

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月26日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20684

研究課題名(和文)細胞移植治療に最適化された骨再生治療用骨芽細胞培養技術の開発

研究課題名(英文) Development of osteoblast culture system for bone regenerative treatment for cell transplantation

研究代表者

相野 誠 (Aino, Makoto)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：20572811

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)：近年細胞移植治療のため柔軟性があり生体環境を模倣しやすいハイドロゲルによる3次元培養が近年盛んに研究されている。研究代表者は操作性が高く、細胞接着性が高い生体適合材料である Gelatin Methacryloyl (GelMA)を用いて3次元培養を行うことで培養環境が細胞に与える影響を検討した。GelMAは濃度により硬さを変化させるため骨芽細胞に最適化した硬度を解析した結果、16Kpaのものが最適だった。この硬度で培養した結果細胞は凝集し、骨基質タンパク遺伝子の発現上昇が見られた。これらのことから骨組織再生に向けて培養を行う際にはGelMAによる3次元培養が適している事が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は日本国民が最も歯を失う原因となる疾患である。この歯周病で破壊された骨組織は一般的な歯科治療で回復できる症例に限られており、また患者自身が自覚症状を持つほどに進行した歯周病では回復させる事が非常に難しい。現在多くの分野の医療において回復させる事が難しいような損傷を負った場合、細胞移植治療による回復が行われつつあるが、組織によって培養法や条件が異なる。今回の研究成果から骨組織の再生に適した細胞培養の可能性を示し、将来的には細胞移植治療につなげる事が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, three-dimensional culture with a hydrogel that is flexible and easily mimics a living environment for cell transplantation treatment has been actively studied in recent years. The research representative examined the influence of the culture environment on the cells by performing three-dimensional culture using Gelatin Metacryloyl (GelMA), which is a highly compatible and highly cell-adhesive biomaterial. Since GelMA changes hardness by concentration, we analyzed hardness optimized for osteoblasts, and as a result, 16 Kpa was optimum. As a result of culturing at this hardness, the cells aggregated and an increase in expression of bone matrix protein gene was observed. From these facts, it was found that three-dimensional culture by GelMA is suitable for culture toward bone tissue regeneration.

研究分野：歯周病治療

キーワード：歯周病 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は40歳以上の成人の約70%が罹患し、歯周病は日本国民が最も歯を失う原因となる疾患であり、発症から進行が非常に遅く、また進行の過程で自覚症状が少ないことから、患者が医療機関を受診したときにはすでに歯周炎が重症化していることが少なくない。重症化した歯周炎では多量の骨欠損を伴い、歯を喪失するだけにとどまらず、その後の欠損補綴による機能回復をも困難にする。そのため、著しくQOLを低下させる。このような重症化した症例に見られる多量の骨欠損において現在の治療技術で対応出来る骨の再生量には限界がある。申請者はこのような骨再生療法のためのセルソースとして骨芽細胞に着目した。その結果、骨再生治療が必要とされる中高年齢層の歯周炎患者の歯槽骨から骨形成能力の高い細胞 HAOB を採取することに成功した。しかしながら HAOB は細胞増殖と共に骨形成能力を喪失してしまうことが判明した。この事は間葉系幹細胞(MSCs)をもちいた再生治療でも同様の報告があり、細胞分裂により骨形成能力は喪失していくことが報告されている。そのため分化能力を維持した培養技術の確率が望まれている。

2. 研究の目的

現在多くの分野の医療において回復させる事が難しいような損傷を負った場合、細胞移植治療による回復が行われつつあるが、組織によって培養法や条件が異なる。それは生体内の組織や臓器中の細胞は、異種細胞からなる複雑な三次元構造を持つためであり、機能的な組織や臓器を人工的に作製するには、この構造や細胞外の環境を再現することが重要である。そのための1つのアプローチとして、軟骨細胞の場合は立体的なコラーゲンゲル中で細胞培養を行う、三次元培養を行い、その結果脱分化を防ぐことに成功している。(Nebelung S, Ann Anat.351-8.2012)。本研究の目的として骨芽細胞が効率よく骨組織を再生するために必要な3次元培養方法の探索と、培養環境の探索を目的に解析を行った。

3. 研究の方法

近年細胞移植治療柔軟性があり生体環境を模倣しやすいハイドロゲルによる3次元培養が近年盛んに研究されている。申請当初はアクリルアミドゲルの表面を細胞外基質タンパクにてコーティングして細胞培養を行なったが、培養できる細胞数が少なく、また生存率がひく、解析が困難であったため、より操作性が高く、細胞接着性が高い生体適合材料である Gelatin Methacryloyl (GelMA)とより増殖能力が高いマウス骨芽細胞様細胞株 KUSA A-1 を用いるように計画を変更した。また Gelma は光感受性物質を用いることにより、ゲル化する。しかしながら、ゲル化する際に一般的に用いられている光感受性物質は、紫外線波長域において反応するため、細胞への紫外線照射は歯科用光照射器と、その波長に反応するリポフラビン光感受性物質として、GelMA をゲル化し臨床応用を考慮した場合、適応が難しい。そこで歯科用光照射器と、その波長に反応するリポフラビン光感受性物質とした GelMA を作成し、研究を進めた。

1)GelMA の作製

ブタ表皮由来ゼラチンを蒸留水に溶解後、無水メタクリル酸を添加し、50 で混和した。未反応モノマー除去のため半透膜 (12-14kD)を用いて、1週間透析した。溶解液を凍結乾燥し、GelMA を作製した。作製した GelMA を 20%の濃度で PBS に溶解し、光感受性物質と混和した。光感受性物質は、2%リポフラビンリン酸塩 (Sigma-Aldrich) と 0.2%トリエタノールアミン (Sigma-Aldrich)の混和物を用いた。作製した前駆体を、直径 8mm、高さ 0.8mm のテフロンモールド内に滴下し、60秒照射した。照射は歯科用光照射器 (Valo キュアリングライト、ウルトラデント)を用いた(以下、GelMA-VL)。対照群として、従来用いられている光感受性物質とし

4 (2 ヒドロキシエトキシ) 2 ヒドロキシ 2 メチルプロピオフェノン (Irgacure2959, BASF ジャパン株式会社)を 0.1%の濃度で用い、20 秒紫外線照射した。照射には UV-LED 照射器 (HD3133-260、ハヤシビレック)を用いた(以下、GelMA-UV)。

2)機械的性質の検討

作製した RF、UV の吸水膨張率および万能試験機を用いた圧縮弾性率について検討した。

3)細胞生存率の確認

マウス骨芽細胞株である KUSA-A1 細胞を、上記の方法で作製した前駆体と混合し、ゲル化した。D-MEM を用いて 24 時間培養後、Live/Dead assay kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞を染色した。蛍光顕微鏡にて撮像し、任意の箇所における生細胞数と死細胞数を、ImageJ(NIH)を用いて計測した。計測は 1 サンプルにつき 5 箇所カウントし、3 サンプルの平均を細胞生存率とした。次に、マウス骨芽細胞株 である KUSA-A1 細胞を GelMA20 μ l に対し 3×10^5 個内包し、VW または UV を照射、架橋後、DMEM 培地中で培養した。24 時間培養後、それぞれの GelMA における細胞生存率を live and dead assay kit(Thermo Fisher)を用いて染色、imageJ (NIH)ソフトウェアを用いて計測、解析した。また、GelMA に内包した KUSA-A1 細胞を 7 日間培養し、形態観察を行った。

4)遺伝子解析

Gelma による培養が骨芽細胞に与える影響について通法にしたがい KUSA A-1 を 6Well plate にて 3×10^5 /Well で播種したものと、GelMA20 μ l に対し KUSA A-1 を 3×10^5 個内包したものをそれぞれ 7 日間培養したのち mRNA を回収し、骨関連遺伝子群 (Runx2, Osterix, Bone sialoprotein(BSP), Osteocalcin(OCN))の発現量を RealtimePCR を用いて比較した。

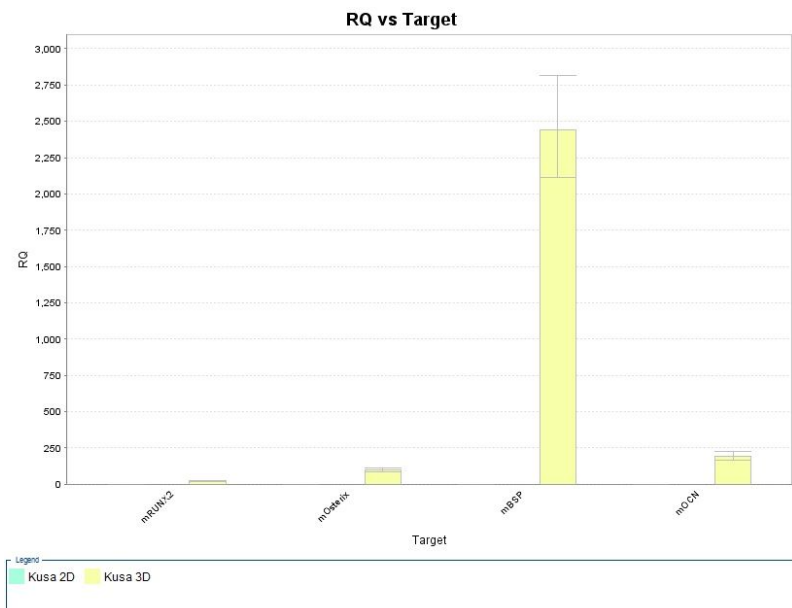
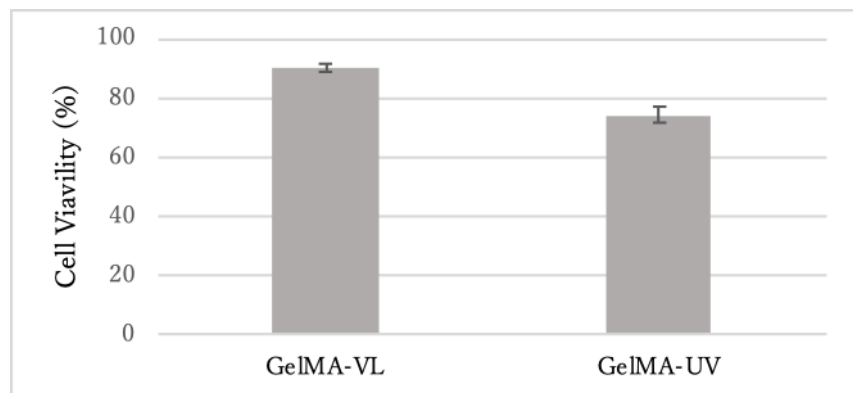
4 . 研究成果

吸水率は GelMA-VL が $1747 \pm 549\%$ 、GelMA-UV が $710 \pm 212\%$ で、GelMA-VL の方が有意に高かった。圧縮弾性率は GelMA-VL, UV においてそれぞれ $18.1 \pm 2.0\text{kPa}$ 、 $16.4 \pm 4.2\text{kPa}$ で、有意な差は認めなかった。

24 時間培養後の細胞生存率は、GelMA-VL は $90.1 \pm 1.6\%$ 、GelMA-UV は $73.9 \pm 2.7\%$ であり、GelMA-RF の方が GelMA-UV と比較し、有意に高かった。

以上のことから生体親和性の高い Gelma を用いた 3 次元培養が確立できた。

また 3 次元培養が骨関連遺伝子の発現量に与える影響について解析したところ 3 次元培養を行った KUSA A-1



では2次元培養を行った KUSA A-1 と比較し極めて優位に BSP の発言量が上昇しており、またそれ以外の骨芽細胞分化マーカー遺伝子についても2次元培養より遺伝子発現量が上昇していることが判明した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

1. Ai Orimoto, Misaki Kurokawa, Keisuke Handa, Masaki Ishikawa, Eisaku Nishida, Makoto Aino, Akio Mitani, Miho Ogawa, Takashi Tsuji, Masahiro Saito, F-spondin negatively regulates dental follicle differentiation through the inhibition of TGF- activity , Archives of Oral Biology 査読あり 79, 2017, 7-13 , DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.02.019.

2. Okabe I, Kikuchi T, Mogi M, Takeda H, Aino M, Kamiya Y, Fujimura T, Goto H, Okada K, Hasegawa Y, Noguchi T, Mitani A , IL-15 and RANKL play a synergistically important role in osteoclastogenesis. J Cell Biochem 査読あり 118(4) 2017 739-747 DOI: 10.1002/jcb.25726.

〔学会発表〕(計 2件)

1. 後藤亮真, 西田英作, 小林周一郎, 相野 誠, 三谷章雄: GeIMA-RF の足場材料としての可能性について 第 16 回日本再生歯科医学会学術大会 2018 年

2. 後藤亮真, 西田英作, 小林周一郎, 相野 誠, 黒須康成, 三谷章雄: 再生治療における GeIMA-RF の足場材料としての新たな可能性について. 第 149 回日本歯科保存学会秋季学術大会 2018 年

〔図書〕(計 1件)

相野 誠, 三谷章雄: 海外ジャーナル Watching 歯周病は心筋梗塞のリスクを高める. デンタルダイヤモンド 2018 年 4 月号, デンタルダイヤモンド社(東京), 101, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6 . 研究組織

特になし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。