

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17158

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞の歯周組織再生への前臨床評価

研究課題名(英文) Pre-clinical examine for periodontal regeneration using dedifferentiated fat cells

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) 2,000,000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、補綴装置の維持安定が困難となり、予後に影響を与える。細胞を応用した再生医療は、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、簡便に均一で高純度な細胞が調製できるため、これまでに申請者らはDFATのラット歯周組織における再生能促進効果を報告してきた。本研究では、大動物歯周炎モデルにおける自家DFAT移植の歯周組織再生能と移植安全性を検討した。その結果、移植部の新生セメント質・歯根膜・骨が認められた。また、移植部位・主要臓器の腫瘍異形成は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国民の8割が罹患しているといわれる歯周病は、細菌感染によって歯と周囲組織の結合が失われ、やがて抜歯に至る。従来は患者と歯科医師、歯科衛生士による口腔清掃の徹底により原因因子を除去することで歯周病の炎症は軽減させることは可能であるが、破壊された歯周組織を復元することは不可能であるため、細胞を利用した歯周組織再生療法の確立は、患者の口腔機能を向上させる上で重要だと考えられる。DFATは他の間葉系幹細胞よりも実用性が高いため、本課題で得られる成果の意義は大きく、歯周病の根治的案治療法の一つになることで歯科医療の発展に大きく寄与するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Serious periodontitis has influence dental treatment because prosthesis appliance becomes unstable by highly ridge absorption. Mesenchymal stem cell-based regenerative medicine explores an ideal cell source because 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. We revealed that DFAT cells facilitate periodontal regeneration in inbred rat fenestration defects. In this study, we investigated whether DFAT cells transplantation improved the regeneration of furcation defects in porcine model as pre-clinical examine. In consequence, newly formed periodontal ligament, cementum and alveolar bone were observed in DAFT cells transplantation group. Furthermore, obvious teratoma was not found in the internal organs.

研究分野：補綴系歯学関連

キーワード：脱分化脂肪細胞 歯周組織再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国は超高齢化社会に突入し、65歳以上の高齢者が総人口に占める割合は4人に1人を超えている。厚生省の統計では65才～69才の平均喪失歯数は7本以上であり、高齢になるにしたがって増加していく傾向にある。また、永久歯を失う原因の多くは歯周病やう蝕であることが報告されており、歯を喪失すると、摂食障害・構音障害・審美的障害が生じ、長期にわたり放置した場合には、残存歯列や歯周組織、顎機能にも障害をもたらす。そのため、失った口腔組織の欠損部を人工材料で補填することで機能の回復を図る治療が従来からおこなわれてきたが、重度の歯周疾患に起因する高度の顎骨吸収は補綴装置の安定性が悪くなるため、機能回復は困難となることが多い。

近年、疾病や外傷によって損傷を受けた器官・組織に対して機能回復を目指す再生医学が飛躍的に発展し、歯科領域においても口腔機能の向上に対してその有用性が着目されている。現在の再生医療では、特に幹細胞や前駆細胞を用いた組織再生や機能回復を目指すことに重点がおかれ、骨髄以外の口腔内組織にも間葉系幹細胞が存在することが明らかとなっている。口腔内には骨髄や歯髄・歯根膜・骨膜などに間葉系幹細胞が存在し、組織再生のための細胞源であることが報告されているが、これらの細胞を実際に利用するには、歯や骨片を含めた骨や骨膜を採取するため、患者の侵襲も大きくなるだけでなく、得られる量も限定される。脂肪組織は腹部のみならず成人の中顔面にも広く存在しており、比較的容易に採取可能な組織であることから再生医療に用いる細胞源として注目されている。

歯科補綴学領域において、重度の歯周疾患は高度顎骨吸収による補綴装置の維持安定が困難となり、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、頬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。申請者は以前脂肪間質由来の多能性幹細胞(ASCs)と乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)との複合体をラット歯周組織欠損領域に移植し、新生骨組織と新生セメント質様硬組織の間にコラーゲン線維が認められたことから歯周組織再生に有用であることを報告した(Akita D et al. Biomed Res. 2014;35(2):91-103.)。しかしながら、ASCsは様々な細胞が混在する細胞集団であり、採取する患者の年齢や基礎疾患によって影響されることが明らかになっている。そのため、純度が高く、幅広い患者に応用可能な治療用細胞が必要であると考えられる。

申請者が所属する日本大学では、脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で体外培養することにより、生じてくる線維芽細胞様の形態をした細胞群が、高い増殖能と多分化能を再獲得することを報告しており、脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cells: DFAT)と名付けている(Matsumoto T et al. J Cell Physiol. 2008;215(1):210-22.)。DFATは成熟脂肪細胞分画から調製されるため、異種細胞の混入がほとんどなく、極めて均一な細胞集団であり、年齢や基礎疾患に関係なく、少量の脂肪組織から大量に調製することが可能である。申請者はこれまでDFAT・PLGA複合体移植によるラット歯周組織再生能を検討し、その結果、硬組織の再生と太い線維束の結合組織に加えて血管様構造物の再生が認められたことも報告している(Akita D et al. Front Physiol. 2016;7:50.)。

また、頬脂肪体にはほかの脂肪組織よりも小径の脂肪細胞が多量に存在し、これらの脂肪細胞から調製したDFATは高い骨芽細胞分化能を持つことを報告している(Tsurumachi N, Akita D et al. Tissue Eng Part C Methods. 2016;22(3):250-9.)

そのため、DFATは歯科医療において有用な細胞源であると考えられる。

2. 研究の目的

日本大学では現在、DFATの臨床応用化をすすめており、細胞バンキング化を見据えて大動物(イヌ・ネコ・ブタ)による前臨床試験を行っているが、歯周組織再生に関する臨床的な見地からの報告はない。

そこで本研究では、マイクロミニブタ(MMP)の下顎第二小臼歯歯根分岐部に規格的な歯周炎モデルを作製し、自家DFAT移植による、歯周組織再生能および生体安全性の検討を行った。

3. 研究の方法

平均27.2月齢(平均体重22.18kg)のMMP(n=5)から1-2gの皮下脂肪組織を採取し、細切、酵素分散処理後に低速度、短時間で遠心分離を行い、フラスコ上部に貯留した成熟脂肪細胞分画を採取して天井培養することでDFAT細胞を調製した(図1)。



図1

下顎左右側第2小白歯部頰側の歯根分岐部に歯周組織欠損（縦5mm×横4mm×深さ3mm）を外科的に作製後に窩洞内をシリコン印象材で填塞し、歯周炎モデルを作製した。4週間後に印象材を除去し、片側に第3継代のDFAT（ 1.5×10^6 cells）/コラーゲン複合体を移植してメンブレン膜で被覆した（DFAT側）。また、対側にはコラーゲンのみを移植し、メンブレン膜で被覆した（Control側）。被覆後は両群ともに縫合して旧位に復し、歯周包帯で創部の安静を図った。移植12週間後に顎骨を摘出し、対象歯を臨床的（プロービングデプス・アタッチメントレベル）、放射線学的、組織学的に評価した（図2・図3）。

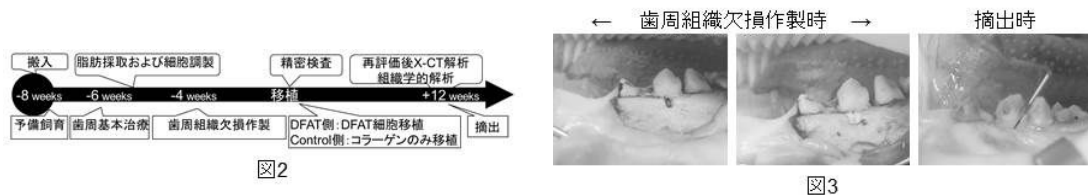


図2

図3

また、同時に移植部位および主要臓器の腫瘍形成の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) 臨床的評価

MMP 歯周炎モデルへの移植実験において、抽出時の第2小白歯頰側ではDFAT側・Control側共に歯周ポケットの改善が認められた。またDFAT側ではアタッチメントレベルの改善も認められた。（図4）。

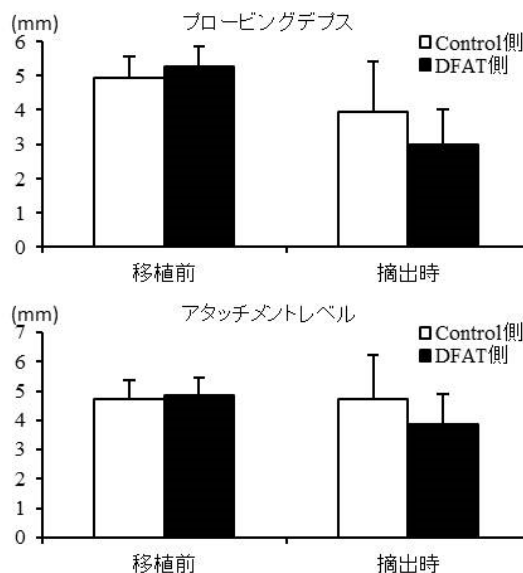


図4

(2) 放射線学的評価

抽出時のX線CT撮影の結果ではControl側では頰側部の骨再生は認められなかった。一方で、DFAT側ではControl側と比較して欠損周囲の限局的な骨再生が認められる（図5）。

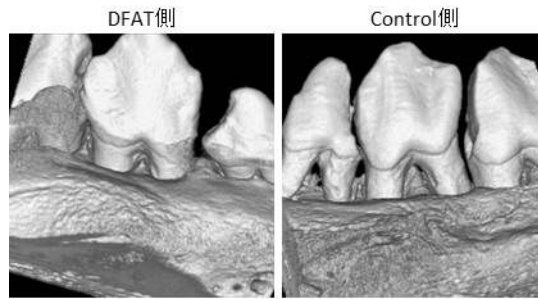


図5

(3) 組織学的評価

Control 側では分岐部内のごく一部にセメント質様組織が認められた。DFAT 側において分岐部内に連続したセメント質・歯槽骨様の硬組織とその間隙にコラーゲン線維の再生が認められた(図6)。

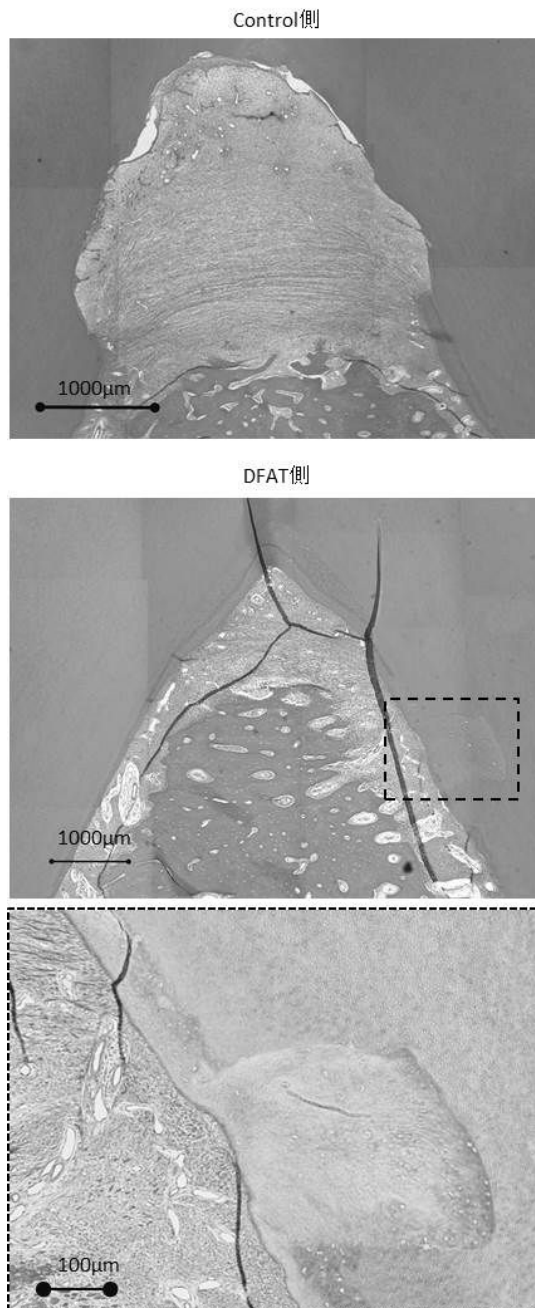


図6

(4) 腫瘍形成能の有無

移植部位および主要臓器に腫瘍形成などの所見は認められなかった(図7)。

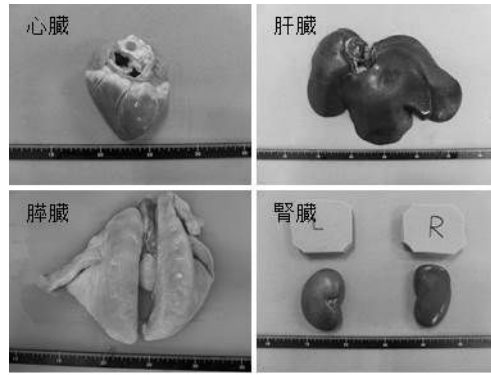


図7

これらの結果から、DFAT/コラーゲン複合体が歯周組織の再生を促進し、生体安全性に優れているため、DFATは歯科口腔領域において有用な細胞源であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okubo T, Tsukimura N, Taniyama T, Ishijima M, Nakhaei K, Rezaei NM, Hirota M, Park W, Akita D, Tateno A, Ishigami T, Ogawa T.	4. 巻 60
2. 論文標題 Ultraviolet treatment restores bioactivity of titanium mesh plate degraded by contact with medical gloves.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Oral Sci	6. 最初と最後の頁 567-573
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.2334/josnusd.17-0443.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 秋田大輔, 伊藤智加, 月村直樹, 松本太郎	4. 巻 71
2. 論文標題 脱分化脂肪細胞の臨床応用化に向けた取り組み.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日歯医師会誌	6. 最初と最後の頁 829-839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tateno A, Asano M, Akita D, Toriumi T, Tsurumachi-Iwasaki N, Kazama T, Arai Y, Matsumoto T, Kano K, Honda M.	4. 巻 61
2. 論文標題 Transplantation of dedifferentiated fat cells combined with a biodegradable type I collagen-recombinant peptide scaffold for critical-size bone defects in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Oral Sci	6. 最初と最後の頁 534-538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 歯周組織再生材料	発明者 本田雅規、秋田大輔、加野浩一郎、松本太郎、他3名	権利者 日本大学、 (株)ジーシー
産業財産権の種類、番号 特許、P6304715	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----