

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792397

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞を用いたハイブリッド型人工神経による末梢神経再生

研究課題名(英文) Peripheral nerve regeneration using an artificial nerve with dedifferentiated fat cells

研究代表者

安東 佳代子(橋本佳代子)(ANDO, Kayoko)

大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)

研究者番号：10388366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ウサギ皮下脂肪を採取し、天井培養法を用いて脱分化脂肪細胞(DFAT cells)を獲得した。DFAT cellsをチタンファイバーメッシュ(TFM)内に播種し、骨分化誘導培地にて14日間培養した。走査型電子顕微鏡による観察にてDFAT cellsはTFM内で増殖し、またTFM周囲に石灰化基質の析出が認められた。DFAT cells/TFM複合体に含まれるオステオカルシン、カルシウム含量は培養開始から14日目において有意に増加した。以上のことからDFAT cellsはTFM内で骨芽細胞へ分化したことが示唆された。DFAT cellsとTFMの組み合わせは骨組織工学における有用な選択肢となる。

研究成果の概要(英文)：We isolated dedifferentiated fat (DFAT) cells using the ceiling culture method from rabbit subcutaneous fat. DFAT cells were seeded into titanium fiber mesh (TFM) and cultured in an osteogenic medium for 14 days. In scanning electron microscopic analysis, the number of DFAT cells increased, and a calcified matrix was observed around the fibers of TFM. The osteocalcin and calcium content in the TFM were significantly higher on day 14 compared to other time points. It was suggested that DFAT cells differentiated into osteoblasts in TFM. The combination of DFAT cells and TFM may be a useful option for bone tissue engineering.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：脱分化脂肪細胞 チタンファイバーメッシュ 骨組織工学 天井培養

1. 研究開始当初の背景

神経の自家移植は末梢神経損傷 (PNI) の修復に対する gold standard になっているが、この方法は提供者の神経機能低下、供給量の制限など深刻な問題点を有している。そこで近年、脂肪由来幹細胞や骨髄幹細胞などの幹細胞と人工材料の組み合わせによる人工神経管を用いた方法が自家移植の代替法として注目されている (Tse KH et al. J Biomed Mater Res A. 2010.)。

脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells: DFAT cells) はすべての年齢層から少ない侵襲で採取でき、非常に純度の高い細胞集団である。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。Ohta ら (Ohta Y et al. Cell Transplant. 2008.) は DFAT cells が分化誘導を施さなくとも神経系マーカーを発現していることを明らかにした。さらに、ラット脊髄損傷モデルに DFAT cells を移植し、後肢の運動機能が回復したことから中枢神経系における DFAT cells 移植の有用性を報告している。しかし、末梢神経系に対する効果は解明されていない。

2. 研究の目的

当初は末梢神経再生における DFAT cells の有用性を検討しようと考えていたが、様々な組織の細胞に分化可能な DFAT cells の骨組織再生における可能性を検討することとした。チタンファイバーメッシュをスキャフォールドとして DFAT cells の骨組織工学における有用性を評価することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ウサギ DFAT cells の樹立: ウサギ皮下脂

肪 (約 1 g) を採取し、細切後、コラゲナーゼ溶液中で 37℃ 振盪下で 1 時間処理する。得られた成熟脂肪細胞を通常培地 (DMEM + 20%FBS) で完全に満たされた 25 cm² フラスコに播種し、脂肪滴を含む浮遊した脂肪細胞がフラスコ内側の天井表面に接着するようフラスコの接着面を上方にして、37℃、5%CO₂ の環境下で培養する (天井培養法、図 1)。7 日後、培地を除去し、細胞がフラスコ底面に位置するようにフラスコを反対にし、通常培養を開始する。上記のプロセスを経て獲得された細胞が DFAT cells である。

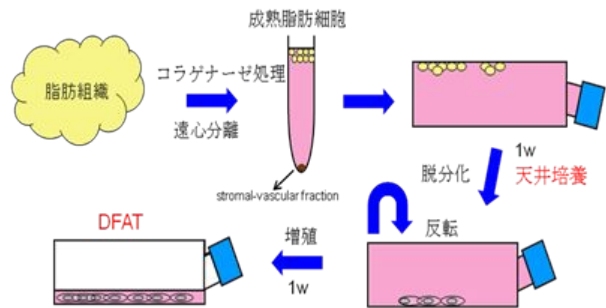


図 1: DFAT cells の樹立 (天井培養法)

in vitro における骨芽細胞分化能の評価: 獲得した DFAT cells をチタンファイバーメッシュ (TFM, 図 2) に播種し、骨分化誘導培地 (DMEM + 10%FBS, デキサメタゾン, β-グリセロリン酸, L-アスコルビン酸 2-リン酸) 中で 14 日間培養する。

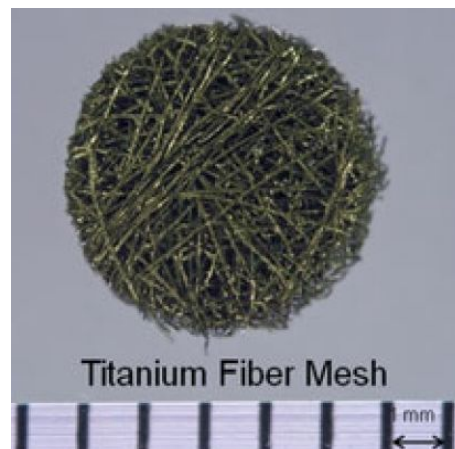


図 2: チタンファイバーメッシュ (Cytotechnology. 2013; 65: 15-22.)

細胞増殖能の評価として DNA の定量を行い、骨芽細胞分化の評価としてオステオカルシン (OCN)、カルシウムの定量を行う。また DFAT cells/TFM 複合体内部の観察を走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて行った。

4. 研究成果

ウサギ DFAT cells/TFM 複合体に含まれる DNA 量は培養開始から 7 日目において有意に増加した。また骨芽細胞分化マーカーである OCN、カルシウムは培養開始から 14 日目において他の時期と比較して有意にその発現量が増加した。SEM による解析では DFAT cells は TFM 中のチタン繊維に接着し、増殖する様子が確認された。さらに増殖した DFAT cells はその周囲に石灰化基質を析出することが明らかとなった (図 3)。

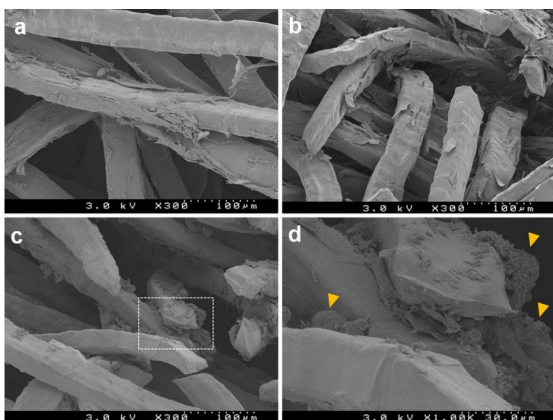


図 3 : TFM 中の DFAT cells

黄色矢頭 : 石灰化基質

(Cytotechnology. 2013; 65: 15-22.)

以上の結果からウサギ DFAT cells は TFM 内で接着、増殖し、骨芽細胞へ分化した結果、カルシウムの沈着を伴う石灰化基質を析出したことが示唆された。

DFAT cells は脂肪の浮力を利用した天井培養法にて獲得されるため非常に純度が高い細胞集団であり、移植における安全性が高いと考えられている。また今回使用した TFM

は生体親和性が高く、また強度も高い生体材料であり骨組織工学におけるスキャフォールドとして有用である。上記の様な優れた特徴を有する DFAT cells と TFM を組み合わせ、複合体における骨芽細胞分化能を検討した本研究は骨組織工学における一つの選択肢を提供することとなり、その意義は大きいと考える。今後は *in vivo* における DFAT cells と TFM の有用性を検討していきたい。

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 2 件)

Kishimoto N, Momota Y, Hashimoto Y, Tatsumi S, Ando K, Omasa T, Kotani J. The osteoblastic differentiation ability of human dedifferentiated fat cells is higher than that of adipose stem cells from the buccal fat pad. Clin Oral Investig. 2013. In Press. 査読有
DOI: 10.1007/s00784-013-1166-1

Kishimoto N, Momota Y, Hashimoto Y, Ando K, Omasa T, Kotani J. Dedifferentiated fat cells differentiate into osteoblasts in titanium fiber mesh. Cytotechnology. 2013; 65: 15-22. 査読有
DOI: 10.1007/s10616-012-9456-z

[学会発表](計 5 件)

岸本 直隆, 百田 義弘, 橋本 典也, 安東 佳代子, 大政 健史, 小谷 順一郎, ヒト類脂肪体由来脱分化脂肪細胞と脂肪幹細胞の細胞表面抗原解析, 第 11 回日本再生歯科医学会学術大会, 平成 25 年 8 月 31 日, 東京

岸本 直隆, 百田 義弘, 橋本 典也, 安

東 佳代子, 大政 健史, 小谷 順一郎,
Comparison of Osteoblastic Differentiation
Abilities in Dedifferentiated-Fat-Cells with
Adipose-Stem-Cells , The 91st
International Association for Dental
Research General Session & Exhibition , 平
成 25 年 3 月 23 日 , Seattle , Washington,
USA

岸本 直隆, 百田 義弘, 橋本 典也, 安
東 佳代子, 大政 健史, 小谷 順一郎, 脱
分化脂肪細胞を用いた顎骨再生におけるト
ランスレーショナル研究, 第 29 回「歯科医
学を中心とした総合的な研究を推進する集
い」, 平成 25 年 1 月 12 日, 東京

岸本 直隆, 百田 義弘, 橋本 典也, 安
東 佳代子, 大政 健史, 小谷 順一郎,
Osteoblastic Differentiation Ability is
higher in Human Dedifferentiated Fat
Cells than in Adipose Stem Cells ,
YABEC2012 , 平成 24 年 10 月 27 日 , 徳島

岸本 直隆, 百田 義弘, 橋本 典也, 安
東 佳代子, 坂本 章人, 大政 健史, 小谷
順一郎, ヒト脱分化脂肪細胞は脂肪幹細胞よ
り骨芽細胞分化能が高い, 第 10 回日本再生
歯科医学会学術大会, 平成 24 年 9 月 2 日,
神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安東 佳代子 (ANDO, Kayoko)
大阪歯科大学・歯学部・講師 (非常勤)