

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659879

研究課題名(和文)細胞親和性を担持させたセラミックスと海洋性コラーゲンを用いた歯科治療の新規開発

研究課題名(英文) New development of clinical dental treatment that uses ceramics with cell compatibility and fish collagen

研究代表者

池田 香 (IKEDA, Kahori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：20578330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療において不可欠な3要素である、細胞、足場、栄養因子のうち、われわれは足場材に関して従来より種々検討を加えている。これまで研究室では、生体親和性、生分解性に優れ、かつ人獣共通感染症(BSEなど)の対象とならないFish Collagen由来足場材としての物理的・化学的な性状ならびに安全性について多孔性担体を試作しすでに報告を行ってきた。そこで今回、細胞移植療法を想定した観点より、Fish Collagenによる骨髄由来細胞の細胞挙動に対する影響について検討したところ、組織再生療法の際にFish collagenを用いた足場材が細胞の育成、骨欠損部の治癒に対して有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Marine collagen derived from fish scales, skin, and bone has been widely investigated for application as a scaffold and carrier due to its bioactive properties, including excellent biocompatibility, low antigenicity, and high biodegradability and cell growth potential. This study was conducted to confirm the safety of fish (tilapia) atelocollagen for use in clinical application. We performed in vitro and in vivo biological studies of medical materials to investigate the safety of fish collagen. The extract of fish collagen gel was examined to clarify its sterility. All present sterility tests concerning bacteria and viruses (including endotoxin) yielded negative results, and all evaluations of cell toxicity, sensitization, chromosomal aberrations, intracutaneous reactions, acute systemic toxicity, pyrogenic reactions, and hemolysis were negative. The present study demonstrated that atelocollagen prepared from tilapia is a promising biomaterial for use as a scaffold in regenerative medicine.

研究分野：生体工学

キーワード：セラミックス コラーゲン 細胞移植 象牙質 再生医療

1. 研究開始当初の背景

魚類由来の海洋性コラーゲンは、皮や骨や鱗に存在し、構成アミノ酸の一つであるヒドロキシプロリンの含有がウシやブタなど動物性コラーゲンと比較して5割程度と少なく、タンパク質としての三重螺旋構造が分解しやすく、生分解性が高いことが知られている。またM活性化能や細胞活性促進能を有すると言われている(J Biosci Bioeng. 106,412-5. 2008)が詳細な検討はなされていない。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。したがって今回の申請で検討する魚類の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、歯髄組織再生および細管性象牙質再生療法への実用化は非常に意義深いものと考え、本研究における成果が世界的な歯科領域に対して貢献できるものと期待される。

2. 研究の目的

現在の一般的な齲蝕治療法では、人工の詰め物と残存歯との間に隙間ができるために、再び齲蝕となることが欠点である。また齲蝕が深部にまで波及し歯髄に達した結果、不快な症状や痛みが現れた場合、抜髄法により歯髄を全部また一部除去を行わねばならなくなる。そこで本申請課題の目指すものは、ES細胞の樹立維持について長岡らが報告した(J Biol Chem 283:26468-76,2008)方法を一部改変したE-カドヘリンキメラ抗体型マトリックスを用い、ヒト歯髄幹細胞を分取・増幅し、固定型E-cad-Fcキメラタンパク質を用いた単一細胞レベルで分散させ、未分化状態を維持させながら増殖させ細胞接着分子と共に、歯冠形態に加工したセラミック製担体に播種して細胞附着後、in situにおいて象牙芽細胞に分化させ、新生される細管象牙質再生の有効性、安全性・安定性を検証することである。

(1) ヒト歯髄組織から歯髄幹細胞を分取し、象牙芽細胞への分化誘導を促進させる。

ヒト抜去歯から採取した歯髄組織から歯髄幹細胞膜遊走分離法(Cytokine Growth Factor Rev 20:435-40, 2009)により、歯髄幹細胞を選択的に分取し、海洋性コラーゲンを添加した硬組織誘導培地で効率的に象牙芽細胞へ分化誘導を行い、厳密な定量分析によって海洋性コラーゲン自身の象牙芽細胞への分化・硬組織形成賦活の有効性を証明する。

(2) 細胞間接着分子E-カドヘリンシート付着セラミック担体の製作。

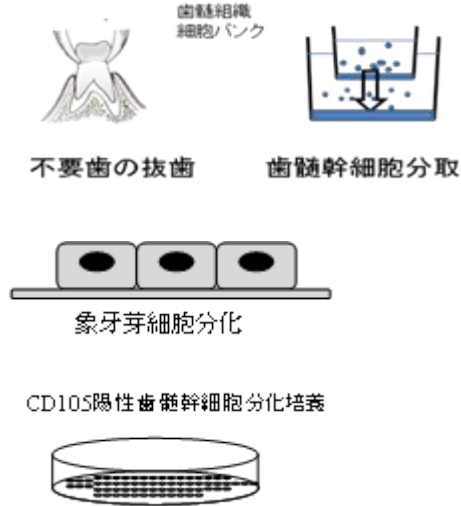
歯科用CAD/CAMシステムを利用し、セラミック試片を作製後、その内面にE-カドヘリンキメラ抗体シートを貼付する。そのシート状表面へ象牙芽細胞を播種し、増殖させ生物学的石灰化効果を検証する。

(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。

動物実験において、細胞親和性を付与した歯冠修復用セラミック担体内で3次元培養した象牙芽細胞を歯髄露出部へ移植し、方向性のある細管象牙質新生促進効果について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。

魚由来の海洋性コラーゲンは、皮や骨や鱗に存在し、構成アミノ酸の一つであるヒドロキシプロリンの含有がウシやブタなど動物性コラーゲンと比較して5割程度と少なく、タンパク質としての三重螺旋構造が分解しやすく、生分解性が高いことが知られている。またM活性化能や細胞活性促進能を有すると言われている(J Biosci Bioeng. 106,412-5. 2008)が詳細な検討はなされていない。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。したがって今回の申請で検討する魚類の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、歯髄組織再生および細管性象牙質再生療法への実用化は非常に意義深いものと考え、本研究における成果が世界的な歯科領域に対して貢献できるものと期待される。

3. 研究の方法



今回の歯髄幹細胞を利用した移植療法を展開するにあたり、まず第一にはSDF-1-CXCR4(リガンド-受容体ペア)を利用した細胞遊走分離法を用い、効率的に歯髄幹細胞を分取する。硬組織誘導培養系への海洋性コラーゲンであるFish Collage Peptide(FCP)添加により、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化誘導促進化されることを確認・評価する。次に細胞間接着分子E-カドヘリンのモデル分子である固定型E-cad-Fc

キメラタンパク質を用いた細胞接着シートを調整し、CAD/CAM も用いたセラミック担体に貼付させ細胞親和性を検証する。最終的には三次元組織培養を行った細胞-セラミック担体複合体を歯牙欠損部へ戻し、FCP 由来コラーゲンゲルを用いて細胞成長因子とともに細胞移植療法の前臨床試験として、動物組織での象牙質再生効果を検討し、ヒトへの細胞移植療法の臨床試験を目標に設定する。

(1) 歯髄組織から歯髄幹細胞の分取
長崎大学病院虫歯治療室外来患者から同意を得た上で、不要抜去歯から歯髄細胞を分離し、初代培養のち、通法に従って継代を行う。大学既設のセルソーターにて細胞表面マーカーとして CD105 陽性かつ CD31 陰性の分画となる細胞を分取し、幹細胞マーカーである CD29、CD44、CD73 および CD90 が陽性となることをフローサイトメトリック解析し、血管新生能および神経再生能を有する歯髄幹細胞であることを確認する。しかしながら CD105 陽性細胞をセルソーティングで分取する場合臨床安全性に問題があり、GMP 準拠の装置を準備することも実際的ではなく、また抗体ビーズ法の利用も高価となるため、将来のヒトへの臨床応用を想定した分化誘導の効率化が想定した場合は、国立長寿医療センターによって開発された歯髄幹細胞膜遊走分離法の技術支援を受ける計画である。この原理は CD105 陽性細胞においてケモカインである CXCR4 の分泌が高く、この CXCR4 は SDF-1 をリガンドとするレセプターであり、CXCR4 の発現が高いということは SDF-1 に対して遊走能が大きいという性質を利用して、分離膜を介在させた分離法を利用することとなる (Cytokine Growth Factor Rev 20:435-40, 2009)。

(2) FCP(Fish Collagen Peptide)添加による象牙質細胞への分化誘導促進化
分取培養された歯髄幹細胞の象牙質細胞への分化誘導を促進する目的で、硬組織誘導培地 (アスコルビン酸、 α -グリセロリン酸およびデキサメサゾン含有 DMEM) へ極低濃度 (0.001mM) の FCP 溶液を添加する。歯髄幹細胞の継代培養を行い、分化誘導状況については培養細胞の形態変化 (大型化) を確認後、FCP 刺激により発現量が変化する遺伝子 (Differentially Expressesd Genes) を偽陽性なしに真の検出が可能である Gene Fishing 法を用いスクリーニングを行う。その結果をもとに石灰化現象の指標である ALP, Type collagen, Osteocalcin, BMP-2 および Dentin sialoprotein や DMP1(Dentin matrix protein) のターゲット遺伝子を用いて教室既設のリアルタイム PCR 法による cDNA の厳密な定量分析を実施し分化レベルを検証する。形態学的にカルセインにてラベリングした生細胞に対し共焦点レーザー顕微鏡観察を行い、象牙質様細胞外基質形成促進作用が確認し、ALP 免疫染色、von kossa 染色にて観察し FCP の生物学的石灰化促進能を証明す

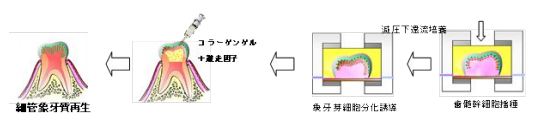
る。

4. 研究成果

セラミック担体の作製および象牙質細胞担体複合体の形成

CERECBlocs を用い、CEREC AC にて通法に従って全部被覆冠形態のオールセラミック冠を作製する。本研究では E-cad-Fc キメラタンパクマトリックスを用いた歯髄幹細胞の継代培養によって効率的に細胞増殖を目指す。この方法は単一細胞レベルで分散しながら未分化維持増殖させ、未分化幹細胞の均質化および大量増幅が可能であるとされ (J Biol Chem 283:26468-76, 2008)、適宜フローサイトメーターおよびリアルタイム PCR 法にて、Nanog や Oct3 や Sox2 遺伝子発現状況について検証し未分化性の維持を確認できた。また多能性幹細胞をヒト ES 細胞用培地で浮遊培養することによって未分化状態を維持できると報告されており (Stem Cell Res 4:165-179, 2010)、この方法を発展させ、細胞が常に新鮮な培養液と接するように還流培養システム (Bioreactor) を用いて、減圧下にて 100mm の培養皿 1 x 10⁶ cells 播種し約 10 日後のコンフルエントを目標とする。

前臨床試験としての実験動物への細胞移植
免疫抑制マウスを用い下顎骨表面より骨削合し、切歯歯根表面に露髄面を形成後、CAD/CAM にて光学印象後、適合するセラミック体を作製する。その後上記三次元象牙質細胞 セラミック担体複合体を培養調整し、最適な時期に移植留置し、その際露髄面に接するように FCP ゲルを象牙質細胞遊走因子や細胞成長因子を注射シリンジを用いて、間隙ができないよう密接に注入する。その後経時的な (移植後 1~24 週を目安) 露髄面での細管性新生象牙質形成度について 50kv、0.75mA の条件下で当大学既設の実験動物用マイクロ CT の使用協力を得て時系列的な画像解析を行うと共に、ALP, Osteocalcin, BMP-2 および BSP や DSP をマーカーとした in situ hybridization 法にて組織内の移植象牙質細胞の局在性および新生象牙質基質を病理組織学的に検討する。また形態学的にも Ca 親和性のカルセインを用い当教室既設の共焦点レーザー顕微鏡にて硬組織形成度を定量評価し、実際の臨床応用におけるタイミングの良い移植時期を検討した。



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1件)

Fabrication and Characteristics of Chitosan Sponge as a Tissue Engineering Scaffold
Takeshi Ikeda, Kahori Ikeda, Kouhei Yamamoto, Hidetaka Ishizaki, Yuu Yoshizawa, Kajiro Yanagiguchi, Shizuka Yamada, and Yoshihiko Hayashi
BioMed Research International Vol 2014, Article ID 786892, 8 pages(IF: 2.833)査読有り

[学会発表](計4件)

Ikeda T., Ikeda K., Yamamoto K., Yoshizawa y., Yamada S., Hayashi Y.: The Physicochemical Properties of Fish Collagen in Regeneration Medicine, 7th IADR/PER (Dubrovnik), Abstr. No. 168, September 10-13, 2014.

Ikeda T, Ikeda K, Yamamoto K, Yoshizawa Y, Sugimoto K, Ishizaki H, Yamada S, Yanagiguchi K, Hayashi Y: Properties of chitosan scaffold for pulp tissue engineering. 10th Asia Pacific Chitin & Chitosan Symposium, 5th October, 2013, Yonago, Tottori, Japan

池田 毅, 池田 香, 吉澤 祐, 柳口嘉治郎, 山本耕平, 山田志津香, 林 善彦: 足場材としての魚コラーゲンの安全性試験
第138回日本歯科保存学会秋季大会, 2013年6月27日, 福岡国際会議場, 福岡市

Ikeda T, Ikeda K, Yamamoto K, Sugimoto K, Ishizaki H, Yamada S, Yanagiguchi K, Hayashi Y: Properties of chitosan scaffold for pulp tissue engineering. International Association for Dental Research, Iguacu, Brazil, 18th June 2012

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 香 (IKEDA, Kahori)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号: 20578330

(2)研究分担者

杉本 浩治 (SUGIMOTO, Kouji)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号: 40646113

(3)連携研究者

吉澤 祐 (YOSHIZAWA, Yuu)
長崎大学・病院(歯学系)・医員

研究者番号: 60746931