

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19791472

研究課題名（和文）

未成熟筋組織による骨組織誘導系の確立

研究課題名（英文）

Establishment of the bone induction system by immature muscular tissue

研究代表者

林 達秀（ HAYASHI TATSUHIDE ）

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：70367621

研究成果の概要：胎仔ラットの未成熟筋組織に骨形成因子である BMP を作用させ、e-PTFE 膜状で培養したところ、培養 2 週間後に骨様組織が誘導されていた（H-E 染色）。さらにこの培養組織が骨系の組織であることを組織（免疫染色）、遺伝子、元素レベルで解析し、証明することができた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000		1,700,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	390,000	3,390,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系理工学

キーワード：歯科用材料・歯科理工学

BMP，未成熟筋組織，骨組織誘導

1. 研究開始当初の背景

組織工学（Tissue Engineering）や再生医療は近年注目されている分野の一つである。組織工学によって組織再生を成功に導くためには、細胞・scaffold・サイトカインを適切に組み合わせて使う必要がある。現在、組織工学に使用される細胞は優れた分可能を有する胚性幹細胞や骨髄幹細胞と

いった、幹細胞が用いられるのが主流である。一方、骨形成因子である BMP（Bone Morphogenetic Protein）は異所性、あるいは同所性に骨誘導能を有する蛋白質であり、これまでも種々の研究がなされている。

これまでの研究において、胎仔ラットから抽出した未成熟筋組織から BMP を用いて in vitro で軟骨組織誘導を試みたところ

特に e-PTFE を Scaffold とした場合には軟骨組織を安定して誘導させることが可能となった。さらに、その後の継続した実験過程において、軟骨組織が誘導されている部位とは違う部位に骨芽細胞様細胞と類骨からなる骨様組織が誘導されていた。

2. 研究の目的

(1) 骨形成因子である BMP と e-PTFE を scaffold として用いて、未成熟筋組織から in vitro で骨組織誘導を試みる。

(2) さらに、培養組織の各種解析を行い、誘導された組織が骨系の組織であることを検証する。

3. 研究の方法

(1) BMP の抽出

本研究で用いた BMP は脱灰牛皮質骨から抽出後部分精製した。

(2) 骨組織誘導実験

scaffold として用いた e-PTFE 膜はそれぞれ 5×5 mm の大きさに整形し、さらに、培養組織が生着し易いよう中心部に一カ所刻みを入れた。未成熟筋組織は胎生 20 日の Sprague-Dawley rat の前肢未成熟筋組織を使用した。培養はまず、摘出した組織を 1mol/l PBS 中に溶解した BMP (10µg/µl) と一緒にホモジナイズし、培養液 (α-MEM, 15% FBS, 50µg/ml アスコルビン酸, 10mM β-グリセロリン酸) 中に懸濁後 e-PTFE 膜上に乗せ、インキュベータ内 (37℃, 5%CO₂) で 14 日間培養した。培養液は 1 日おきに交換し、最初の一週間はその都度同量の BMP を添加した。

(3) 培養組織の各種解析

培養組織が骨系の組織であることを確認するために下記の解析を行った。

培養終了後、培養組織の軟 X 線およびマイクロ CT 観察。

切片標本作製後、H-E 染色および、I 型コラーゲン、オステオポンチン、オステオカルシンの免疫染色による組織観察。

培養 1, 2, 3, 7, 10 および 14 日目に mRNA を抽出後、RT-PCR を行い、培養 1, 2, 3 日目に Runx2/Cbfa-1 および Osterix について、培養 3, 7, 10, 14 日目に I 型コラーゲン、オステオポンチンおよびオステオカルシンの遺伝子発現の確認と定量を行った。

走査・透過型電子顕微鏡 (STEM; Scanning Transmission Electron Microscope) 観察後、

エネルギー分散型 X 線分析 (EDS; Energy Dispersive X-ray Spectrometer) を行い、組織中の Ca と P の分布を観察。

4. 研究成果

軟エックス線 (図. 1-1) およびマイクロ CT (図. 1-2) 観察において、培養組織の一部に不透過性のやや強い箇所が観察された。



図. 1-1 軟エックス線像

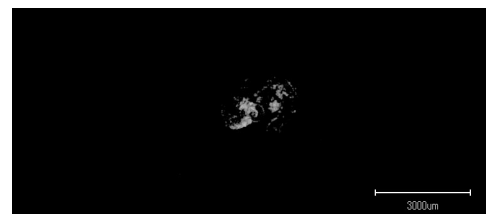


図. 1-2 マイクロ CT 像 (BMP 添加)

組織観察では組織の一部に骨芽細胞様細胞と類骨が観察され (図. 2-1), I 型コラーゲン、オステオポンチンおよびオステオカルシンの免疫染色ではいずれも類骨部が染色されていた (図. 2-2, -3, -4)。

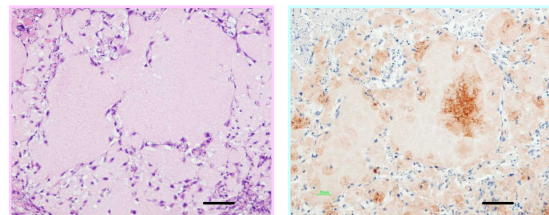


図. 2-1 H-E 染色

図. 2-2 I 型コラーゲン

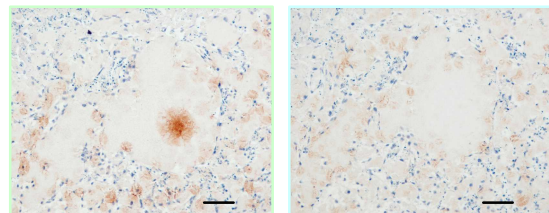


図. 2-3 オステオポンチン

図. 2-4 オステオカルシン

RT-PCR では観察した全ての骨系の遺伝

子の発現が確認され, Runx2/Cbfa-1 の遺伝子発現は特に 2 日目に強く認められた (図 . 3). さらに, オステオカルシンの発現量は培養期間中終始少なかったものの, I 型コラーゲンとオステオポンチンの発現量は培養期間中増加していた (図 . 3).

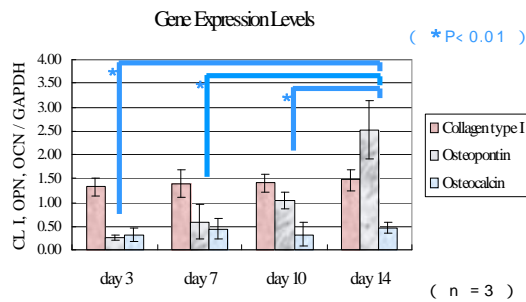
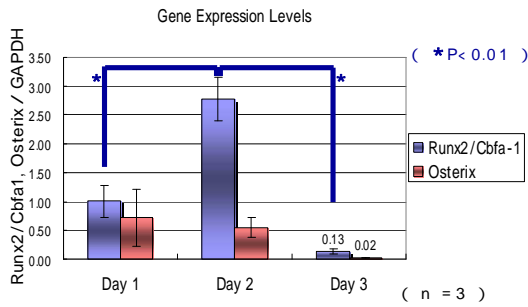


図. 3 各種骨系遺伝子の定量

EDSでは細胞外基質にCaとPが確認され, その重ね合わせ像より同部位に存在しており, 骨と同じリン酸カルシウム系の組織が誘導されていることが分かった.

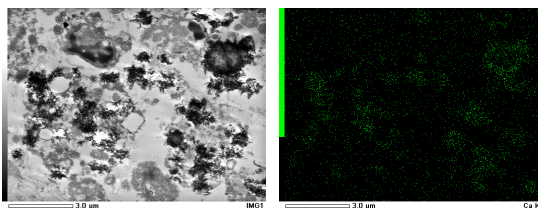


図. 4-1 STEM 像

図. 4-2 Ca

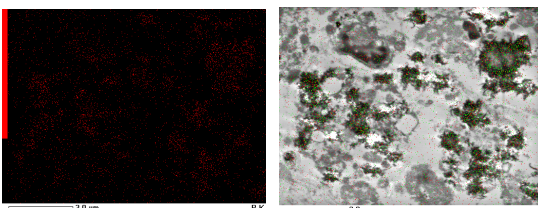


図. 4-3 P

図. 4-4 重ね合わせ像

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 1 件)

T. Hayashi, T. Kawai, A. Ishikawa, H. Kawai, K. Nakano, Y. Takei, K. Kuroki. Histological analysis of induced cartilage on the biodegradable or nonbiodegradable membranes from immature muscular tissue *in vitro*. J Biomed Mater Res A. 15;86(4):1048-1054.

[学会発表] (計 4 件)

林 達秀, 河合達志, 黒木健次郎, 浅井崇文, 岡野正史, 塚脇篤也, 藤本耕太郎. 誘導骨様組織による骨組織再生の試み. 第 49 回日本歯科理工学会学術講演会 (札幌) 5.13.2007 .

T. Hayashi, T. Kawai, K. Kuroki, T. Asai, M. Okano, M. Sato, M. Taniyama. The influence of Ca²⁺ on bone-like tissue induction *in vitro*. International Dental Materials Congress 2007. (Bangkok) 11.24.2007.

T. Hayashi, T. Kawai, T. Asai, M. Okano, Y. Sato, M. Asakura. Ca²⁺ promotes the calcification of induced bone-like tissue *in vitro*. 86th General Session & Exhibition of the IADR. (Toronto) 7.4.2008.

T. Hayashi, Y. Sato, T. Asai, S. Hamajima, M. Asakura, T. Kiriyama, T. Kawai. Aiming for ossification *in vitro* Various Analyses of Induced Bone-Like Tissue *in vitro* Academy of Prosthetic and Regenerative Sciences. (Nagoya) 11.28.2008.

[図書] (計 0 件)

なし

[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）

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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 達秀（TATSUhide HAYASHI）
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号：70367621