

## 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 3 月 31 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592630

研究課題名（和文） 硬組織誘導複合体と骨髄間葉系幹細胞三次元培養による再生治療法の開発

研究課題名（英文） Study on novel tissue regenerative therapy using bone marrow-derived mesenchymal stem cells and FGF/Phosphophoryn/Collagen complex

研究代表者

藤井 健男（FUJII TAKEO）

松本歯科大学・歯学部附属病院・臨床教授

研究者番号：30173389

研究成果の概要（和文）：

重度歯周炎によって垂直的・水平的骨欠損を伴う破壊された歯周組織の広範囲な再生を目指す歯周組織再生治療法を確立するために、骨髄間葉系幹細胞培養系を利用する新しい硬組織誘導性複合体型生体素材の開発研究を行った。本研究において、骨髄間葉系幹細胞は FGF/ホスホリン添加コラーゲン 3 次元ゲル細胞培養系において、高い増殖動態と ALP 活性および Ca 量の増加を示した。今回の結果から、組織再生量を制御することが可能なコラーゲンゲル 3 次元培養内で、細胞増殖を助長する線維芽細胞成長因子（FGF）、ならびに石灰化誘導性を担保するリン酸基供給源としてのホスホリンを応用することで、高度な歯周組織破壊による広範囲な歯槽骨吸収を伴う重度歯周病に対する組織再生治療へ展開が期待できる、新しい硬組織誘導性複合体型の生体素材の開発に向けた研究成果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

With the goal to establish new tissue regenerative therapy for extensive regeneration of destroyed periodontal tissues accompanying vertical or horizontal bone defects due to severe periodontitis, The aim of this study was to evaluate the kinetics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured in a FGF-collagen complex as a regenerative scaffold in vitro. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells showed good growth in the collagen gel culture. The effect of FGF in promoting cell growth is exhibited at the early stage of culture, and the ALP activity has already passed the peak when assayed at 14 days of culture at FGF concentrations of 10 ng/ml. The ALP activity showed in the presence of phosphophoryn in a dose-dependent manner at 14 days of culture. A marked difference in calcium content was not observed. The present study sheds light on the development of an optimal biomaterial that forms the basis of calcified hard tissue formation, suggesting the feasibility of applying the 3-D collagen gel cell culture system for the construction of a scaffold that controls the amount of regenerating tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,193	450,000	1,950,193
2010 年度	1,000,102	300,000	1,300,102
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,295	1,050,000	4,550,295

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・歯周治療系歯学

キーワード： 歯周外科学・再生治療

## 1. 研究開始当初の背景

現在、行われている歯周組織再生治療は、再生歯槽骨・再生セメント質による歯周組織の三次元的再生を可能にする足場(scaffold)の構築に脆弱性があるため、水平性骨欠損を含む広範囲な歯周組織再生を目指す、安全かつ信頼性の高い再生治療法の要件を十分に満たしていないのが現状である。

本研究の基本的なコンセプトは、以下に示す。

(1) 再生歯周組織の三次元的構築のための恒常的足場(scaffold)として、石灰化誘導活性を有するホスホホリンと生体親和性を示すコラーゲンとの複合体を提供する。

(2) 歯周組織を構成する細胞の三次元配置を行うための細胞増殖を統御する bFGF を応用したホスホホリン/コラーゲン複合体型生体素材を活用する。

iii) 骨髄間葉系幹細胞培養系を利用する石灰化誘導性複合体型生体素材を開発し、安全かつ確実性の高い新しい組織再生医療を目指す。

## 2. 研究の目的

重度歯周炎によって垂直的・水平的骨欠損を伴う破壊された歯周組織の広範囲な再生を目指す歯周組織再生治療法を確立するために、新機軸のコラーゲン三次元ゲル骨髄間葉系幹細胞培養系に FGF およびホスホホリンを応用する硬組織誘導性生体素材を開発し、本複合体における骨髄間葉系幹細胞の動態を細胞生物学的解析から評価し、骨髄間葉系幹細胞培養系を利用する新しい硬組織誘導性複合体型生体素材の開発研究を行い、その臨床応用への可能性を探求することである。

本研究では、コラーゲンゲル 3 次元細胞培養におけるホスホホリンの影響について検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料

#### ①被験物質

basic FGF (以下 FGF; 科研製薬(株), Lot. No. 80HCC) 原液 (10 mg/mL) を蒸留水にて、100, 1000, 10000 倍希釈して増殖培地に 0.1 v/v% 添加した(終濃度: 100, 10 および 1 ng/mL)。

ホスホホリン (以下 PH)、を培地で希釈後フィルター滅菌して使用した。(終濃度は、100, 10 および 1  $\mu$ g/mL)

#### ②使用細胞

マウス骨髄細胞培養キット (株)プライマリーセル: Lot. No. HF3B-1; BMC02)) を用いた。

#### ③使用培地

i) 増殖培地: マウス骨髄細胞培養用メディアウム (以下メディアウム; 株)プライマリーセル Lot. No. 080627) を用い、デキサメサゾン

を  $10^{-7}$  M、 $\beta$  グリセロホスフェイトを 1 mM、さらにメディアウムに bFGF (科研製薬) を 10 ng/mL 添加して増殖培地とした。

ii) 分化培地: 増殖培地にメディアウムにデキサメサゾン (Dexamethasone, minimum 98% HPLC: SIGMA) 100 nM、 $\beta$  グリセロリン酸 ( $\beta$ -GLYCEROPHOSPHATE Disodium Salt Hydrate: SIGMA) を 1 mM、アスコルビン酸を 172.7  $\mu$ M (50  $\mu$ g/mL) 添加したものを分化培地とした。

#### ④DNA の定量

DNA 定量キット (株)プライマリーセル: Lot No. HDP) を使用した。

#### ⑤カルシウム量の定量

カルシウム E-テストワコー (和光純薬工業(株): 437-58201) を使用した。

#### ⑥ALP 活性の測定

ラボアッセイ ALP (和光純薬工業(株): 291-58601) を使用した。

#### ⑦7 培地添加成分

i) L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物 (和光純薬工業(株): Lot No. LTH7700)

ii) Dexamethasone, minimum 98% HPLC (SIGMA: Lot No. 096K1805)

iii)  $\beta$ -GLYCEROPHOSPHATE Disodium Salt Hydrate (SIGMA: Lot No. 85H5718)

iv) コラーゲン溶液 (KOKEN CELLGEN 酸性溶液 I-PC: Lot. No. 118064)

### (2) 三次元コラーゲンゲル細胞培養

#### ①細胞播種

培養器 (24 穴プレート) にあらかじめ 0.25 mL のコラーゲンゲルを作成し、さらにマウス骨髄細胞を細胞密度  $1.0 \times 10^5$  cells/well を含むコラーゲンゲル溶液 0.25 mL を重層して 2 層培養とした。1 時間程度 5%CO<sub>2</sub>、37°C のインキュベータ内でゲル化するまで静置してゲル化を確認した後、増殖培地を 37°C に温めて 0.5 mL ずつ静かに添加した。

#### ②培養方法

マウス初代骨髄細胞は 7 日間増殖培地にて予備培養を行った。予備培養後 (播種後 7 日目) にホスホホリンを 0、1、10、100  $\mu$ g/mL に調製した分化培地に交換した。培地交換は 1 週間に 2 回の頻度で行い、培養上清を回収しながら被験物質を規定濃度に調製した新鮮な分化培地に交換した。

培地交換日は、培養液を回収した後新しい培地を加え、0w、1w、2w (最終日) は PBS (-) で 2 回洗浄し、細胞層を回収後、超音波破碎を行って遠心分離 (12,000 rpm、4°C、5 分間) し、上清 (0.5 mL) から ALP および DNA を定量、沈殿に 0.2N HCl を 0.3 mL 加えて Ca の定量を行った。

#### ③各項目定量

回収した細胞を超音波破碎 (30 秒間) し、

遠心分離 (10,000 rpm, 4°C, 5 分間) にかけて上清を回収した。回収した上清は、ALP 活性測定をキットの取扱説明書に従って行なった。また、沈渣は 0.2N の HCl 300  $\mu$ L を加えピペティングし、Ca 濃度測定及び DNA の定量を行なった。

#### ④形態観察

実験期間中の形態観察は、被験物質添加日 (0w; 培養 7 日) から 1 週目 (1w; 培養 14 日) および 2 週目 (2w ; 培養 21 日) に写真撮影を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) DNA 量

ホスホホリン PH10  $\mu$ g 以下の添加 1 週および 2 週までの各濃度群において、コントロール群と比較して大きな差を認めなかった。PH100  $\mu$ g 添加群 (培養 2 週) では、他群と比較して約 2 倍の有意な DNA 量の増加を認めた (図 1)。

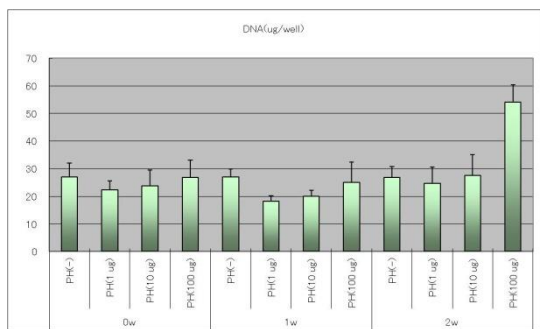


図 1. DNA 量の比較

#### (2) ALP 活性

培養 1 週、2 週における ALP 活性は、ホスホホリン添加 10ng をピークに持つ濃度依存性を認め、100ng 群では抑制された。またホスホホリン添加後の培養 2 週目の ALP 活性は、全濃度群で培養 1 週と比較して、ALP 活性は低下した (図 2)。

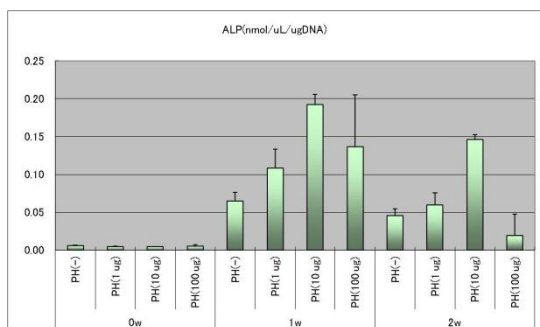


図 2. ALP 活性の各群間の比較

#### (3) Ca 濃度

ホスホホリン添加培養 1 週後、各濃度の群において Ca 量は、コントロール群より低い値を示した。培養 2 週では、ホスホホリン添加 1ng 群、10ng 群は、コントロール群同様に高い値を示したが、100ng 群はコントロール

群と比較して、有意に低い値を示した (図 3)。

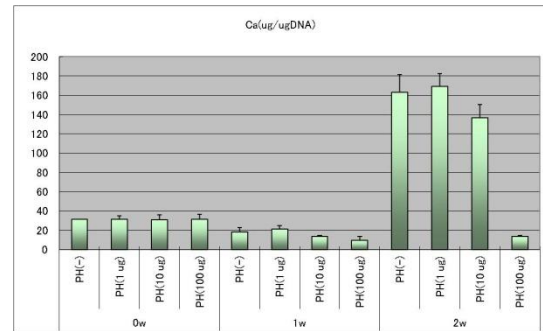


図 3. Ca 量の各群間の比較

#### (4) 形態観察

##### ①ホスホホリン添加培養 1 週

ホスホホリン添加培養 1 週目において、各濃度添加群は、コントロール群と比較して、濃度依存的な白濁蛍光を認めた (図 4)。

##### ②ホスホホリン添加培養 3 週

培養 2 週において各ホスホホリン添加濃度群とコントロール群には著明な差異は認められず、いずれの条件下でも同様の白濁傾向を認めた (図 4)。

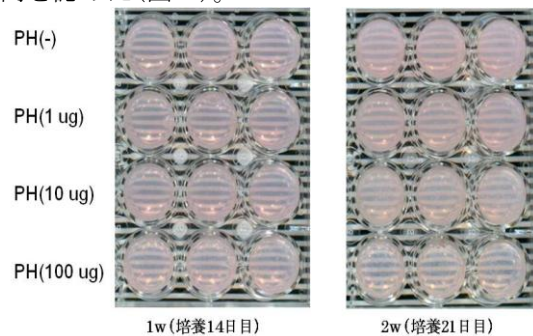


図 4. ホスホホリン添加培養 1 週および 2 週

#### (5) 考察

重度歯周炎によって垂直的・水平的骨欠損を伴う、破壊された歯周組織の広範囲な再生を目標とする、新しい歯周組織再生治療法を確立するために、骨髄間葉系幹細胞培養系を応用する新規硬組織誘導性複合体型生体素材の開発研究を行った。

FGF/ホスホホリン添加コラーゲン 3 次元ゲル細胞培養系において、骨髄間葉系幹細胞は十分な増殖を示し、3 次元コラーゲンゲル培養系は、石灰化硬組織再生量を制御することが可能な硬組織誘導型 scaffold であることが示唆された。

コラーゲン 3 次元ゲルにおける FGF/ホスホホリン添加培養群の DNA 量は、コントロール群と差は認められず、骨髄間葉系幹細胞の増殖を十分保持することが可能であった。特にホスホホリン 100ng 添加培養群の 2 週では DNA 量の増加が認められ、細胞増殖が優位に進んだことが示された。

コラーゲン 3 次元ゲル内の骨髄間葉系幹細胞の ALP 活性は、ホスホホリン添加 10ng を

ピークを持つ濃度依存性を認め、100ng 群では抑制された。培養2週のALP活性は、全濃度群で培養1週と比較して、ALP活性は低下を示したことから、ホスホホリン添加1週以降は三次元培養ゲル内における石灰化傾向が強くシフトする培養環境が確保されるものと考えられた。

培養後の石灰化指標としてのウェル内におけるCa量は、ホスホホリン添加培養2週において、ホスホホリン添加1ng群、10ng群はコントロール群同様の高い値を示したが、100ng群はコントロール群と比較して有意に低い値を示した。培養2週の時点で、ホスホホリン添加100ng群のALP活性およびCa量は他群と比較して有意に低い値であったが、DNA量は高い値を示し、培養2週においても細胞増殖が活発に行われていることが示唆された。現時点では、ホスホホリンの細胞増殖に及ぼす影響について十分な情報が得られておらず、今後は石灰化誘導性を担保するリン酸基供給源としてのホスホホリンの役割をさらに探索する予定である。

本研究において、石灰化硬組織再生量の制御を可能とする骨髄間葉系幹細胞コーラゲンゲル3次元培養において、細胞増殖を助長する線維芽細胞成長因子(FGF)、ならびに石灰化誘導性を担保するリン酸基供給源としてのホスホホリンを応用することで、高度な歯周組織破壊による広範囲な歯槽骨吸収を伴う重度歯周病に対する組織再生治療へ展開が展開が期待できる、新しい硬組織誘導性複合体型の生体素材の開発に向けた成果を得ることができた。

## 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 2 件)

- ① 北村正博、古市保志、藤井健男、川浪雅光、国松和司、島内英俊、山田 了、小方頼昌、和泉雄一、伊藤公一、中川種昭、新井 高、山崎和久、吉江弘正、野口俊英、渋谷俊昭、高柴正悟、栗原英見、永田俊彦、横田 誠、前田勝正、廣藤卓雄、坂上竜資、原 宣興、野口和行、小笠原健文、村上伸也. 歯周炎罹患歯に対するFGF-2投与の長期的効果および安全性の検討. 日歯周誌. 査読有 54: 38-45, 2012.
- ② Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofuji T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Kido J, Nagata T, Kurihara H, Takashiba S, Sibutani T, Fukuda M, Noguchi T, Yamazaki K, Yoshie H, Irooi K, Arai T, Nakagawa T, Ito K, Oda S, Izumi Y, Ogata Y, Yamada S, Shimauchi H, Kunitatsu K, K

awanami M, Fujii T, Furuichi Y, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Omae M, Yamada S, Watanuki M, Murakami FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of multicenter randomized clinical trial. J Dent Res. 査読有 90(1) 35-40, 2011.

[学会発表] (計 3 件)

- ① T.Fujii, T.Saito, A.Yamaguchi, K.Shimizu, T.Taira. Study on novel tissue regenerative therapy using bone marrow-derived mesenchymal stem cells and FGF/collagen complex.. The 3<sup>rd</sup> Joint Meeting of ECTS & IBMS. 7 May, 2011. Athens, Greece.
- ② T.Fujii, Y.Terada, M.Akamatsu, M.Watanuki- Periodontal Tissue Regeneration by the Application of FGF-2 in Patients. 37<sup>th</sup> European Symposium on Calcified Tissues. 21 June, 2010. Glasgow, Scotland.
- ③ T.Fujii, Y.Terada, Y.Konishi, H.Tsuji, J.Sato, Periodontal Tissue Regeneration by the Application of FGF-2 in Periodontitis Patients. Europerio 6. 4 June 2009. Stockholm, Sweden.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井 健男 (FUJII TAKEO)

松本歯科大学・歯学部附属病院・臨床教授  
研究者番号：30173389

### (2) 研究分担者

齋藤 隆史 (SAITO TAKASHI)

北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：40265070

安彦 善裕 (ABIKO YOSHIHIRO)

北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：90260819

齋藤 正人 (SAITO MASATO)

北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：50337036