

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21592427

研究課題名（和文）：迅速大量増幅に基づく多能性幹細胞利用による画期的な硬組織再生治療の臨床展開

研究課題名（英文）：The transrelational research of the epoch-making in hard tissue regeneration with the rapidly proliferated iPS cells

研究代表者

池田 毅（IKEDA TAKESHI）

長崎大学・病院・講師

研究者番号：90244079

研究成果の概要（和文）：

日本発の画期的な研究成果として、マウス由来線維芽細胞において細胞分化のリプログラミングが 4 種類の遺伝子導入であらゆる細胞に分化可能な人工多能性幹細胞(iPS 細胞)の作製が可能となり、さらにヒト皮膚由来線維芽細胞においてもヒト iPS 細胞の樹立が報告された。そこで現在は患者の組織から細胞を採取し、その体外に取出した細胞を分化多能性を有する iPS 細胞へ誘導し必要な細胞へ再分化させ、組織工学の技術を用いて生体外で 3 次元細胞培養し、それを生体内に戻し組織を再生するといった 21 世紀前半の医療として期待が高い再生医療における免疫拒絶のない「真の細胞移植療法」の早期実現化が急務となってきた。そこで本研究は今後 3～4 年後の臨床実用化を目標に、天然有機多糖体であるキトサンを iPS 細胞移植システムの Scaffold（担体）として使い、硬組織再生療法、特に歯槽骨および象牙質再生医療技術の開発・確立を目指すものであった。

研究成果の概要（英文）：

Making an induced pluripotent stem cell by reprogramming the mouse originated fibroblast with four kinds of gene was able to differentiate into various cells became possible as an epoch-making result of the research in Japan, and, in addition, the establishment of human iPS cell was reported in the human skin fibroblast. Then, the cell is gathered from the patient's organization now, the cell taken out to the outside of the body is induced to the iPS cell that has a versatile differentiation, and it differentiates into a necessary cell again. The achievement at the early stage of "True cell transplant treatment" without the immunity rejection that the cell is cultured by three dimensions by using the technology of the systems engineering in vitro, it is assumed to be a medical treatment of regenerating the tissue by transplantation of their cells to organization. Then, this research has used the chitosan that is the natural, organic biomaterials as scaffold of the iPS cell transplant system aiming at clinical practical application after 3-4 years. This aimed the development and the establishment of the hard tissue regeneration, especially alveolar bone and dentin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯内療法学

## 1. 研究開始当初の背景

キチンは、昆虫類、蟹や海老の外骨格や細菌の細胞壁に存在し、N-アセチル-D-グルコサミンを基本構成単位とする生体内高分子の天然アミノ多糖体である。さらにキチンを脱アセチル化処理して得られるキトサンは抗菌性、M $\phi$ 活性化能、創傷治癒促進能を有する生理活性物質であることが知られている。歯科領域では当教室において12年前から様々な観点より基礎的および臨床的検討を加え国際誌への投稿や国内外の学会報告を行っており、現在は硬組織再生誘導材として骨欠損修復および齶蝕等による歯髄露出部の硬組織による閉鎖といった臨床応用を念頭に置いている。しかしながら歯科領域での歯槽骨再生や象牙質再生といった特殊な分野での幹細胞移植療法への応用を検討した報告は現在皆無である。自然界に豊富に存在するキチン・キトサンは、既にその誘導体および化合物が医・工・農学や食品学等の分野において利用価値が高く様々な形態でアジア諸国や欧米をはじめ国内外にて広く研究されている。健康志向、薬剤安全性への関心が極めて高い現在において、平成13年に我が国でもBSE(牛海綿状脳症、いわゆる狂牛病)が確認されて以来、牛や羊などの反芻動物に由来する原料の医薬品類への応用規制はますます強化されている。したがって甲殻類由来の天然有機生理活性素材の医学・医療への応用は今までも増して有用となると考えられる。

## 2. 研究の目的

### 1) 多能性幹細胞増殖の効率化と骨芽細胞および象牙芽細胞への分化誘導の促進化

キトサン添加の有無による Gene Fishing 法とリアルタイム PCR による増幅産物の定量

分析によって、硬組織形成関連遺伝子 (ALP, Osteocalcin, BMP-2, BSP, DSP, DMP-1 等) の同定を行い、キトサン自身の幹細胞に対する硬組織形成賦活効果を証明する。また多孔性担体内部への生着効率を上げるために減圧下 (-100mg) で細胞播種し、Bioreactor を用いて細胞が常に新鮮な培養液と接するようなシステムを構築することによって、骨芽細胞および象牙芽細胞への分化増殖をより促進化できることを実証する。

### 2) Scaffold の幾何学的三次元構造と細胞分化・増殖の検討

キトサン溶液をアンモニアガスで中和させ架橋補強を施した後に凍結乾燥することによってハニカム状凹型構造を有する多孔性担体を作成し、さらに Electrospinning にて表面に直径 50 ~ 500nm のナノファイバーを固着する。この構造により培養細胞の接着や栄養供給・老廃物の排出がスムーズに行われ、内面全体に確実な細胞増殖および基質産生が起こることを分子生物学的および形態学的に証明する。

### 3) 前臨床試験としての動物実験におけるセルデリバリーシステム (細胞移植療法) の確立

骨欠損部や歯髄露出部へキトサン scaffold 上で3次元培養した骨芽細胞および象牙芽細胞を移植し、骨様組織および象牙質様組織新生促進効果について各々の細胞の組織内局在性、分化成熟度および硬組織基質形成度について、免疫組織化学的に証明する。

## 3. 研究の方法

### 1) Scaffold の作製 ; 2%酢酸にて1、2、

4%キトサン（甲陽ケミカル社製 MW 約 10 万、DA85%）溶液を作製し、50°C 2 時間攪拌後 pH7.4 に調整した。その後 24 時間真空脱気を行い、4°C 2 時間、0°C 12 時間、-35°C 24 時間、-80°C 24 時間の冷却スケジュールの後、最終的には凍結乾燥処理を行いスポンジ状に成形した。スポンジ体の表面および内部微細構造は走査型電子顕微鏡にて観察した。またキトサン濃度の違いによるスポンジ体について気孔径および気孔率を比較検討した。

**2) 徐放能について**；スポンジ体の徐放性を検討するため、細胞成長因子として既に許認可されている rh-bFGF 製剤であるフィブラストスプレー（科研製薬社製）をスポンジ体に添加したのち、PBS (pH7.4) に浸漬後の経時的な遊離量を ELISA 法で計測した。また、コラーゲン製スポンジ体を対照とした。最終的には凍結乾燥処理を行いスポンジ状に成形した。

### 3) 機械的特性について；

スポンジ体の機械的特性については、 $\phi 5.0 \times 10.0\text{mm}$  の円柱状のサンプルを作製し、床置型オートグラフ (SHIMADZU 社製 AG-X 50N) にて Load : 20.00N、Stroke : 10.00mm、Time : 120.00sec、Cross Headspeed : 1mm/min の条件で静的引張試験を行い、応力-ひずみ曲線により強度、柔軟性を評価した。

**4) 生体安全性試験**；成形したキトサンスポンジからのエンドトキシン溶出量について測定を行った。すなわちキトサンスポンジを 1 時間浸漬した PBS 緩衝液から検体を採取し、エンドトキシン反応液を添加後マイクロプレートリーダー (CORONA 社製 SH-1000) 内に set した。1 分間攪拌し 37°C 30 分間反応させた場合の吸光度 (405nm) の経時変化率 (m Abs/min) を測定し、標準液から作成した検量線からエンドトキシン含有量 (EU/ml) を

算出した。

**5) 生体埋入試験**；埋入試験には 6 週令 Wistar 系雄性ラットを用いた。腹腔内麻酔を施し下顎骨下縁に沿って皮膚切開を行い、骨膜を剥離し骨面を露出させた後、滅菌済み #1/2 サイズの steel round bur にて低速回転でオトガイ孔下方の骨表面から切歯歯根表面セメント質まで達する直径約 1mm の円筒形骨窩洞を形成した。その後鋭利な探針にて露髄させたうえ、キトサンスポンジ体が歯髄面に接するよう填入し、GIC にて仮封後、骨膜弁を元の位置に戻し皮膚縫合を行った。術後 1、3、5、7 日経過時に各々のラットを麻酔下で灌流固定した後、下顎骨を摘出し、新鮮試料を冷却 2-メチルブタン中でカルボキシメチルセルロースにて包埋後、急速凍結を行った。凍結ミクロトーム (Leica 社製 CM1950) にて厚さ約  $3\mu\text{m}$  の凍結切片を調整後 H-E 染色を行い光学顕微鏡にて生体反応について病理組織観察した。なお、動物実験については、長崎大学先端生命科学支援センター動物実験施設へ実験計画を申請し承認を得た上で実施した。

### 4. 研究成果

気孔径については各濃度とも概ね 100~300  $\mu\text{m}$  となり、形状は連通構造であった (Fig. 1)。

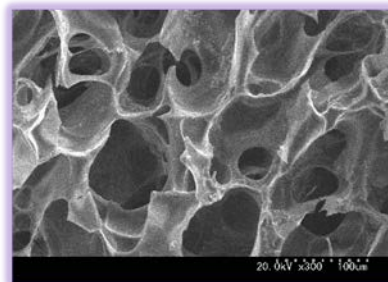
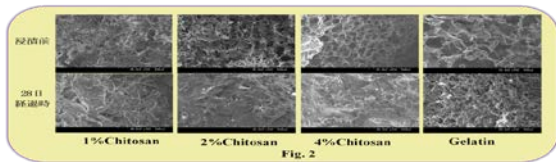


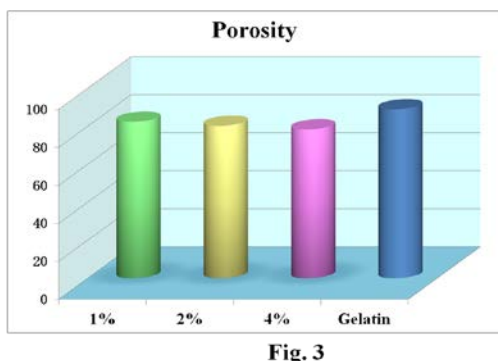
Fig. 1

キトサン溶液濃度が大きくなるにしたがって、Pore size は小さくなり気孔壁の厚さが増大する傾向を示した。また徐放性試験後 (28 日経過時) における各サンプルの形状を

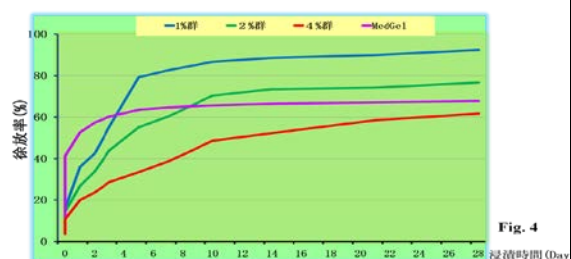
観察したところ、1%キトサン群では気孔形状の崩壊が著明であったが、キトサンの濃度依存的に形態安定性の向上が確認された (Fig. 2)。



気孔率に関しては 75~85%程度となり有意差はみられなかったが、キトサン濃度が大きくなるにしたがい Porosity の減少傾向が認められた (Fig. 3)。



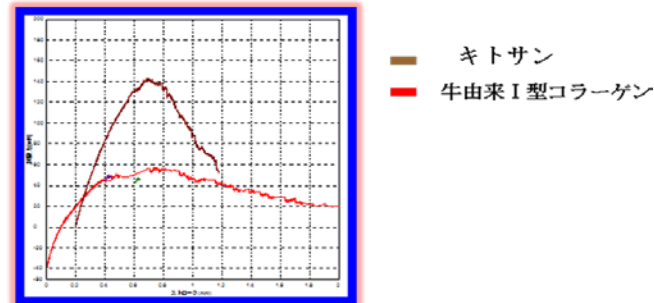
徐放性については、1%キトサン群では浸漬後 1 週間経過時に約 80%が放出され、2%群では 2 週間経過時に 70%が放出され、4%群では 2 週間経過時に 50%が放出され、その後も持続的に遊離された (Fig. 4)。



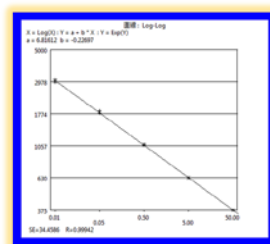
このことよりキトサン濃度が大きくなるにしたがい徐放性が継続される傾向となったが、これはキトサン分子に固定される増殖因子が増加した結果、静電的効果により遊離する時間が延長されたものと示唆された。

機械的特性については、キトサン由来のスポンジは PBS 緩衝液で濡れた状態で、

0.08MPa という引張強度を示し、従来の牛由来 I 型コラーゲンスポンジからなる生体材料 (0.02MPa) に比べより高い引張強度であることが判った。

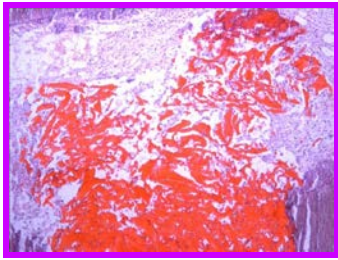


キトサンスポンジ内からのエンドトキシン溶出量の結果については、1%群および4%群が各々0.018、0.012EU/ml となり、いずれも日常の临床上多用されている注射用水の目安規格値である0.25 EU/ml 以下であり、十分安全性が確保できていることが判明した。



動物実験における病理組織反応については、術後 1 日経過時では歯髓組織内に填入されたキトサンスポンジ周囲に好中球を主体とした炎症性細胞浸潤が観察された。術後 3 日経過以降は経時的に炎症反応が軽減していき、術後 7 日目にはキトサンを被包する線維芽細胞様組織が観察されるとともに脈管新生も確認された。この結果より歯髓組織に対してキトサン由来の多孔性担体は生体親和性を有することが示唆された。

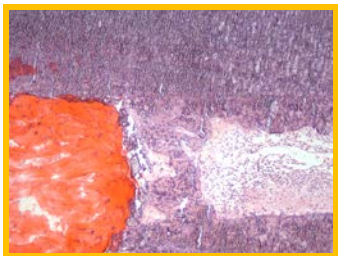




Day 3



Day 7



Day 14

#### 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)

1) A Kawakubo, T Matsunaga, T Ikeda, H Ishizaki, S Yamada, Y Hayashi: Zinc as an essential trace element in the acceleration of matrix vesicles-mediated mineral depositon.

MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE (accept 済み、投稿中 2011年)

2) Kawasaki A, Hayashi Y, Yanagiguchi K, Yamada S, Syudo M, Igawa K, Ikeda T, Kubo S, Fujiwara M: Effect of eluted components from 4-META/MMA-TBB adhesive resin sealer on osteoblastic cell proliferation. Journal of Dental Sciences, (accept 済み、投稿中 2011年)

3) 柳口嘉治郎, 首藤 実, 川崎 綾, 杉本浩司, 池田 毅, 山田志津香, 林 善彦: 根管充填用レジシーラーの生体親和性 日本歯内療法学会雑誌 32, 212-216, 2011 査読有

4) Ishizaki H, Yamada S, Yanagiguchi K, Koyama Z, Ikeda T, Hayashi Y: Pre-treatment with tannic acid inhibits the intracellular IL-8 production by chitosan in a human oral epithelial cell line. Oral Med Pathol 13(4), 135-141, 2009 査読有

5) Syudo M, Yamada S, Yanagiguchi K, Matsunaga T, Hayashi Y: Early gene expression analyzed by a genome microarray and real-time PCR in osteoblasts cultured with a 4-META/MMA-TBB adhesive resin sealer, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 107(3), e77-e81, 2009 査読有

6) Matsunaga T, Ishizaki H, Tanabe S, Hayashi Y: Synchrotron radiation microbeam X-ray fluorescence analysis of zinc concentration in remineralized enamel *in situ*. Archs Oral Biol 54(5), 420-423, 2009 査読有 [学会発表] (計9件)

1) 池田 毅, 池田 香, 石崎秀隆, 柳口嘉治郎, 林 善彦: 組織再生用キトサン由来多孔性担体の特性について; 日本歯科保存学会 2011 年度春季学術大会講演抄録集 p 88 2011.6月.浦安

2) 池田 毅, 山田志津香, 石崎秀隆, 柳口嘉治郎, 林 善彦: 新規歯髄組織再生用 Scaffoldの創製; 第32回日本療法学会学術大会抄録集 p 85 (JEA会長賞受賞) 2011.7.長崎

3) 杉本浩司, 石崎秀隆, 池田 毅, 林 善彦: 低酸素環境下におけるiPS細胞の増殖・挙動; 第32回日本療法学会学術大会抄録集 p 32 2011.7.長崎

4) 山本耕平, 池田 毅, 山田志津香, 林 善彦: 魚コラーゲンの物性・化学的性質; 日本歯科保存学会 2011 年度春季学術大会講演抄録集 p 88 2011.10.大阪

5) Ikeda T, Ikeda K: Growth factor release from chitosan sponge as a scaffold for tissue engineering, Invited lecture at University of The East, Manila, Philippines, July 12, 2010.招待講演

6) 池田 毅, 山田志津香, 石崎秀隆, 池田 香, 林 善彦: Marine Biomaterialを用いた足場材の開発; 長崎障害者支援再生医療研究会, 長崎, 2010年2月 抄録集 p 4 招待講演

7) 川久保敦, 松永常典, 石崎秀隆, 山田志津香, 林 善彦: 必須微量元素亜鉛の基質小胞性石灰化促進効果: 日本歯科保存学会 2010 年度秋季学術大会抄録集, p 64 2010年6月 新潟

8) 池田 毅, 石崎秀隆, 松永常典, 柳口嘉

治郎, 山田 志津香, 林 善彦: キトサンス  
ポンジに添加したbFGFの徐放性に関する研  
究 日本歯科保存学会 2009 年度春季学術大  
会講演抄録集 p 140, 2009 年 6 月 仙台

9) 山田 志津香, 池田 毅, 林 善彦: フィ  
ッシュコラーゲンペプチドによるヒト骨芽  
細胞における石灰化の促進作用 日本歯科  
保存学会 2009 年度春季学術大会講演抄録 p  
138 2009 年 6 月 仙台

[図書] (計 1 件)

T Ikeda, Y Hayashi: Application of chitosan  
oligosaccharide and glucosamine in dentistry. In  
*Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their  
Derivatives: Biological Activities and  
Applications*, ed. Se-Kwon Kim, CRC Press-  
Taylor & Francis Group, 447-460, 2010 (著書)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 毅 (IKEDA TAKESHI)  
長崎大学・病院・講師  
研究者番号: **90244079**

### (2) 研究分担者

山田 志津香 (YAMADA SHIZUKA)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 00363458

池田 香 (IKEDA KAHORI)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 20578330

### (2) 連携研究者

なし