

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463101

研究課題名(和文)成熟脂肪細胞由来脱分化脂肪細胞(DFAT)の低出力レーザー刺激による分化誘導

研究課題名(英文)The effect of low-power laser irradiation on DFAT differentiation

研究代表者

清水 典佳 (SHIMIZU, Noriyoshi)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：40154299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DFAT単離効率の条件設定を行ったところ、頬脂肪体由来の40μm未満の成熟脂肪細胞画分からDFAT細胞を調整することにより骨芽細胞分化能の高い細胞が得られること、また40μm未満の成熟脂肪細胞は従来の採取方法と比較し低濃度の0.02%コラゲナーゼ処理により、より効率的に採取できることを明らかにした。またin vivoにおけるDFATの骨形成促進作用についての検討では、ラット上顎正中口蓋縫合部の急速拡大時後に縫合部へDFATを注入移植し縫合部骨形成量をマイクロCTにより定量的に検討したところ、対照群と比較し有意差はなかった。

研究成果の概要(英文)：As a result of setting conditions for isolating a large number of DFATs, it was found to be optimal to prepare DFAT from mature adipocyte fraction of less than 40 μm diameter, and to treat with 0.02% collagenase for adipose tissue separation. In the transplantation experiment of DFAT injection into the rapid expansion site of rat maxillary mid-palatal suture using micro-CT images, there was a tendency to promote osteogenesis in the sutured area after DFAT injection compared with the control group, but there was no significant difference.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：DFAT 骨形成促進作用 急速拡大 上顎正中口蓋縫合

1. 研究開始当初の背景

近年、哺乳類の成熟脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を、天井培養法で培養することで生じる線維芽細胞様の細胞群が高い増殖能と分化能を獲得していることが報告され、脱分化脂肪細胞 (以下、DFAT) と命名された。この細胞を、各種の分化誘導培地で培養すると、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞に分化することが報告され (J Cell Physiol 215, 2008) さらに、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、心筋細胞へ分化することも報告されている (J Mol Cell Cardiol 47, 2009)。

2. 研究の目的

本研究では、1) in vitro にて DFAT の効率的な採取と骨芽細胞分化への至適条件設定について 2) in vivo にて DFAT 移植による骨形成促進作用について検討することを目的とした。

(1) DFAT 細胞単離の条件設定

従来、成熟脂肪細胞の大きさは約 60~100 μ m と示されていたが、近年、40 μ m 未満の大きさの脂肪細胞の存在も確認された。しかしながら、成熟脂肪細胞の大きさと脱分化脂肪細胞への脱分化について検討した報告はこれまでにない。そこで、脂肪細胞の大きさと得られる DFAT の特性、また酵素処理時のコラゲナーゼ溶液の至適濃度について検討し、より確実に分化能の高い細胞を得るための条件を検討することを目的とした。

(2) ラットを用いた DFAT 移植による骨形成促進作用の検討

DFAT は高い増殖能と分化能を有することが報告されており、再生医療への応用が期待される。歯科矯正治療や外科的矯正治療では、顎骨や歯槽骨の再生や形成誘導を伴う治療が多く、この骨形成過程を促進することにより治療期間の短縮や後戻り防止に大きく貢献できると考えられる。そこで、in vivo ではラット正中口蓋縫合急速拡大モデルを用いて、縫合部に DFAT を移植し、骨形成の促進作用について micro CT を用いて定量的に評価検討することとした。

3. 研究の方法

(1) DFAT 細胞単離の条件設定

成熟脂肪細胞の選択条件設定

健全な男女 5 名からヒト類脂肪体を摘出し (倫理委員会許可番号 2008-8) を 0.1% コラゲナーゼ溶液で酵素処理後、遠沈管上部に浮遊した細胞画分を回収後、セルストレーナーにて 40 μ m 未満と 40~100 μ m の大きさの細胞画分に分取し、両大きさに分取した細胞画分ごとに天井培養を行った (図 1)。また、各大きさの分画から出現した脱分化脂肪細胞をそれぞれ S-DFAT 細胞、L-DFAT 細胞とし、それらの特性を解析するために遺伝子発現、細胞表面抗原、細胞増殖能、骨芽細胞および

脂肪細胞への分化能について検討した。

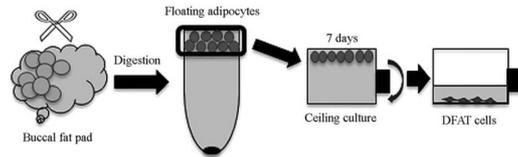


図 1

酵素処理条件の設定

ヒト類脂肪体由来の 40 μ m 未満の成熟脂肪細胞画分から DFAT 細胞を調整するための至適コラゲナーゼ濃度条件について検討を行った。健康な男女 10 名からヒト類脂肪体を摘出し (倫理委員会許可番号 2008-8) 0.01%、0.02%、0.1%、0.5% コラゲナーゼ溶液に分けて酵素処理後、遠沈管上部に浮遊した脂肪細胞数と直径を測定した。さらに単離された成熟脂肪細胞を天井培養し、DFAT 細胞を調整し 3 日後に継代した際の細胞数を測定した。さらに 0.1% と 0.02% で酵素処理して調整した DFAT 細胞の遺伝子発現、細胞表面抗原、細胞周期、骨芽細胞及び脂肪細胞への分化能について検討し、特性を比較した。

(2) ラットを用いた DFAT 移植による骨形成能の検討

DFAT 採取

8 週齢 F344/Jcl Fisher 系雄性ラットの鼠頸部の脂肪細胞 1.0g を採取、細切し 0.02% コラゲナーゼ処理後低速で遠心沈殿させ上澄を採取し、20% FBS を添加した培養液を満たしたフラスコ内で天井培養した。1 週間後フラスコを反転させ培地を交換し、継代培養を行い DFAT を得た。

DFAT 移植

8 週齢同系雄性ラットの上顎切歯間に 1.5mm 厚の金属リングを圧入し、上顎正中口蓋縫合を急速拡大し、DFAT (1 x 10⁴ 個) を Pura Matrix (Corning) ゲル 0.1ml に混和し、口蓋縫合部粘膜下 (切歯口蓋側から 5 mm 後方) に G29 注射針を用いて注入移植した。拡大前と拡大後から 1 週おきに 4 週間 micro CT (リガク社) で口蓋縫合部を撮影し、対照群 (無処置)、拡大群 (拡大 + Pura Matrix)、拡大 + DFAT 移植群に分け、骨形成量を比較検討した。

micro CT による分析

ラット口蓋縫合部の処置前後における骨体積の変化を検討するため、micro CT 撮影像の口蓋縫合部分分析領域は、過去の我々の論文 (Arch Oral Biol, 59, 2014) に従い、上顎正中口蓋縫合を含み、上顎切歯の口蓋側歯槽骨辺縁と口蓋骨面を境とした直方体とした。直方体の領域の大きさは、縫合部のみの検討を行えるよう、鼻中隔等を含まない設定とした (0.90 x 0.30 x 0.30 mm)。骨変化量は拡大前の micro CT 画像とその後撮影した画像の同一領域の骨体積を差分法により算出した。

4. 研究成果

(1) DFAT 分離と分化能の検討

成熟脂肪細胞の選択条件設定

-ア 成熟脂肪細胞の大きさの測定

単離した成熟脂肪細胞分画の大きさを Coulter Counter を用いて測定を行った結果、40 μ m 未満の大きさの細胞分画が他の大きさの分画に比較して有意に多かった (図 2)。

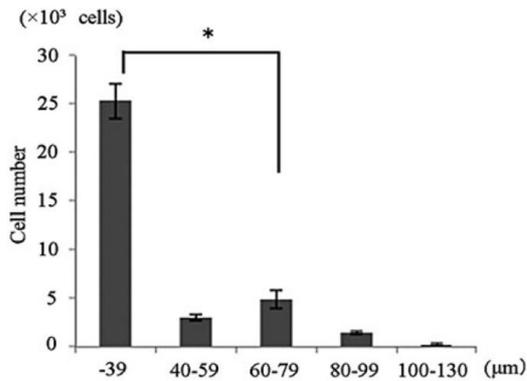


図 2

-イ Adipored/Hoechst 染色

40 μ m 未満の細胞分画を Adipored/Hoechst 染色を行った結果 (図 3A、B) 全て Adipored 陽性を示し、脂肪細胞以外の細胞が含まれていないことを確認した (図 3C)。

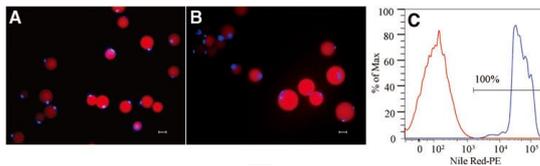


図 3

-ウ DFAT 脂肪細胞への脱分化過程

単離した成熟脂肪細胞分画の天井培養を行い、天井培養 2 日目、4 日目、7 日目 (図 4 A、B、C) と経日的に線維芽細胞様の形態を示す細胞が出現した。

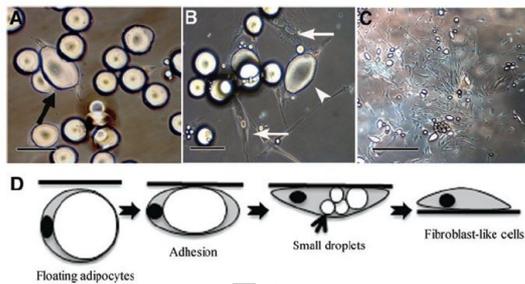


図 4

-エ S-DFAT 細胞および L-DFAT 細胞の細胞特性の比較検討

S-DFAT 細胞および L-DFAT 細胞の細胞特性を遺伝子発現、細胞増殖能、骨芽細胞および脂肪細胞への分化能について検討した結果、遺伝子発現 (図 5) コロニー形成能 (図 6A、B) および細胞増殖能 (図 6C) に関しては両細胞間でその特性に優位な差は認められなかった。

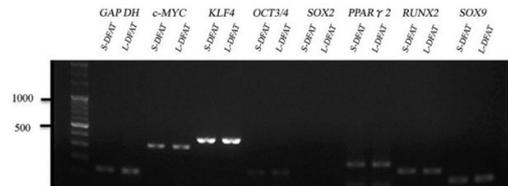


図 5

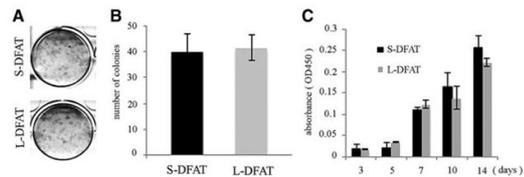


図 6

また、SDFAT 細胞は骨芽細胞誘導において誘導 3 および 5 日目に L-DFAT 細胞に比較して、有意に高いアルカリフォスファターゼ活性を示し (図 7A) 7 および 21 日目において有意に多いカルシウム沈着量を認めた (図 7B、C)。

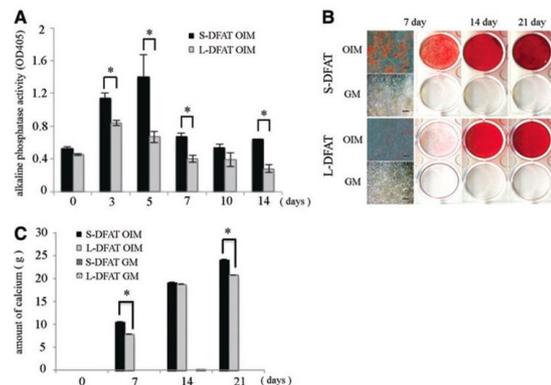


図 7

脂肪細胞誘導において、両細胞間に有意な差は認められなかった (図 8A、B)。

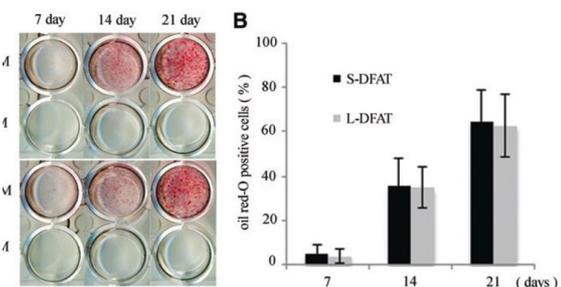


図 8

酵素処理の条件設定

-ア 成熟脂肪細胞および天井培養後に出現した線維芽細胞の観察

0.02% および 0.1% のコラゲナーゼ濃度で酵素処理後に単離した細胞分画は共に Adipored 染色陽性を示した。また、それぞれの成熟脂肪細胞は天井培養 7 日目に共に線維芽細胞様の形態を示す細胞が出現した (図 9)。

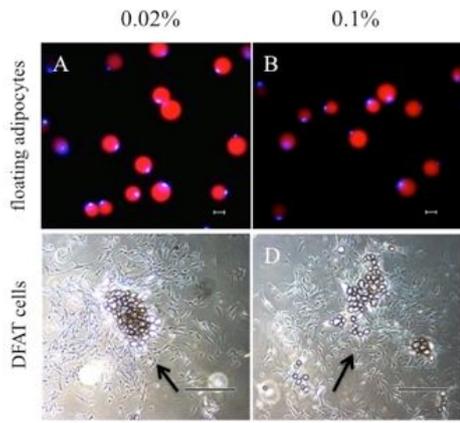


図 9

-イ 酵素処理濃度による獲得した成熟脂肪細胞数の比較
0.02%のコラゲナーゼ濃度で酵素処理したグループが他のグループと比較して2.5倍以上の脂肪細胞数が計測され(図 10 A) その多くは直径 30 μ m 以下であった(図 10 B)。

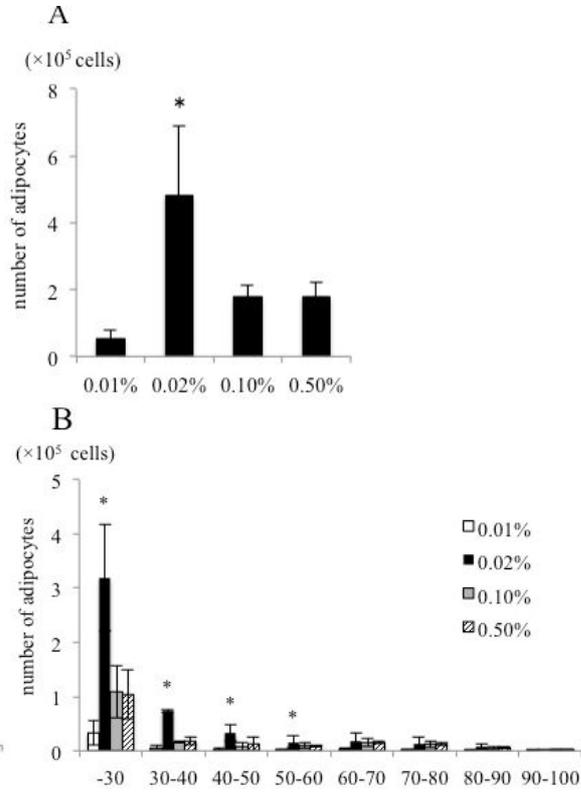


図 10

-ウ 酵素処理濃度による獲得した DFAT 細胞数の比較
第一継代の DFAT 細胞数は 0.02% で酵素処理したグループが最も多かった(図 11)。

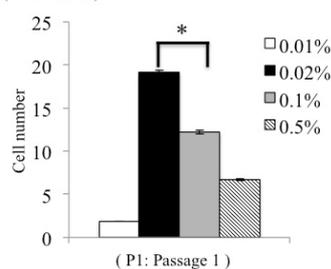


図 11

-エ 酵素処理濃度による細胞特性への影響の検討

0.1 および 0.02%のコラゲナーゼ濃度にて酵素処理し獲得した DFAT 細胞の特性は遺伝子発現(図 12)、細胞増殖能、コロニー形成能について有意差は認めなかった(図 13)。

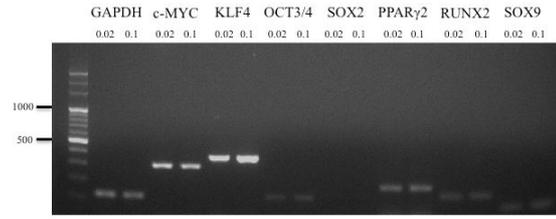


図 12

Fig.6

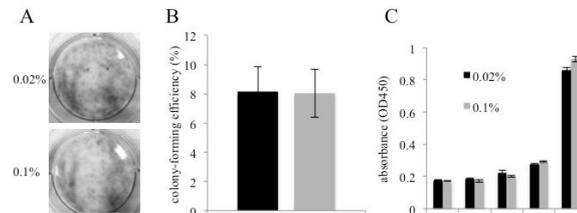


図 13

骨芽細胞誘導において、アルカリホスファターゼ活性は 0.02%で調整したグループが誘導 3 日目に有意に高く(図 14 A)、誘導 14 日目および 21 日目のカルシウム沈着量も有意に高い値を示した(図 14 B、C)。

Fig.7

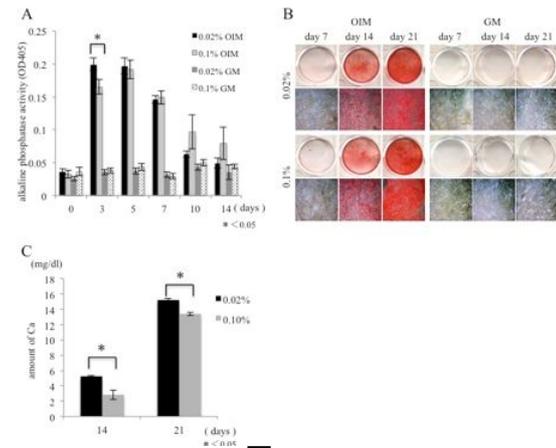


図 14

脂肪細胞誘導において、両細胞間に有意な差は認められなかった(図 15)。

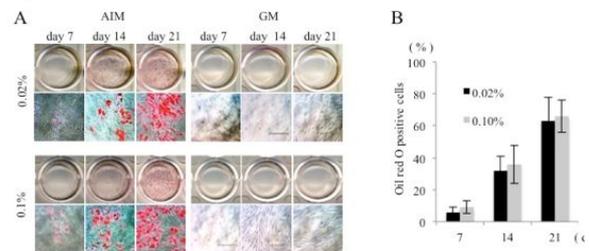


図 15

本研究より、0.02%のコラゲナーゼ濃度で酵素処理したグループが小さな成熟脂肪細胞を多く獲得できるだけでなく、0.1%で調整し

た DFAT 細胞と差異がなかったことから、至適酵素濃度は 0.02% であることが示唆された。一連の結果から DFAT 細胞を口腔領域に臨床応用する際の具体的な酵素処理条件が確立された。

(2) ラットを用いた DFAT 移植による骨形成促進作用の検討

予備実験において、拡大群、拡大+DFAT 群、拡大+DFAT+半導体レーザー (20J) 照射群を比較したところ、拡大+DFAT 群で骨形成促進傾向があったが、拡大+DFAT+拡大時半導体レーザー 1 回 (20J) 照射群では、3、4 週で骨形成作用が拡大群に比べ低下していた。そのため、適切なレーザー照射条件を決定するまで、レーザー照射群を削除した。

本実験において、拡大前の micro CT 画像とその後撮影した画像の同一領域の骨体積を差分法により解析した。典型的な画像を図 16 に示した。

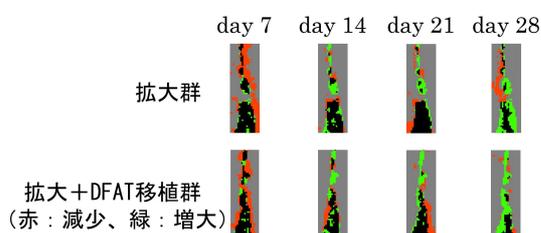


図 16

拡大群、DFAT 移植群の両群を比較したところ、両群とも 1 週間後に骨体積減少量が最大となり、その後拡大された縫合部が閉鎖されていた。拡大群では約 1 週間後に骨体積は -0.190 mm^3 に減少し、その後骨が増加し 2 週でほぼ 0 に回復し、その後 3 週から 4 週において変化はなかった。拡大+DFAT 移植群では、骨体積は 1 週で -0.091 mm^3 に減少し、2 週で $+0.062 \text{ mm}^3$ 、3 週で $+0.061 \text{ mm}^3$ 、4 週で $+0.081 \text{ mm}^3$ に軽度に増大した。両群共に 1 週から 2 週へは有意に骨体積が増加していた (t 検定、 $p < 0.05$)。また実験中同日における拡大群と拡大+DFAT 移植群の骨増加量を比較すると、拡大+DFAT 移植群では骨形成促進傾向があるものの有意差はみられなかった (図 17)。

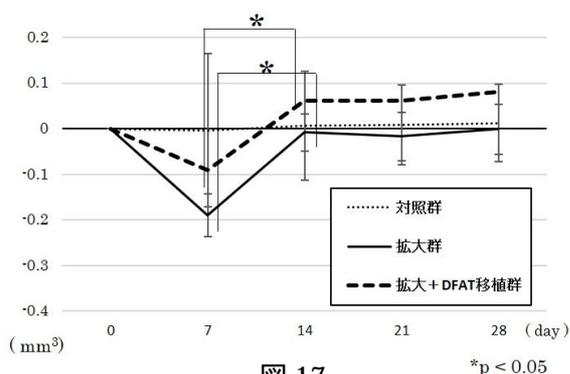


図 17

今後は、移植する DFAT 数の違いや、異なった骨芽細胞分化程度の DFAT 移植による骨形成促進作用を検討する予定である。また、green fluorescent protein 発現遺伝子を導入した DFAT を移植し、縫合部 GFP ポジティブ細胞を定量することで移植の効果を一層詳細に評価できると考えている。

< 引用文献 >

Takenouchi H, Mayahara K, Arai Y, Karasawa Y, Shimizu N, Longitudinal quantitative evaluation of the mid-palatal suture after rapid expansion using in vivo micro-CT. Arch Oral Biol. 59, 2014, 414-423

Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama S, Kano K, Kusumi Y, Masuko T, Mitsumata M, Saito S, Hirayama A, Mugishima H, Fukuda N. Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. J Mol Cell Cardiol 47, 2009, 565-75

Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H, Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells Exhibit Multilineage Potential. J Cell Physiol, 215, 2008, 210-222

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)

Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Tonogi M, Shimizu N & Honda M. Effect of collagenase concentration to isolate small adipocytes from human buccal fat pad. J Oral Sci (in press, 2017) 査読有り
Tsurumachi N, Akita D, Kano K, Matsumoto T, Toriumi T, Kazama T, Oki Y, Tamura Y, Tonogi M, Isokawa K, Shimizu N, Honda M. Small Buccal Fat Pad Cells Have High Osteogenic Differentiation Potential. Tissue Eng Part C Methods 22(3), 2015, 250-259 査読有り

[学会発表](計 4 件)

鶴町仁奈, 秋田大輔, 松本太郎, 加野浩一郎, 外木守雄, 鳥海拓, 河野英輔, 磯川桂太郎, 清水典佳, 本田雅規. ヒト頬脂肪体から脱分化脂肪細胞を獲得する酵素処理条件の検討. 第 14 回日本

再生医療学会総会 パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2015. 3. 19.

Tsurumachi N, Akita D, Matsumoto T, Kano K, Tonoki M, Toriumi T, Kawano E, isokawa K, Shimizu N, Honda M. Dedifferentiated fat cells isolated from the human buccal fat pad. General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, Boston (USA) 2015. 3. 12

鶴町仁奈，秋田大輔，松本太郎，加野浩一郎，外木守雄，鳥海拓，磯川桂太郎，清水典佳，本田雅規. ヒト頬脂肪体からの脱分化脂肪細胞調整時の酵素濃度至適化について. 第3回日本大学幹細胞フォーラム 日本学会館（東京都千代田区）2015. 1. 13

鶴町仁奈，秋田大輔，松本太郎，加野浩一郎，外木守雄，齋藤瑛子，秋山祐子，鳥海拓，磯川桂太郎，清水典佳，本田雅規. ヒト頬脂肪体の成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞. 第35回日本炎症・再生医学会 万国津梁館（沖縄県名護市）2014. 7. 2

(4)研究協力者

鶴町 仁奈 (TSURUMACHI, Niina)

坂口 真人 (SAKAGUCHI, Masahito)

〔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 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 典佳 (SHIMIZU, Noriyoshi)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：40154299

(2)研究分担者

馬谷原 琴枝 (MAYAHARA, Kotoe)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号：60440046

(3)連携研究者

なし