

機関番号：13101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500406

研究課題名 (和文) 硬組織再生を目的とした培養骨膜シートに対する凍結保存技術の開発

研究課題名 (英文) Development of cryopreservation of cultured periosteum sheets for hard tissue regeneration

研究代表者

小神 浩幸 (KOGAMI HIROYUKI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10463978

研究成果の概要 (和文) : 培養骨膜シートは骨を再生する自家の移植材料として歯周治療および口腔外科治療に臨床応用されている。しかし治療には骨膜片を採取した後、6 週間培養する必要がある。我々は培養骨膜シートによる治療計画に柔軟性を持たせるため、凍結保存法を研究した。研究の結果、2 週間程度前培養した骨膜片を至適化した保存液中で凍結保存することによって、解凍後の細胞増殖速度と骨組織形成能を高く維持できることが明らかにした。

研究成果の概要 (英文) : Implantation of autologous cultured periosteal sheets produce clinically effective bone regeneration in periodontal and oral surgical therapy. However, preparation of these sheets usually requires six weeks. To make this therapy more efficient and flexible, we developed a preservation method for the cultured periosteal sheet that maintained biopotency for the clinical application. As a result, we have found that human periosteum tissue segments that pre-cultured for two weeks before cryopreservation maintained their potency of cell growth and responses to standard osteogenic induction at high level after thawing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学、生体材料学

キーワード：細胞・組織工学、自家移植、硬組織再生、凍結保存

1. 研究開始当初の背景

培養骨膜シートは骨膜片を培養して得られる細胞シートである。この細胞シートは硬組織

形成能を持ち、歯科領域で歯槽骨を再生する自家の移植組織として既に臨床応用されている。これまでに共同研究者である奥田、川瀬

らは 70 例以上の再生治療が実施してきた。しかし、培養骨膜シートを得るために 6 週間の培養期間を要する点が治療の制約となっている。我々は培養骨膜の凍結保存法の確立とその科学的根拠を得ることによって、治療計画に柔軟性を持たせることが必須であると考えた。

2. 研究の目的

当該研究の目的は培養骨膜シートの凍結保存法確立によって治療計画に柔軟性を持たせ、再生医療の普及を進めることである。凍結保存には対数増殖期にある細胞を調製すること、凍結保存液の組成を至適化することが重要である。従って、当該研究の具体的な研究目標は培養骨膜片を凍結保存する前に前培養処理を行い、培養組織に適切な凍結保存液の組成を決定することとした。また、方法を選択するにあたって操作性とコストダウンを念頭に置いた。

3. 研究の方法

我々は培養骨膜シートを培養皿上で凍結保存する方法を検討してきた。その中で一旦培養皿から剥離して新たに別の培養皿に“継代した骨膜片”でも細胞シートの作製は可能であり、さらに培養日数が経過した骨膜片の方が培養開始直後のものより細胞の遊走や増殖が良いことを見出した。

これまでの検討で採取直後の新鮮骨膜片が凍結保存に向かないことは判明していた。しかし前培養することにより骨膜片の凍結保存が可能になれば、細胞シート全体を保存するよりコスト、保存用スペースの点で汎用性に優れると考え、この方法により研究を進めることとした (図 1、2)。

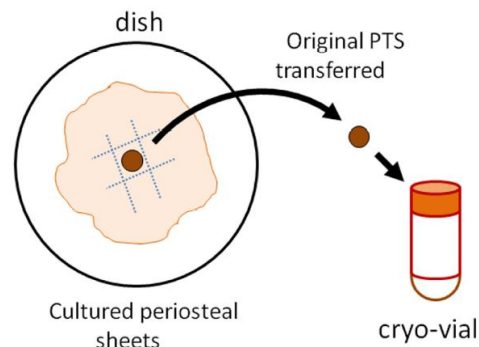


図 1 骨膜片の凍結保存

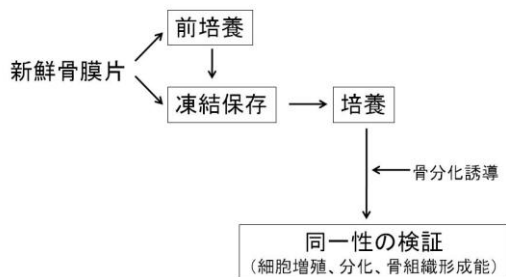


図 2 研究のスキーム図

1) 凍結保存液の組成および前培養期間

骨膜片の細胞遊走能と細胞シート形成速度を指標に検討を行った。これまでの検討結果から凍害防止剤として DMSO (ジメチルスルホオキシド) を 10% の濃度で用い、FBS (ウシ胎児血清) の濃度を 10% から 90% の範囲で変化させた。

2) 増殖期細胞の存在比率と培養日数の関係

ヨウ化プロピジウム (PI) と抗増殖細胞核抗原 (PCNA) 抗体を利用した蛍光染色により、病理組織標本中で細胞数と増殖細胞数を比較した。

3) 凍結保存した骨膜片による培養骨膜シートの同一性

in vitro で骨芽細胞への分化誘導因子に対する応答性を評価した。リアルタイム PCR による発現遺伝子の半定量解析、抗 ALP、オステオカルシン抗体および von Kossa 染色による

病理組織化学的解析法を用いた。

4. 研究成果

研究の結果、採取した骨膜片を2週間程度前培養し凍結保存することによって(図1)、解凍後の細胞増殖速度と石灰組織形成能を高く維持できることが明らかにできた。

- 1) 凍結保存液の組成および前培養期間
- 2 週間程度の前培養処理後に 10%DMSO と 50%以上の FBS を含む凍結保存液を使用することにより良好な結果が得られることを確認した(図3)。

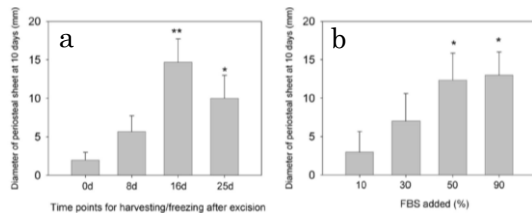


図3 前培養期間と FBS 濃度の検討

(a) 骨膜片を前培養した後、2週間凍結保存した。解凍後にそれぞれを10日間培養した。(b) 16日間前培養した骨膜片を凍結保存し、解凍後に10日間培養した。

- 2) 増殖期細胞の存在比率と培養日数の関係
- 前培養した骨膜片で増殖期にある細胞の存在比率が増していることを示した(図4)。凍結保存に適した対数増殖期の細胞を増加させることが骨膜片の凍結保存を可能にすると思われた。

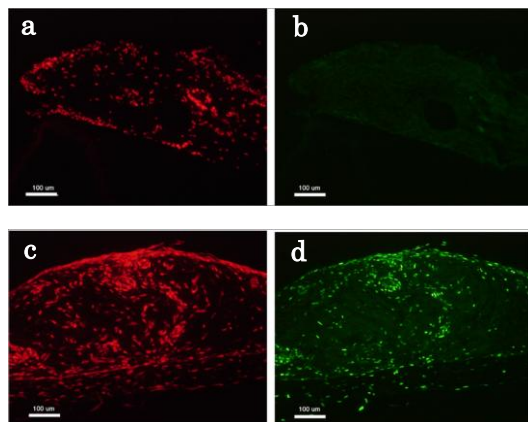


図4 骨膜片の蛍光染色像

(a, b) 新鮮骨膜片、(c, d) 16日間前培養した骨膜片。

(図4続き)

染色はヨウ化プロピジウム (PI、赤色、全細胞核が染色される：a, c)および抗増殖細胞核抗原抗体 (PCNA、緑色、増殖細胞核が染色される：b, d)を用いた。

- 3) 凍結保存した骨膜片による培養骨膜シートの同一性

本法によって凍結保存した骨膜片は新鮮骨膜片と同等の培養骨膜シート形成能を維持していた(図5-8)。

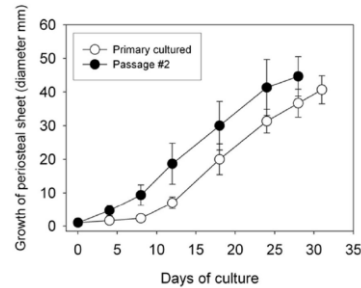


図5 新鮮骨膜片と凍結保存した骨膜片による培養骨膜シートの成長速度

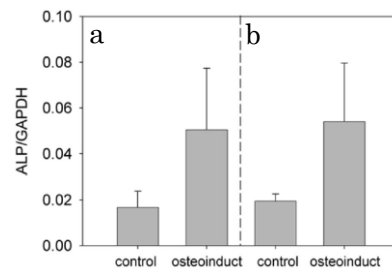


図6 培養骨膜シートのアルカリフォスファターゼ (ALP) mRNA 発現

(a) 新鮮骨膜片および、(b) 16日間前培養し、凍結保存した骨膜片を21日間培養した後、骨分化誘導培地で3日間追加培養した。

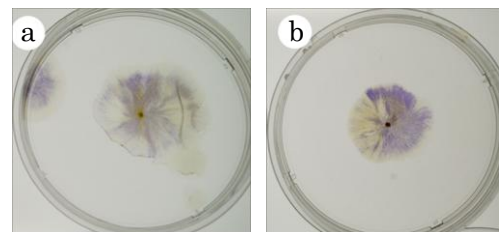


図7 培養骨膜シートのALP染色像

(a) 新鮮骨膜片および、(b) 16日間前培養し、凍結保存した骨膜片を21日間培養した後骨分化誘導培地で9日間追加培養した。

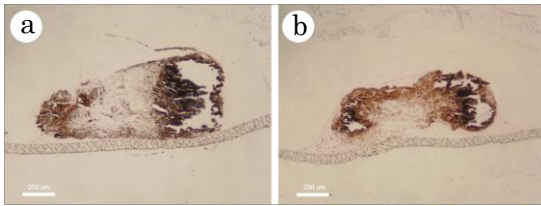


図8 von Kossa 染色による病理組織標本像
(a) 新鮮骨膜片および、(b) 16日間前培養し、凍結保存した骨膜片を16日間培養した後、骨分化誘導培地で3日間追加培養した。

適切な前培養過程の導入によって組織中の増殖細胞を増加させ、凍結保存の結果を改善する結果は、他の培養組織にも応用できると推察される。培養骨膜シートによる骨再生治療は研究分担者である奥田、川瀬らの臨床および基礎研究が世界に先駆けている。当該研究で凍結保存の基本技術を確立し、その科学的根拠の蓄積することができた。今後はFBS(ウシ胎児血清)の排除によるリスク因子低減、造腫瘍試験、純度試験などにより移植安全性を担保し、骨再生の科学的根拠をさらに蓄積することで培養骨膜による治療法の一般普及を促進できる。

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 6件)

①Manual cryopreservation of human alveolar periosteal tissue segments: Effects of pre-culture on recovery rate. Kawase T, Kogami H, Nagata M, Uematsu K, Okuda K, Burns DM, Yoshie H. Cryobiology. 査読あり in press

②Osteogenic activity of human periosteal sheets cultured on salmon collagen-coated ePTFE meshes. Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, Yoshie H. J Mater Sci Mater Med. 査読あり 2010 21 731-9

③Characterization of human cultured periosteal sheets expressing bone-forming potential: in vitro and in vivo animal studies. Kawase T, Okuda K, Kogami H,

Nakayama H, Nagata M, Nakata K, Yoshie H. J Tissue Eng Regen Med. 査読あり 2009 3 218-29

〔学会発表〕(計4件)

①Okuda K Clinical and histologic evaluation of tissue-engineered cultured periosteum application for bone regeneration. アメリカ歯周病学会 2010年10月30日-11月2日 ホノルル(米国)
②奥田一博 ポリ乳酸カプロラクトン重合体フィルム HIT 骨膜シート培養・移植への応用 第9回日本再生医療学会 2010年3月18-19日 広島・広島大学

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/ortr/gyouseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小神 浩幸 (KOGAMI HIROYUKI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10463978

(2) 研究分担者

川瀬 知之 (KAWASE TOMOYUKI)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90191999

奥田 一博 (OKUDA KAZUHIRO)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00169228