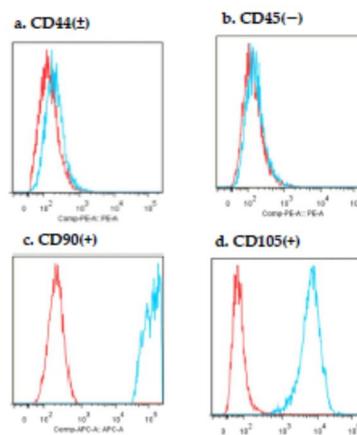


図 1. rDFAT の間葉系幹細胞の CD マーカー発現

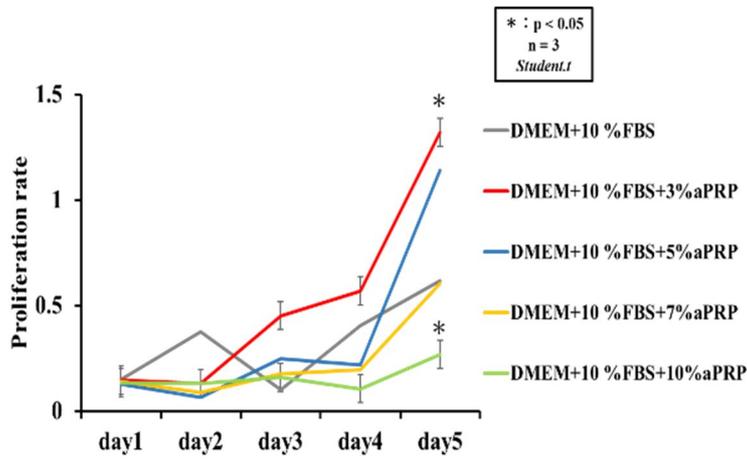


図 2. WST-8 による細胞増殖率

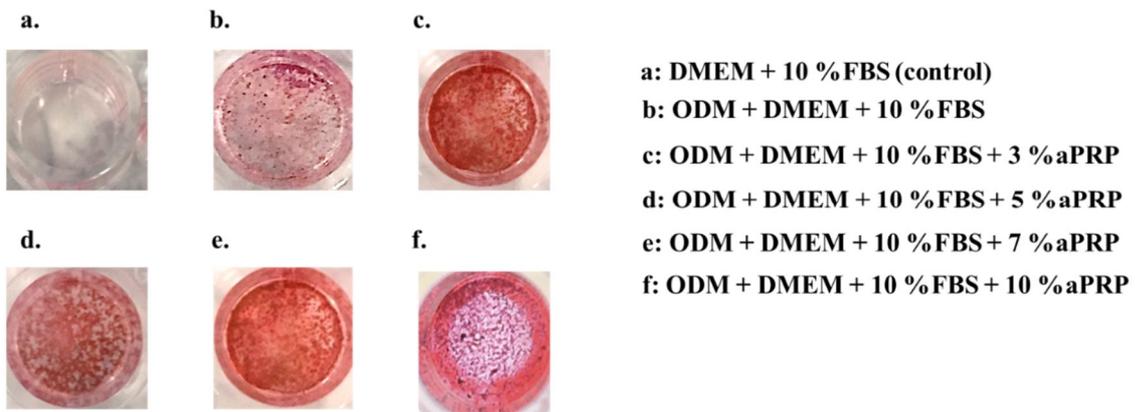


図 3. Alizarin red 染色による骨芽細胞分化

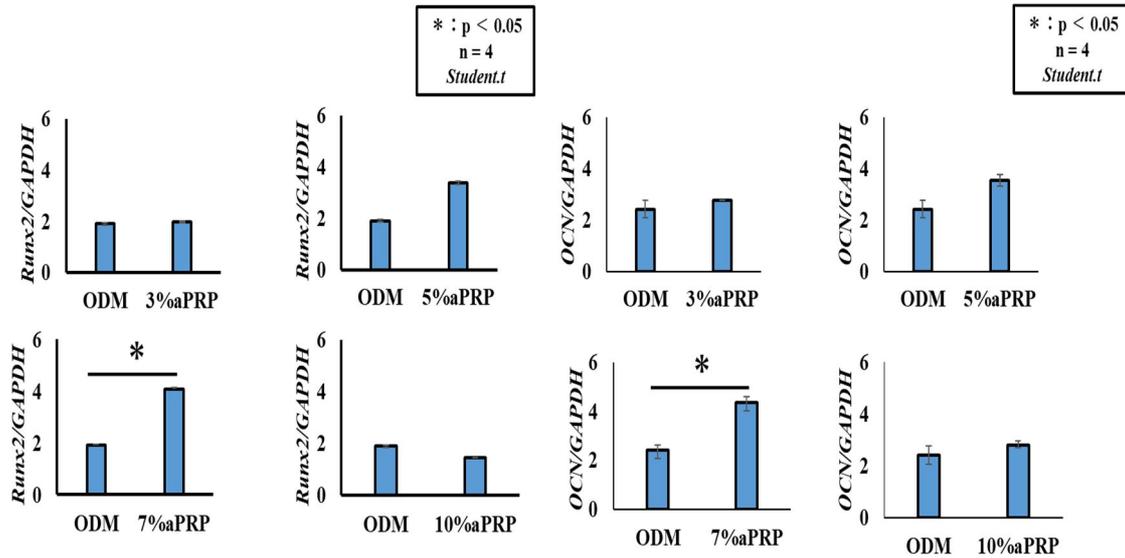


図 4. PRP 濃度の変化による骨芽細胞分化マーカー発現挙動

4 週間後の micro-CT とラックシステムを用いた骨体積および骨密度測定では rDFATs+GS と rDFATs+aPRP+GS とを比較した場合、rDFATs+aPRP+GS は、9 mm の骨欠損はほぼ閉鎖され (BV/TV : 60.6%) 骨体積密度を測定すると 2 群間では有意に高かった。さらに HE 染色の結果から成熟した骨様組織を認めた (図 5、6)。

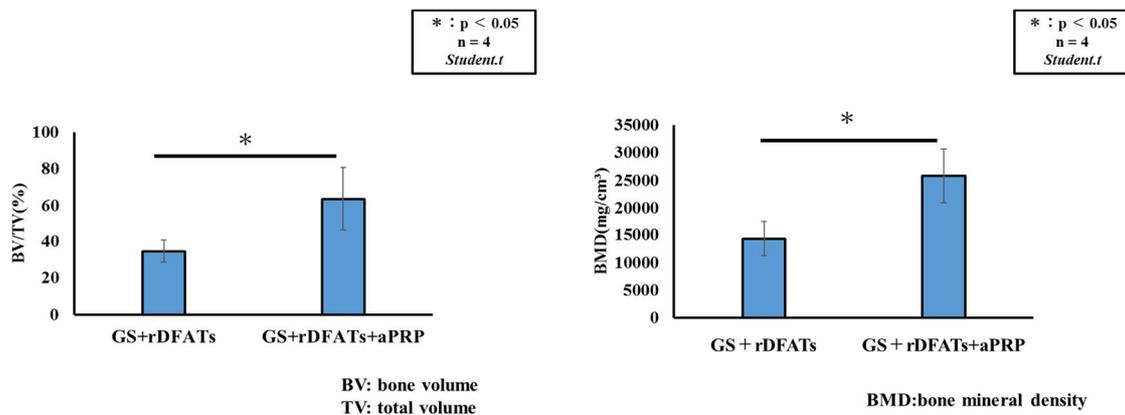


図 5. micro-CT とラトックシステムを用いた骨体積および骨密度測定結果

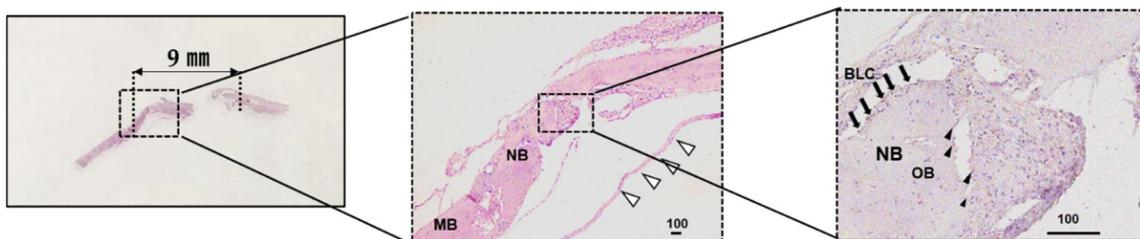


図 6. 病理組織解析による骨再生の観察

今回、DFATs を使用し、細胞増殖率と骨分化および骨形成能の評価をした。aPRP を添加することで増殖率は上昇し、骨芽細胞分化・骨再生を促進した。今回の結果より、DFATs に aPRP を併用することで有効な骨の再生が可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueda, M., Hashimoto, Y., Honda, Y., Baba, S., Morita, S.	4. 巻 52
2. 論文標題 Comparison of the characteristics of mesenchymal stem-like cells derived by integration-free induced pluripotent stem cells in different single-cell culture media under feeder-free conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 147-155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-018-0211-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakano, K., Kubo, H., Nakajima M., Honda Y., Hashimoto, Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Bone Regeneration Using Rat-Derived Dedifferentiated Fat Cells Combined with Activated Platelet-Rich Plasma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 5097 ~ 5097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma13225097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野宏祐, 上田 衛, 窪 寛仁, 疋田光波, 妻野誠仁, 藤井智子, 本橋具和
2. 発表標題 多血小板血漿（PRP）が脱分化脂肪細胞（DFAT）の増殖能と分化能に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野宏祐, 上田 衛, 窪 寛仁, 藤井智子, 本橋具和, 大西祐一, 中嶋正博, 吉本 仁
2. 発表標題 脱分化脂肪細胞（DFAT）と多血小板血漿（PRP）を用いた骨再生
3. 学会等名 第63回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田 衛, 橋本 典也, 本田 義知, 馬場 俊輔, 森田 章介
2. 発表標題 異なるフィーダーフリー条件における皮膚由来iPS 細胞からの間葉系幹細胞様細胞の誘導
3. 学会等名 第15回日本再生歯科医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中野宏祐, 窪 寛仁, 上田 衛, 妻野誠仁, 中嶋正博
2. 発表標題 ラット脱分化脂肪細胞 (DFATs) と多血小板血漿 (PRP) を用いた骨芽細胞分化能と骨再生
3. 学会等名 第65回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 妻野誠仁, 中野宏祐, 本橋具和, 長谷小町, 窪 寛仁, 中嶋正博
2. 発表標題 ビーグル犬脂肪組織からの脱分化脂肪細胞作製の試み
3. 学会等名 第65回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野宏祐, 窪 寛仁, 本田義知, 橋本典也, 中嶋正博
2. 発表標題 ラット脱分化脂肪細胞と多血小板血漿を用いた骨再生
3. 学会等名 第567回 大阪歯科学会例会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	橋本 典也 (Hashimoto Yoshiya) (20228430)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------