

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792147

研究課題名(和文) ヒト成熟脂肪細胞由来脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いた歯周組織再生に関する研究

研究課題名(英文) The study of periodontal regeneration by using de-differentiated fat cells

研究代表者

吉元 剛彦 (Yoshimoto, Takehiko)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60419653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：脱分化脂肪細胞(DFAT)は成熟脂肪細胞から生じる多分化能を有する細胞群である。本研究の目的は歯周組織欠損の特に骨再生に対する応用に向けた基礎的研究として、ラットより分離・培養したrat DFAT (rDFAT)を用い、その骨形性能について評価することであった。まず、rDFATの脂肪滴・石灰化物形成を確認後、ラット頭蓋骨欠損モデルにおいてrDFATの骨形性能を評価したところコントロールおよび担体のみの群では骨のブリッジングを認めなかった。一方、rDFAT+担体群では新生骨によるブリッジング1個体にのみが認められ、骨分化刺激rDFAT+担体群では4個体において新生骨のブリッジングが認められた。

研究成果の概要(英文)：Dedifferentiated fat (DFAT) cells, which are isolated from mature adipocytes using the ceiling culture method, exhibit similar characteristics to mesenchymal stem cells. The aim of the present study was to evaluate the ability of bone regeneration by using rat DFAT (rDFAT) cells for the basic research of periodontal regenerative therapy. First, mineralization and lipid formation were observed in rDFATs cultured in the each differentiation medium. Next, the bone forming ability of rDFAT was evaluated by using rat calvarial critical size defect model. The defects were treated by one of the following procedures: scaffold+osteo-differentiated rDFATs (1); scaffold+rDFATs (2); scaffold (3); no implantation (4). The animals were euthanized at 6 weeks after the surgery for histological evaluation. Complete closure of bone defect was not observed in the experimental groups of (3) and (4), but observed in the 1 specimen of group (2) and 4 specimens of group (4).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：DFAT

1. 研究開始当初の背景

成熟脂肪細胞由来脱分化脂肪細胞(DFAT)とは、成熟脂肪組織をコラゲナーゼ処理し、フィルトレーション後低速遠心した後、浮遊している層を採取し天井培養という方法を用い培養し脱分化した細胞のことであり、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、心筋細胞に分化可能であることがすでに報告されている。(Matsumoto T et al. *J Cell Physiol*, 2008, JumabayMet. al. *J Mol Cell Cardiol*. 2009) DFAT は CD13,CD29,CD34,CD44,CD90 等の未分化間葉系幹細胞マーカーを発現し、その発現はパッセ - ジ 30 まで認められることが報告されている。(Jie-fei S et. al. *Int J Oral Sci* 2011)。本研究で用いる DFAT は前述のように成熟脂肪組織をコラゲナーゼで処理し天井培養によって脱分化させたものであるため得られる未分化な細胞の純度が骨髄由来幹細胞、脂肪由来幹細胞と比較して高いこと、脂肪由来であるため、骨髄由来の幹細胞と比較し細胞採取の際に低侵襲であることも特徴である。歯周疾患によって破壊される組織は主に歯槽骨、セメント質、歯根膜である。現在臨床応用されている歯周組織再生療法にはエナメルマトリックスデリバティブ(EMD) 組織再生誘導法(GTR)があり、EMD については動物製剤であること、GTR では手技の困難さ、組織再生量に限度があることなどの問題がある。また、近年、成長因子等を用いた歯周組織再生療法の海外における臨床応用(GEM21S)や本邦においてはbFGF、欧州においてはGDF-5の臨床治験が行われており、良好な成績が報告されているが、上述した既存の歯周組織再生療法の適応症を大きく拡大するまでには至っていない。そのため、細胞移植を用いた歯周組織再生療法は、新たなブレークスルーをもたらす新規治療法として期待されている。本研究において用いるDFATは、多分化能を持ち、細胞採取において骨髄由来幹細胞と比較して低侵襲である。また、IPS細胞と比較して、遺伝子導入の必要がない点や、患者自身の脂肪組織から分離する点で安全性が高く簡便であり、拒絶反応等も回避できると思われる。

2. 研究の目的

脱分化脂肪細胞(DFAT)は成熟脂肪細胞から生じる多分化能を有する細胞群である。本研究の目的は歯周組織欠損の特に骨再生に対する応用に向けた基礎的研究として、ラットより分離・培養した rat DFAT (rDFAT)を用い、その骨形性能について評価することであった。

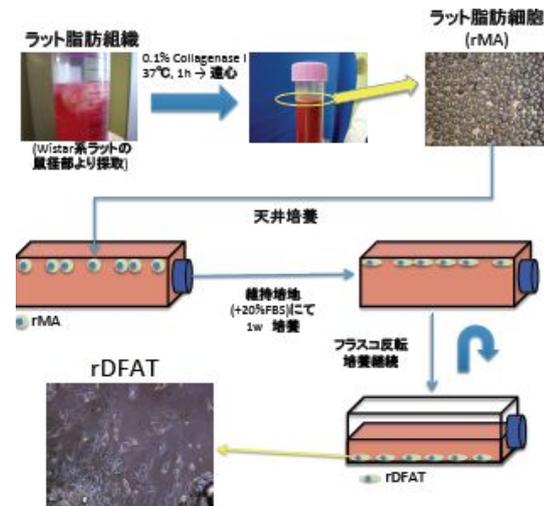
3. 研究の方法

(1)rDFATの分離培養

Wister系ラットの鼠径部より採取した脂肪を酵素処理し、脂肪細胞を採取後、天井

培養にて培養した rDFAT を実験に用いた。(Jumabay et al. 2009) (図 1)

図 1



(2)rDFATの分化能の確認

rDFATを骨分化培地(DMEM+10%FBS+10mM - グリセロフォスフェイト(b-Gly)+10µg/ml アスコルビン酸(Aa)+レチノイン酸(RA)10µM: 刺激3日間のみ)および脂肪分化培地(DMEM+ 10%FBS+1µM デキサメタゾン(Dex)+ 0.5m イソブチルメチルキサンチン(IBMx)+インスリン-トランスフェリン-セレニウム(ITX))にて培養後、脂肪細胞への分化をOil Red O染色にて、骨芽細胞への分化をAlizarin Red S染色およびアルカリホスファターゼ(ALP)活性と骨関連遺伝子(ALP, Bone sialoprotein(BSP)およびOsteocalcin(OCN))の遺伝子発現の解析にて評価した。

(3)ラット頭蓋骨欠損モデルを用いた rDFATの骨形性能の評価

Wister系ラット頭頂骨両側に直径5mmの欠損を外科的に作製し(図2)以下4群、A:コントロール(欠損作製のみ),B:担体のみ(PLGA/TCP複合体; GC scaffold),C: rDFAT+担体, D: 骨分化刺激 rDFAT+担体を無作為に施した。6週の観察期間終了後動物を安楽死させ、通常に従い脱灰薄切組織標本作製し、組織学的評価を行った。



図 2: ラット頭蓋骨欠損

左: A :Surgical Control

右: B :担体のみ (PLGA/ TCP 複合体;

GC scaffold)

(4) GFP 発現ラットからの GFP 発現 rDFAT の分離培養

GFP 発現ラット[SD-Tg(CAG-EGFP)]の鼠径部より採取した脂肪を酵素処理し、脂肪細胞を採取後、天井培養にて培養し、GFP 発現 rDFAT を確立。蛍光顕微鏡下にて観察

#### 4. 研究成果

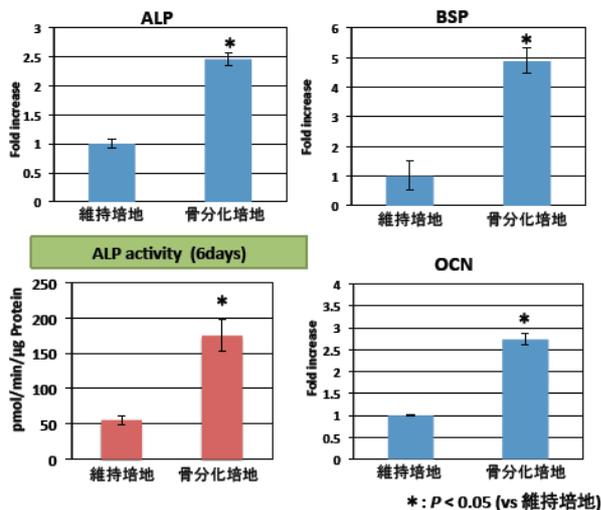
(1) rDFAT の分化能の確認

骨分化培地および脂肪分化培地にて rDFAT を3週間培養し、分化を評価したところ、それぞれ石灰化物および脂肪滴の形成をみとめ、骨芽細胞様および脂肪細胞様細胞への分化が確認された(図3)。また、アルカリホスファターゼ(ALP)活性と骨関連遺伝子の遺伝子発現は rDFAT 培養6日後でいずれも骨分化培地刺激にて有意な上昇が観察された。(図4)

図3



図4



(3) ラット頭蓋骨欠損モデルによる rDFAT の骨形性能

A: コントロール群

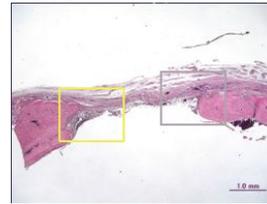
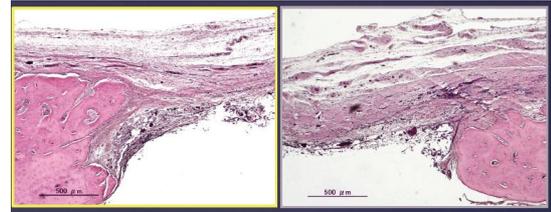


図5



B: 担体のみ群 ( PLGA/ TCP 複合体; GC scaffold )

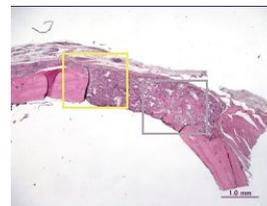
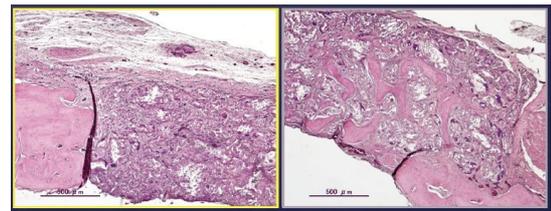


図6



C: rDFAT + 担体群

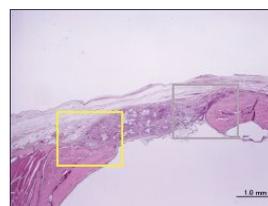
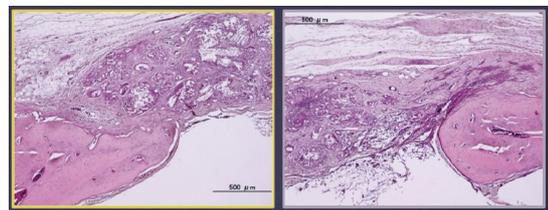


図7



#### D: 骨分化刺激 rDFAT + 担体群

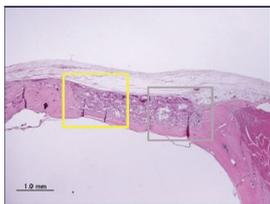
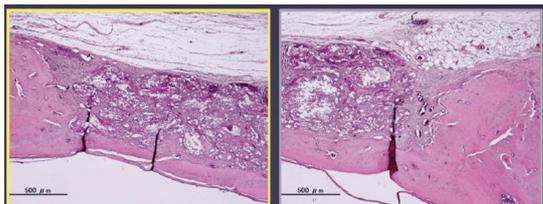
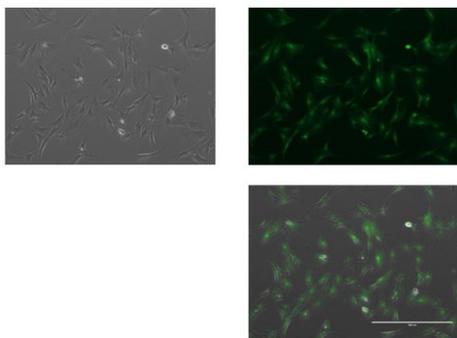


図 8



ラット頭蓋骨欠損モデルにおいて、rDFAT の骨形成性能を評価したところコントロール(図 5)および担体みの群(図 6)では骨のブリッジングを認めなかった。一方、rDFAT + 担体群(図 7)では新生骨によるブリッジングが 1 個体にのみが認められ、骨分化刺激 rDFAT + 担体群(図 8)では 4 個体において新生骨のブリッジングが認められた。

#### (4)GFP 発現 rDFAT の分離確立



GFP 発現ラット[SD-Tg(CAG-EGFP)]より分離した GFP 発現 rDFAT 像  
蛍光顕微鏡下にて GFP の発現が確認された。

以上の結果より、rDFAT 細胞移植が骨形成において有効であることが示された。今後、歯周組織欠損への応用を GFP 発現 rDFAT を用いて移植細胞トレーシングも含めて検討していきたいと考えている。

(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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1)中村 利明, 白方 良典, 篠原 敬哉, 谷山 勝義, 迫田 賢二, 吉元 剛彦, 野口 和行, 脱分化脂肪細胞(DFAT)と乳酸・グリコール酸共重合体/ハイドロキシアパタイトコンポジットを用いたラット頭蓋骨欠損における骨再生, 第 56 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2013 年 9 月 (群馬・前橋).

(2)吉元剛彦, 中村利明, 迫田賢二, 篠原敬哉, 谷山勝義, 白方良典, 野口和行, 脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いたラット頭蓋骨欠損モデルにおける骨再生, 平成 24 年度日本歯周病学会九州五大学日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会, 2012 年 10 月 (福岡).

〔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

吉元 剛彦 (YOSHIMOTO, Takehiko)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号: 60419653