

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05053

研究課題名(和文) 球状骨髄間葉系幹細胞集塊から3D構築された立体組織移植による歯周組織再生療法開発

研究課題名(英文) The development of periodontal regenerative cell therapy by using clumps of MSCs/ECM complexes

研究代表者

栗原 英見 (Hidemi, Kuriha)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・教授

研究者番号：40161765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らの研究室では、これまでに、間葉系幹細胞(MSCs)とMSCs自身が産生する細胞外基質(ECM)を用いて、間葉系幹細胞集塊(Clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs))を樹立した。C-MSCsは、人工足場材料を用いずに移植可能で、骨再生を達成する。本研究ではC-MSCs培養技術を応用することで、効果的な歯周組織再生療法のための基盤技術を開発することを目的とした。

その結果、C-MSCsは歯周組織再生能を有していること、複合化による任意の大型組織を作成できること、免疫制御能を向上させ異種移植拒絶を逃れること、凍結保存可能であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Previously, we have generated clumps of mesenchymal stem cells (MSCs) /extracellular matrix (ECM) complexes (C-MSCs), which consisted of cells and self-produced ECM. C-MSCs can be regulated its cellular function in vitro and be grafted into bony lesion without any artificial scaffold to induce bone regeneration. The aim of this present study is to develop stringent clinical-scale production platform for promising periodontal tissue regenerative cell therapy by using C-MSCs.

In this study, we have demonstrated that C-MSCs transplantation induced successful periodontal tissue regeneration in beagle dog class III furcation defect model. Moreover, C-MSCs can be assembled when they are cultured in contact with each other. In addition, C-MSCs treated with IFN-gamma abrogated xeno-immune response. Cryopreserved C-MSCs retain their cellular property. These findings suggested that assembled C-MSCs generated from donor cells can be cell preparation for periodontal tissue regenerative therapy.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞集塊 C-MSCs 歯周組織再生 立体組織 免疫制御能 凍結保存

## 1. 研究開始当初の背景

重度慢性辺縁性歯周炎や、侵襲性歯周炎といった大規模歯周組織破壊疾患に対して、生体外から機能的な細胞を供給する細胞治療法の開発研究がすすめられている。特に、間葉系幹細胞(MSCs)は患者自身の骨髄から安全に分離でき、遺伝子導入を必要とせず、多分化能・自己増殖能を発揮するため、現在のところ、最も安全・確実に臨床応用できる細胞として考えられている。

しかし、その MSCs を実際の効果的な歯周組織再生療法として応用するには至っていない。その原因として、大規模で不可逆的な状態にまで陥った欠損組織を再生させるほどの強い治療効果が得られていないことと、移植体作成における培養期間・コストの増大が挙げられる。これらの問題を解決するためには、複雑で広範囲な欠損組織にも確実に適合し細胞機能を正確に発揮させる MSCs 移植方法の開発が必要である。さらに、その移植体を他家由来の細胞で作成し、凍結保存することが可能になれば、培養期間・コストを縮小させることができる。

一方、研究代表者らの教室では MSCs を用いた効果的な歯周組織再生治療法開発のために、細胞と細胞自身が産生する細胞外基質(ECM)を用いて、直径 1mm ほどの間葉系幹細胞集塊(Clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs))を樹立した。C-MSCs は、移植前に細胞機能調節を施し、人工足場材料を用いることなく骨欠損部に移植でき、骨再生を促進することが明らかとなっていた。この C-MSCs 培養技術を応用すれば、上述した歯周組織再生療法のための問題点が解決できると考えられた。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では C-MSCs 培養技術を応用することで、効果的な歯周組織再生療法のための基盤技術を開発することを目的と

し、以下の 3 項目を検討した。

(1) C-MSCs の歯周組織再生効果を確認し、それらを複合化することで任意の形態の立体組織を作成し、いかなる欠損形態にも適合する移植体作成技術を確立すること。

(2) 移植拒絶のない他家移植方法の確立のために、C-MSCs の免疫制御能を向上させる培養方法を確立すること。

(3) C-MSCs の細胞活性に影響を与えない凍結保存法を確立すること。

## 3. 研究の方法

これまでに確立していた細胞集塊化の方法(Kittaka et al., 2015, Cytotherapy)をラット、ドッグ、ヒトごとに最適化し、各種 C-MSCs を作成した。

上述した(1)の検討として、ビーグル犬骨髄から分離した MSCs を C-MSCs 化し、炎症性 ClassIII 分岐部欠損モデルに移植し、その組織再生効果を検討した。またその再生効果を向上させるために石灰化誘導培地(OIM)で前処理された C-MSCs(OIM-C-MSCs)を樹立し、その移植効果も検討した。さらに、得られた C-MSCs を互いに接触さしながら培養できるモールドを 3D プリンターにて作成し、その複合化の可否を確認した。

(2)の検討として、ヒト骨髄由来 MSCs からヒト C-MSCs を作成した。さらに、IFN- $\gamma$  刺激を受けた C-MSCs(C-MSCs- $\gamma$ )の免疫調節性酵素 IDO の発現量と、免疫制御能を *in vitro* で検討した。さらに、ヒト C-MSCs、もしくはヒト C-MSCs $\gamma$  を通常の免疫システムを有する c57BL6 マウスの頭蓋冠欠損モデルに移植し、異種移植拒絶を制御しながら骨再生を達成出来るかを調べた。

(3)の検討として、ラット骨髄由来 MSCs から C-MSCs を作成し、各種凍結保存剤(DMSO+DMEM+FBS からなる保存液、もしくは市販の保存液)に浸漬し、液体窒素下で保存後、細胞活性と骨分化能の変化の有無を確

認した。さらに、凍結保存を経た C-MSCs(Cryo-C-MSCs) もしくは通常の C-MSCsをラット頭蓋冠欠損モデルに移植し、その骨再生効果の違いを比較した。

#### 4. 研究成果

(1)の検討では、ビーグル犬根分岐部欠損に対して、人工足場材料を用いることなく移植された C-MSCs が効果的な歯周組織再生能を発揮出来ることが示された。さらに、OIM-C-MSCs がより迅速で欠損部全周に及び歯槽骨形成を促進しながら歯周組織再生を達成することを見出した(Takewaki et al., 2017, J Dent Res に発表)。さらに、これらを複合化する試みでは、予め作成したモールド内で複数個の C-MSCs を互いに接触した状態で培養すると、48 時間後には ECM 同士が癒合し、複合化することが示された。また、この複合化は、モールドの形に依存していかなる形態も付与出来ることを見出した(図 1: 未発表データ)。現在、この結果に基づき、バイオ 3D プリンター-Regenova を用いて、より大型な C-MSCs 複合体を作成し、その歯周組織再生効果を検討中である。この大型の C-MSCs 複合体を自在に作成する技術を確認することで、臨床で遭遇する、複雑な形態を示す歯周組織欠損に対応出来るようになると思われる。

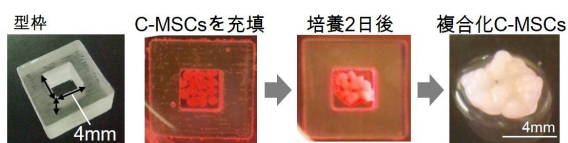


図1. C-MSCsの複合化

3Dプリンターで作成した型枠の4×4×4mmの内腔に下層として、16ヶのC-MSCsを設置。それらに重ねるようにさらに16ヶのC-MSCsを配し3日間培養を行うことで、各々の細胞集塊が接合した塊が得られる

(2)の検討では、C-MSCs- $\gamma$  が極めて高いIDO 発現をしていることが qPCR、Western blotting の結果明らかとなった。さらに、C-MSCs- $\gamma$  はその高いIDO 活性のため、T細胞の活性化を抑制出来ることも示された。さ

らに、ヒト C-MSCs のマウス頭蓋冠欠損に対する異種移植では、T細胞による移植拒絶が生じ、骨再生を誘導出来なかったのに対し、ヒト C-MSCs- $\gamma$  異種移植では、マウス免疫応答を抑制し、骨再生を達成出来た(図 2: Takeshita et al., 2017, Stem Cell Res Ther に発表)。これらの結果は、ヒト C-MSCs- $\gamma$  が他家移植に応用出来る可能性を示唆した。

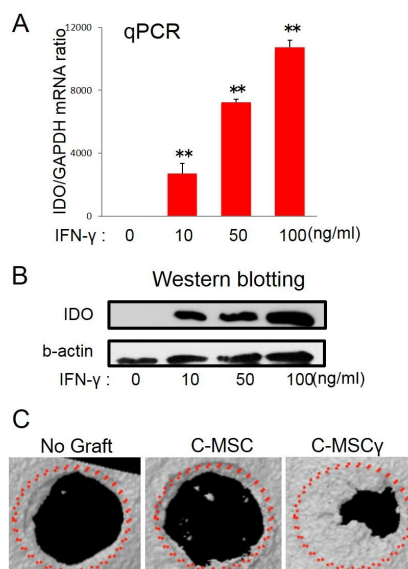


図2. IFN- $\gamma$ 処理されたC-MSC(C-MSC $\gamma$ )の性質  
A and B. IFN- $\gamma$ 刺激が濃度依存的にC-MSCの免疫調節性酵素IDO発現を上昇させる。  
C. ヒトC-MSC $\gamma$ のマウス頭蓋冠欠損に対する異種移植効果。マイクロCT像。ヒトC-MSC移植が骨再生を誘導しなかったのに対し、C-MSC $\gamma$ 異種移植が骨再生を誘導した。

(3)の検討では、C-MSCs は凍結保存後も90%を超える細胞生存活性を維持することが示された。さらに、MSCs マーカーに変化は生じず、骨分化能も保有したままであった。さらに、その凍結保存可能であったメカニズムとして、その豊富なECMが凍結によるダメージから細胞を保護していることが明らかとなった。また、ラット頭蓋冠欠損モデルに対する移植実験では、Cryo-C-MSCs は凍結保存を経ていないC-MSCs と同等以上の骨組織再生能を有していることが見出された(図 3: Motoike et al., 2018, Stem Cell Res Ther に発表. 特許出願中)。これらの結果は、

(2)の検討結果と併用することで、ドナー由来MSCsから作成したC-MSCsを備蓄しておくことで、患者必要時に迅速に供給できる歯周組織再生治療細胞製剤として応用出来る可能性を示唆した。

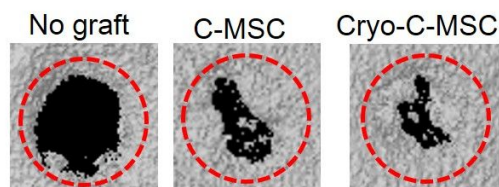


図3. 凍結保存C-MSC(Cryo-C-MSC)の性質ラットC-MSCもしくは凍結保存(6ヶ月)を経たCryo-C-MSCのラット頭蓋冠欠損に対する移植効果。マイクロCT像。Cryo-C-MSC移植がC-MSC移植と同等の骨再生を示した。

#### 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 3 件)

1. Motoike S, Kajiya M, Komatsu N, Takewaki M, Horikoshi S, Matsuda S, Ouhara K, Iwata T, Takeda K, Fujita T, Kurihara H.

Cryopreserved clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes retain osteogenic capacity and induce bone regeneration.

Stem Cell Res Ther. 2018 Mar 21;9(1):73. (査読有り)

2. Takewaki M, Kajiya M, Takeda K, Sasaki S, Motoike S, Komatsu N, Matsuda S, Ouhara K, Mizuno N, Fujita T, Kurihara H.

MSC/ECM Cellular Complexes Induce Periodontal Tissue Regeneration.

J Dent Res. 2017 Aug;96(9):984-91. (査読有り)

3. Takeshita K, Motoike S, Kajiya M, Komatsu N, Takewaki M, Ouhara K, Iwata T, Takeda K, Mizuno N, Fujita T, Kurihara H.

Xenotransplantation of interferon-gamma-pretreated clumps of a human mesenchymal stem cell/extracellular matrix complex induces mouse calvarial bone regeneration.

Stem Cell Res Ther. 2017 Apr 26;8(1):101. (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 栗原 英見

歯周組織再生の今後の展開

第16回日本再生医療学会総会(2018年)  
(シンポジスト招待講演)

2. 加治屋 幹人

歯周病細胞治療における3次元培養法の現況と展望

日本歯周病学会60周年記念大会(2018年)  
(シンポジスト招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 凍結移植体及び凍結移植体の製造方法

発明者: 栗原英見/加治屋幹人/本池総太

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2016-089188

出願年月日: 2016/04/27

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

栗原 英見(Hidemi Kurihara)

広島大学・医歯薬保健学研究科.教授

研究者番号: 40161765

(2)研究分担者

加治屋幹人(Mikihiro Kajiya)

広島大学・医歯薬保健学研究科.助教

研究者番号: 00633041

岩田 倫幸(Tomoyuki Iwata)

広島大学・病院.助教

研究者番号： 30418793

加藤 功一 (Kouichi Kato)  
広島大学・医歯薬保健学研究科. 教授  
研究者番号： 50283875

水野 智仁 (Noriyoshi Mizuno)  
広島大学・病院. 講師  
研究者番号： 60325181

藤田 剛 (Tsuyoshi Fujita)  
広島大学・医歯薬保健学研究科. 准教授  
研究者番号： 80379883

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
( )