

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 15 日現在

機関番号：32612  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21592501  
 研究課題名(和文) 間葉系幹細胞 光硬化型ゼラチン複合体を用いた新規組織再生療法の確立  
 研究課題名(英文) Mesenchymal stem cells photocurable gelatin based gelation material for application to periodontal regeneration  
 研究代表者  
 中川 種昭 (NAKAGAWA TANEAKI)  
 慶應義塾大学・医学部・教授  
 研究者番号：00227745

研究成果の概要(和文): 従来法(骨髄細胞付着培養分離法)に比べ約 120,000 倍の効率でマウス MSCs を直接精製する方法を確立した。さらに特に、骨髄 MSCs においてその一部が神経堤由来であることを突き止めた。また、これら純化した MSCs は近年報告されて再生医療への応用が期待されている人工多能性幹細胞(Induced pluripotent stem cells ; iPS cells)になりやすいということも明らかにした。光硬化性ゼラチンは低分子量化体に改良したことで硬化前は室温下においても適度な粘性を有し、操作性が向上したことにより様々な骨欠損状態に合わせた形態が容易に付与可能と考えられ、光硬化によって要求される機械的強度で形状は保持可能となった。

研究成果の概要(英文): We confirmed that prospective isolated MSCs showed a 120,000-fold higher colony forming frequency than the conventional MSCs. Furthermore, Our results suggested that MSCs in adult bone marrow have at least two developmental origins, one of which is the neural crest. Furthermore, prospectively enriched MSCs are a promising candidate for the efficient generation of high-quality iPS cells. This photocurable solution also has adequate viscosity at room temperature before curing, and its manipulation is enhanced. It is assumed that forms suitable for various bone defects will thus be easily rendered, and it is also assumed that the shape can be retained with the mechanical strength required by photocurable.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯学

(1)再生医療の分野では、骨髄中の間葉系幹細胞が脂肪、骨、軟骨などさまざまな間質細胞への分化能を持つとされていることから、本人由来幹細胞ソースとして注目を浴びている。

(2)失われた歯周組織の再構築のために現在までに組織再生誘導療法そしてエムドゲイン療法といった歯周組織再生に対するアプローチが数多く報告されている。しかし、これらの有効性に関しては、必ずしも満足できるものではなく、GTRは欠損部にメンブレンを設置することが困難であり、術者の熟練を要することや、メンブレンの露出による感染の可能性もある。また、エムドゲイン療法は使用法が簡便であるが、ゲルのため骨欠損内に停滞させることが困難であるといった臨床上解決されるべき課題点も多い。

## 2. 研究の目的

(1)フローサイトメトリーにて分離したヒトMSCsに対してもマウス以上にMSCs特異的な抗原の組み合わせを見つけ組織再生能力の高い細胞を選択的に増し、さらに神経幹細胞の選択的培養法で神経提系および間葉系細胞への分化能を確認していく。

(2)われわれは簡便にかつ歯周組織の再生スペースを確保できる新しい担体の開発が必要であると考え、足場の開発を試み、操作性が良く、再生の場を保つための賦形が容易に行え、組織吸収性である可視光硬化型ゼラチンを開発した。また足場内での細胞の移動、増殖、望ましい細胞への分化のために生理活性物質が重要であるが、その有望な因子として申請者らも臨床試験に参加して良好な結果を得ているb-FGFの適用が考えられる。臨床応用を考えると、現在一般的に行われている血清添加培養法では、たとえそれがヒト血清であっても、それらの中のどの成長因子が歯周組織再生に有効であるのかは明らか

ではない。b-FGFに加え、さまざまなりコンビナントの成長因子を用いて最も歯周組織再生に理想的な組み合わせを見つけ出そうと考えている。

## 3. 研究の方法

(1)頭頸部口腔領域は非常に様々な組織が複雑に絡み合って形成されているため、まず発生学的起源幹細胞からそれぞれの組織へ確実に分化させる方法を確立していかなければ最終的に再生させた組織を機能させることは困難である。そこでまずフローサイトメトリーを用いて直接骨髄から分離してきたマウスおよびヒトMSCsが筋・骨格だけではなくセメント質・歯根膜・歯槽骨などの組織を確実に誘導させる分化方法を検討する。

### (2)光硬化性ゼラチンの改良

今後の歯周組織再生療法での足場としての条件として

欠損部に適合するための自在な賦形性(粘性) その状態を保つための物理的強度 材料の操作性 生体における吸収性とその速度 生体親和性 含浸した成長因子などを一定期間にわたって適度に放出し続ける物質除放性 細胞増殖としての細胞接着性があげられる。これらすべての条件を満たす材料を作成することが要求されるが現在作成したエオシン化ゼラチンは賦形性、物理的強度、細胞毒性がないといった要求は満たしているが、ゲル調整においてやや粘度が高く室温での取扱いが困難である。また、細胞を移植する際には十分な量の細胞をできるだけダメージを与えずに欠損部位に適用することが必要である。そこで、室温においても操作可能な水溶液であり、細胞が本来の機能を営むだけの環境で増殖・分化していける足場を目指して光硬化性ゼラチンの改良を行う。

#### 4 . 研究成果

われわれはこれまでに、マウス骨髄由来間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells ; MSCs) に対して特異的な抗原の組み合わせを300種類もの細胞表面抗原をスクリーニングした。さらに、これらを指標従来法 (骨髄細胞附着培養分離法) に比べ約120,000倍の効率でマウスMSCsを直接精製する方法を確立した (Morikawa, S et al: J Exp Med, 206(11): 2483-2496, 2009)。さらに特に、骨髄MSCsにおいてその一部が神経堤由来であることを突き止めた (Biochem Biophys Res Commun, 379(4): 1114-1119, 2009)。ヒトMSCsに対してもマウス以上にMSCs特異的な抗原の組み合わせを見つけ出すことに成功し、組織再生能力の高い細胞を選択的に増やすことができるようになりつつある (論文投稿中)。また、光硬化性ゼラチンは、低分子量化体に改良したことで硬化前は室温下においても適度な粘性を有し、操作性が向上したことにより様々な骨欠損状態に合わせた形態が容易に付与可能と考えられ、光硬化によって要求される機械的強度で形状は保持可能となった。

平成23年度は歯周病にて欠損した歯槽骨・歯根膜・セメント質組織を再生させる新たな再生療法の確立を目指し、高純度マウス及びヒトMSCsからの各歯周組織構成細胞の分化誘導実験を試みた。高純度MSCsは現在報告されている従来法によって分離されるMSCsに比較して骨・軟骨・脂肪への分化能は格段に高いことがわかった。しかしながら、歯周組織構成細胞である歯根膜細胞やセメント質への分化誘導が困難であることから、新たな分化誘導方法を探索する必要がある。マウス、ヒト間葉系幹細胞を純化し、それが非常に骨分化誘導に適している幹細胞であることは確認でした。しかし歯周病によって失われた

組織を完全に再生させるためには歯槽骨だけでなく、セメント質や歯根膜組織への分化誘導も必要である。現在、骨分化ほど効率的な分化が認められないため、これらの細胞への最適な分化誘導方法を検討していく予定である。また最終年度の成果としてマウスMSCsが、近年報告されて再生医療への応用が期待されている人工多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cells ; iPS cells) になりやすいということを明らかにした。今後はMSCsの歯周組織構成細胞への分化誘導方法の検討に加え、iPS細胞から歯周組織構成細胞への分化誘導方法やiPS細胞から歯周組織の発生学的起源である神経堤細胞に分化させた後、歯周組織構成細胞への分化誘導法も検討する予定である。

#### 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 7 件)

1. Antibacterial activity of povidone-iodine against an artificial biofilm of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. Yasuo Hosaka, Atsushi Saito, Ryo Maeda, Chie Fukaya, Satoru Morikawa, Asako Makino, Kazuyuki Ishihara, Taneaki Nakagawa. Archives of Oral Biology; 57(4) 364-368, 2011. 査読あり.
2. Purified Mesenchymal Stem Cells Are an Efficient Source for iPS Cell Induction. Kunimichi Niibe, Yoshimi Kawamura, Daisuke Araki, Satoru Morikawa, Kyoko Miura, Sadafumi Suzuki, Shigeto Shimmura, Takehiko Sunabori, Yo Mabuchi, Yasuo Nagai, Taneaki Nakagawa, Hideyuki Okano,

- Yumi Matsuzaki. PLoS ONE; 6(3) e17610, 2011. 査読あり.
3. Mesp1+ early paraxial mesodermal cells supply initial bone marrow mesenchymal stem cells capable of differentiating into neural crest lineage cells. Kunimichi Niibe, Satoru Morikawa, Yo Mabuchi, Taneaki Nakagawa, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki. Inflammation and Regeneration Jan; 31(1): 116-124, 2011. 査読あり.
  4. Anti-IL-6-receptor antibody promotes repair of spinal cord injury by inducing microglia-dominant inflammation. Masahiko Mukaino, Masaya Nakamura, Osamu Yamada, Seiji Okada, Satoru Morikawa, Francois Renault-Mihara, Akio Iwanami, Takeshi Ikegami, Yoshiyuki Ohsugi, Osahiko Tsuji, Hiroyuki Katoh, Yumi Matsuzaki, Yoshiaki Toyama, Meigen Liu, and Hideyuki Okano. Experimental Neurology Aug; 224(2) 403-414, 2010. 査読あり.
  5. Inhibition of Abcg2 transporter on primitive hematopoietic stem cells by All-trans retinoic acid increases sensitivity to anthracycline. Lawrence Lein, Yasuo Nagai, Yo Mabuchi, Sadafumi Suzuki, Satoru Morikawa, and Yumi Matsuzaki. Inflammation and Regeneration Jan; 30(2): 55-62, 2010. 査読あり.
  6. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. Satoru Morikawa, Yo Mabuchi, Yoshiaki Kubota, Yasuo Nagai, Kunimichi Niibe, Emi Hiratsu, Sadafumi Suzuki, Chikako Miyauchi-Hara, Narihito Nagoshi, Takehiko Sunabori, Shigeto Shimmura, Atsushi Miyawaki, Taneaki Nakagawa, Toshio Suda, Hideyuki Okano, and Yumi Matsuzaki. The Journal of Experimental Medicine Oct 26; 206(11) 2483-2496, 2009. 査読あり.
  7. Improvement of Hydrogelation Abilities and Handling of Photocurable Gelatin-based Crosslinking Materials. Chie Fukaya, Yasuhide Nakayama, Yoshinobu Murayama, Sadao Omata, Ayaka Ishikawa, Yasuo Hosaka, Taneaki Nakagawa. Journal of Biomedical Materials Research. Oct; 91(1):329-36, 2009. 査読あり.
- [学会発表](計6件)
1. 森川暁, 新部邦透, 深谷千絵, 穂坂康朗, 中川種昭: ヒト間葉系幹細胞の予期的分離と Clonal 解析. 第 53 回日本歯周病学会春季学術大会, 盛岡, 2010, 5.14, 15 (口頭)
  2. Satoru Morikawa, Yo Mabuchi, Yoshiaki Kubota, Kunimichi Niibe, Narihito Nagoshi, Shigeto Shimmura, Taneaki Nakagawa, Toshio Suda, Hideyuki Okano, and Yumi Matsuzaki. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of

multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. 第9回日本再生医療学会総会 Young Investigator's Award 「(和名)若手研究奨励賞」受賞者講演, 広島, 2010, 3.18, 19

3. Yo Mabuchi, Satoru Morikawa, Hideyuki Okano, Yumi Matsuzaki: Flow cytometric isolation and clonal identification of mesenchymal stem cells in human bone marrow. International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 7<sup>th</sup> ANNUAL MEETING. July 8-11, 2009, Barcelona (ポスター)
4. 森川暁, 深谷千絵, 穂坂康朗, 中川種昭: 間葉系幹細胞の一部は神経堤から発生する. 第52回日本歯周病学会春季学術大会, 岡山, 2009, 5. 15, 16(口頭)
5. 馬淵洋、森川暁、岡野栄之、松崎有未: Isolation and Identification of Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow. 第7回幹細胞シンポジウム, 東京, 2009, 5.15, 16 (ポスター)
6. S.MORIKAWA, C.FUKAYA, and T.NAKAGAWA: Prospective Isolation of Mesenchymal Stem Cells. 87<sup>th</sup> General Session and Exhibition of the IADR (International Association for Dental Research), Miami, Florida, USA, April 1-4, 2009. (ポスター)

〔図書〕(計0件)

〔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  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

中川 種昭 (NAKAGAWA TANEAKI)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号: 00227745

##### (2)研究分担者

森川 暁 (MORIKAWA SATORU)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 00424169

穂坂 康朗 (HOSAKA YASUO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 30246350