

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792267

研究課題名(和文) 培養細胞シートとナノコーティングスキャホールドによる歯周組織再生

研究課題名(英文) Development of cultured cell sheet and nano-coating scaffold for periodontal regeneration

研究代表者

下地 伸司 (SHIMOJI, Shinji)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30431373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、(1)培養骨髄細胞シート作製方法の確立、(2)培養細胞シート、成長因子FGF-2およびコラーゲンスキャホールドの併用による骨増生の有効性について検討を行った。その結果、(1)F344/Jclラット大腿骨から採取した骨髄細胞を用いて多層の骨髄細胞シートを作製できた。また培養期間を延長することでシートの強度が増加した。(2)ラット頭蓋骨に培養骨髄細胞シートとFGF-2およびコラーゲンスキャホールドを用いることで大量の新生骨が認められた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was determine: (1) the novel method of cultured cell sheet using bone marrow cell from F344/Jcl rats' femur; (2) the effectiveness of the cultured bone marrow cell sheet, FGF-2 and collagen sponge scaffold on bone regeneration of rats' calvariae.

The results were as follows: (1) the multilayered osteoblast-like cell sheet was produced by this novel method. The proper culture term made this cell sheet more rigid; (2) the complex of cultured bone marrow cell sheet, FGF-2 and collagen sponge scaffold made large amount of new bone on rats' calvariae.

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

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：歯周組織再生 培養骨髄細胞シート コラーゲンスキャホールド

1. 研究開始当初の背景

歯周組織再生療法は臨床応用されているが、細胞の足場の乏しい水平性や一壁性骨欠損には効果が少ない。歯槽骨のみの増生は可能になっているが、歯周組織全体の再生は未だ困難であり、新しいコンセプトを持った再生療法の開発が求められている。そこで、申請者はセメント質、歯根膜、歯槽骨再生に必要な細胞をそれぞれ選択的に大量に供給する方法、そしてその細胞を効果的に増殖させる新しい足場(スキャホールド)が必要と考えた。

まず細胞供給のためには培養細胞シートを用いることを考えた。細胞をシート状にすることで大量の細胞を再生の場に移植維持することが可能で、同時に接着因子や細胞外マトリクスも移植されるため、組織の再構築に非常に有利になる。用いる細胞シートは移植後速やかに周囲の組織に接着するという性質を有するため、担体の表面に付着させることが可能である。そこで歯周組織再生のために、歯根には歯根膜細胞シート、歯槽骨には骨髄細胞シートが接するようにスキャホールド表面にそれぞれ付着させ、歯周組織欠損部に埋植することを考えた。この方法により歯槽骨のみならず歯周組織全体が再生すると考えられる。

次に足場のために、ナノ技術の歯科応用を検討し、リン酸カルシウムをナノ粒子化し(nTCP)、スポンジ型コラーゲンスキャホールド(FC-HAC)をコーティングする手法を当教室は確立した。これにより機械的強度が増すだけでなく、骨基質の成分であるTCPを用いることで骨再生効果が期待できる。さらにnTCPは増殖因子などのタンパク質を結合させることが可能で、新しいドラッグデリバリーシステムとして研究が行われており、応用部位での増殖因子のコントロールリリースができる可能性がある。骨芽細胞の増殖を促進させる線維芽細胞増殖因子(FGF-2)をnTCPと結合させてスキャホールドにコーティングすることで強力に骨増生を促進させる可能性がある。

FC-HACスポンジは申請者が以前から研究を続けており、骨髄穿孔と併用すること(骨髄一体型スキャホールド)で多くの骨増生が生じることを明らかにした。更にスポンジ内には早期に血管新生が多く生じるという特性を発表している。早期の血管網構築は再生療法では重要な役割を果たすが、骨髄穿孔のみでは細胞供給量が少ないため、骨増生量が限られる事やスポンジの機械的強度が弱くスペースメイキングの効果が乏しい事が課題として残った。以上のように骨髄穿孔を併用したFGF-nTCPコーティングスキャホールドは細胞シートの効果を促進させることが可能で、複合することにより双方の問題点を解決し、大幅な歯周組織再生が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は細胞シート工学的手法により作製した骨髄/歯根膜細胞シートをスキャホールド外側に設置することで大量の細胞を選択的に供給する新しい歯周組織再生療法を開発することである。

本研究では、ナノリン酸カルシウム(nTCP)でコラーゲンスキャホールドをコーティングした新規に開発されたナノコーティングスキャホールドを細胞シートと併用することで大幅な歯周組織再生が期待できる。また特別な装置を必要としない簡便な細胞シートは歯周組織のみならず、他分野の再生療法にも応用できると思われる。

このようなコンセプトの再生療法は国内外でもみられず、この治療法はどのような欠損形態の歯周組織欠損にも応用できることから臨床応用の場が広い。また本研究での知見がナノ技術や細胞シート工学にフィードバックされることで医療全般の発展にも貢献できると考えている。

3. 研究の方法

実験動物：F344/Jcl ラット

(1) 培養骨髄/歯根膜細胞シートの作製

・骨髄細胞シート：ラットの大腿骨を摘出し、骨髄を採取。骨髄由来の付着性細胞を10%FBS、1%抗生物質添加MEMにて培養。その後ディッシュに播種してさらに培養を行い、7、9、11日目に追加播種することで多層骨髄細胞シートを作製する。7日目に追加播種してからは培地を10%FBS、1%抗生物質添加MEMにアスコルビン酸、グリセロリン酸、デキサメタゾンを追加したものに変更。培養14日後にトリプシン-EDTAで処理しディッシュから剥離し細胞シートを完成させる。

・歯根膜細胞シート：ラットの歯牙を摘出し、歯根膜組織を採取。アウトグロース法にて歯根膜細胞を採取、継代培養し得られた細胞を播種し、培養。コンフルエントになった時点で追加播種し多層歯根膜細胞シートを作製。その後ディッシュから剥離し細胞シートを完成させる。

(2) FGF-nTCP スキャホールドの作製

FC-HACスポンジを4×4×3mmの大きさにトリミングする。ナノサイズリン酸カルシウム(nTCP)を5~100nmほどの粒径に分散化後、FGF-2と結合させFC-HACスポンジのコーティング処理を行う。それぞれnTCPは0.1、1wt%、FGF-2は0、3、15µg/個の含有量とする。

(3) 試料作製およびラットへの埋植

FGF-nTCPスキャホールドを4×4×3mmに成形。2種の細胞シートをスキャホールド外側に付着させる。次にそのスキャホールドを歯牙から作製した象牙質片にナイロン糸にて両端を縫合する。全身および局所麻酔下でラット頭蓋部を切開し、頭蓋骨を露出させ、直径5mmの骨窩洞を形成後、各群のスポンジを窩洞内に埋植する。

(4) 評価方法

観察期間は5日、2、4週とし、脱灰薄切標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン重染色を行う。5日では細胞のスポンジ内への侵入状態を観察し、その後組織学的計測を行う。計測項目は、新生骨面積、残存スポンジ面積等とする。また骨マーカーであるALP等の免疫染色を同時に行い、骨形成に関する細胞動態を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 培養骨髄/歯根膜細胞シートについて

培養骨髄細胞シートについては、当初の計画通りのF344/Jclラット(5週齢)の大腿骨から採取した骨髄細胞を用いる手法で作製が可能であったが、培養歯根膜細胞シートについては安定した供給が得られなかった。骨髄細胞に比べて歯根膜細胞は絶対数が少なく発育に時間がかかることは予想されたが、全く成長しないことがしばしば認められ、本方法では十分な細胞供給が行えない可能性が示唆された。

一方、培養骨髄細胞シートでは多層構造が観察され、ALP酵素組織を用いた評価では骨芽細胞への分化が確認されたため、骨再生のための有効な細胞シートの作製が可能となったと言える。また、当初計画していた培養期間よりも約一週間培養期間を延長させた場合により強固なシート状になることが示唆された。また、更に1週間以上延長させた際にはシート形態を留めないことがあった。従来はやや脆いことが欠点であったが、適切な培養期間を解明することにより、その点を改良することが可能となった。

(2) 培養細胞シートの担体としての新規スキャホルドの有効性について

本研究で用いたスキャホルドを培養に用いた培地内に浸すと、コーティングしたTCPが剥がれることがあった。長時間浸漬させるとよりその傾向が認められた。その点を改善させるために、TCPブロック上に直接細胞を播種し、ブロック上で細胞を培養させる方法についても検討を行ったところ、SEM所見ではブロック上に細胞が観察されたため、効果的な方法と考えられるが適切な細胞数については今後検討が必要となる。

(3) ラット頭蓋骨上に培養細胞シートを埋植した際の骨増生について

本研究においては、培養骨髄細胞シートを成長因子FGF-2を含浸させたコラーゲンスポンジスキャホルド(FC-HACスポンジ)上に設置したものをラット頭蓋骨骨窩洞形成部に埋植し、骨増生効果について組織学的評価を行った。その結果、4週間後のヘマトキシリン-エオジン重染色ではコラーゲンスポンジスキャホルドのみまたはFGF-2を含浸させたコラーゲンスキャホルドを埋植させた際に比べて明らかに多くの骨増生が認められた。そのため、培養骨髄細胞シートに成長因子FGF-2を併用することで効果的な骨再

生療法になることが示唆された。また、4週間後においてもコラーゲンスポンジの残存は少なからず認められた。スポンジの緩やかな吸収性は水平性骨吸収の足場に求められる特性としては適正なものかもしれない。今後は更に観察期間を延ばした際の骨増生について検討が必要である。また、TCPブロック上に細胞を培養させた際との比較も必要である。

本研究期間においては適切な培養骨髄細胞シートの作製方法の確立および成長因子FGF-2を併用させた際のラットにおける骨増生効果を確認することができた。これらのコンセプトは特別な装置や器具は必要とせず、あらゆるスキャホルドに応用可能であり、適切なスキャホルドと組み合わせるとこにより更に効果的な再生療法となると考えられる。

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 1件)

Shimoji S et al 他 9名、7番目: Bone-orchestrating cells, osteocytes. Hokkaido J Dent Sci, 査読無, 32,2012,93-103.

[学会発表](計 1件)

Shimoji S et al: Histochemical examination on osteocytes and their lacunae after administration of parathyroid hormone in mice. 22nd ANZBMS Annual scientific meeting with 1st Asia-Pacific Bone & Mineral Research Meeting, September 5, 2012, Pan Pacific Perth Hotel, Perth, Australia.

[図書](計 0件)

[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：

6．研究組織

(1)研究代表者

下地 伸司 (SHIMOJI, Shinji)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30431373

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし