

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670849

研究課題名(和文) 注入型骨膜幹細胞含有ゲルによる新規歯槽骨増量法の開発

研究課題名(英文) The development of the injectable hydrogel including periosteum stem cells to increase the volume of the alveolar bone

研究代表者

内野 夏子 (Uchino, Natsuko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30569637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：口腔周辺組織のうち、幹細胞が豊富に含まれると推測されるオトガイ部骨膜に着眼し、オトガイ部骨膜由来の幹細胞を単離、培養して、細胞親和性が高い新規ペプチドゲルPuraMatrixと混和した注入型ゲルを開発し、歯槽骨増量の有用性を検証した。ラットおよびヒト由来の骨膜由来細胞は他の口腔領域由来の細胞よりも幹細胞特性を有する細胞が多く存在していることが確認された。加えて、ラット骨欠損モデルおよび抜歯窩モデルに骨膜幹細胞含有ゲルを欠損部に投与することにより有用性が確認された。本研究で開発した注入型ゲルは、低侵襲で簡便に骨誘導が可能となり、比較的少量の骨欠損症例に対して有効な方法であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have focused on periosteum of mentum as an abundant source of stem cell for regeneration of oral tissues. To develop the injectable hydrogel includes the cultured stem cells based on the biocompatible self-organization peptide hydrogel 'PuraMatrix', we have evaluated the culture method and differentiation method for maintaining pluripotency of stem cell derived from human or rat. As results, the periosteum stem cells maintained stem cell properties in comparison with cells of surrounding oral tissue. In addition, we have prepared the bone defect model and extraction socket model then implanted stem cells derived from synovium to the defect. By the animal experiments, bone regeneration was observed the abundant extracellular matrix histologically. It was clear that the promotion of bone formation was enabled by using the injectable hybrid hydrogel easily, noninvasively. In this project, it was revealed that it was an effective method for relatively a little bone defect case.

研究分野：口腔外科

キーワード：歯槽骨再建 幹細胞 ペプチドハイドロゲル

## 1. 研究開始当初の背景

歯槽骨は歯やインプラントを支持することにより、日常生活に不可欠な摂食、咬合、構音に重要な役割を果たすほか、審美的な面からも生活の質(QOL)を維持するために極めて重要な組織である。歯槽骨は、歯周病などの慢性炎症や口唇口蓋裂といった先天性形態、腫瘍、外傷など、歯科領域の様々な主要疾患により障害を受けるため、歯槽骨の増量、再建は歯科領域の最も取り組まなければならない課題の一つであり、これまでに自家骨移植を始め GBR などの骨造成の技術が臨床で用いられてきたが、口腔以外の部位に骨採取のために傷ができることや、十分な骨が再生できないなどの理由から、満足のいく結果は得られていない。例えば、口唇口蓋裂の顎裂閉鎖後に、術後の骨吸収や移植骨の不足の為に、歯の移動にとって裂部の骨が十分でない場合があり、このような場合に使用できる簡便な歯槽骨増量法の開発が臨床上求められている。また、成人矯正において、患者によっては少量の歯槽骨増量を行えば、歯の移動が可能になる場合もある。このために、比較的少量の骨欠損に対し低侵襲で簡便に骨誘導を行うことができれば歯科治療は飛躍的に向上すると思われる。またインプラント植立のための歯槽骨再生に対して、現在 FGF-2 製剤や PDGF 製剤の使用が検討されているが、注入により歯周組織に投与できるゲル状の物性と一層強力な骨形成促進能を有する骨再生医療製品の開発が求められている。

## 2. 研究の目的

侵襲性が低く、簡便に投与できる注入型の幹細胞含有ゲルを開発する目的で、オトガイ部骨膜から細胞を単離・培養し、スフェロイド形成効率などを指標として多分化能を有する幹細胞を検索する。次いで、遺伝子発現や表面抗原などを解析し骨膜由来幹細胞の特異マーカーを確立する。このマーカーを用いて骨膜由来幹細胞を改めて単離すると

もに、増殖培養法ならびに投与法を確立する。最後に、ラット骨欠損モデルで骨膜由来幹細胞の骨形成を評価するとともに、注入型骨膜幹細胞注入ゲルを確立し、ラットモデルで骨増量における有用性を検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) 限界希釈法によるコロニー形成能の評価

顔面の中では比較的厚みのあるオトガイ部骨膜を臨床上の細胞源と想定し、以下の実験を行う。骨膜から採取される細胞を用いてコロニー(細胞集塊)形成効率を評価する。ラット(F344/Jcl、7週齢、n=3)を用いて、下顎骨骨膜を採取する。骨膜組織は細切後、コラゲナーゼ処理をする。回収した細胞を低密度(52細胞/cm<sup>2</sup>)で培養皿に播種する。10%FBS含有培養液で培養し、50細胞以上の細胞集塊を形成したものをコロニーとする。培養約4週間後、各種組織由来細胞のコロニー数を計測する。参考値として歯根膜、骨髄、歯髄からも細胞を採取し、同様なコロニー数を検証し、骨膜の優位性を確認する。

オトガイ部骨膜がヒト由来組織でも同様なコロニー形成能を有することを検証するため、オトガイ形成術においてオトガイ部骨膜を、インフォームドコンセント後に患者から採取する(東京大学医学部倫理委員会承認済み、#622)。採取したヒト由来骨膜を用いて、前述の方法でコロニー数を計測し、形成能を確認する。増殖したコロニー形成細胞の増殖曲線から、骨膜由来細胞の増殖能を評価する。また骨膜由来細胞を用いて骨、軟骨、脂肪などの間葉系組織への分化を誘導し(Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification kit, R&D社製)、多分化能を評価する。対照には、高密度(3200細胞/cm<sup>2</sup>)で播種し、通常の単層平面培養を同期間行った培養骨膜由来細胞をもちいて比較検討する。

## (2) コロニー形成細胞の特性を用いた幹細胞単離

(1) で得られたコロニー形成細胞と通常の培養骨膜由来細胞を比較するため、レクチンアレイを用いて簡便にかつ網羅的に表面糖鎖を評価し、両者の相違性を把握する。ついで、マイクロアレイ法を用いて、網羅的に遺伝子情報を把握する。アレイデータをクラスタリングアルゴリズムおよびグラフ比較アルゴリズムによって解析し、マーカーとなる指標を検討する。次いで、マイクロアレイ法で得られた遺伝子指標を参考にしつつ、フローサイトメーター(BD社製 Fortessa、現有)を用いて間葉系細胞の代表的な表面抗原 CD44, 49a, 49c, 49e, 73, 90, 105, 144a, 146, 151, 166, 271 や、骨髄由来幹細胞マーカー CD34, 117, 133, などの発現レベルを検討し、特異的なマーカーを3種類程度に絞り込む。FACS(BD社製 Aria、現有)を用いて、コロニー形成細胞から上記マーカーで選別される細胞を分取し、増殖曲線による増殖評価と骨・軟骨・脂肪分化などの多分化能を評価し、選別前のコロニー形成細胞や単層培養による培養骨膜由来細胞の結果を比較して幹細胞特性の向上を確認する。

## (3) オトガイ部骨膜由来幹細胞の培養法・投与方法確立

オトガイ部骨膜由来幹細胞を投与方法として培養ディッシュのコート条件ならびに増殖因子を検討する。コート素材のハイドロゲルには、幹細胞の形質を保持し、増殖を促進するナノ構造を有する必要がある。そのため、コートの素材としては新規ペプチドゲル PuraMatrix を第一候補と考え、コート条件としては、コートする際の蛋白濃度を検討する。対照素材としてはアテロコラーゲン、ヒアルロン酸、などを検討する。増殖因子には FGF-2, IGF-1, insulin, BMB-2, growth hormone, PTH, dexamethasone, vitamin D, T3, estrogen, testosterone, IL-1RA の最適

な組み合わせを選択する。選択方法としては、各因子の組み合わせに対する細胞増殖を XTT キットで定量評価し、分散解析を活用し統計学的に優位な組み合わせを絞る。それぞれの組み合わせにおいて、1項で検討したマーカー陽性率を解析し、陽性率の維持に最も優れたものを選択する。

また、コート素材の検討において、幹細胞の形質を保持し、増殖を促進する新規ペプチドゲル PuraMatrix は、骨膜由来幹細胞との親和性が高いことが予想される。細胞投与においても PuraMatrix を第一選択と考え、細胞保持性の高い蛋白濃度を検討し、アテロコラーゲン、ヒアルロン酸、などの対照素材の細胞保持性などを比較する。

## (4) ラット骨欠損モデルにおける骨再生の検討

骨欠損モデルとして、生後7週齢のラット(F344/Jcl)の頭蓋骨に5mmの全層欠損を作製し、下顎骨骨膜由来幹細胞を移植する。同系ラットより、前項で確立した骨膜由来幹細胞を単離、培養し、細胞を準備する。実験群には、骨膜由来幹細胞を1項で検討したハイドロゲルと混和し( $10^6, 10^7, 10^8$  細胞/mL)、欠損部に投与する。対照には無投与群、ならびにハイドロゲルのみを投与したものを使用する。移植後経時的に頭蓋骨を摘出・固定しX線撮影(ソフロン社製キャビネット型軟X線発生装置 SR0-i505、現有)、 $\mu$ CT撮影(島津製作所社製 InspeXio SMX-90CT、現有)、パラフィン包埋脱灰組織切片によるHE染色像などを用いて骨再生を評価する。上記の結果を勘案し、注入型骨膜幹細胞含有ゲルの作製条件を検討する。

## (5) ラット抜歯窩モデルへの注入型骨膜幹細胞含有ゲルの応用

骨再生を促進するモデルとして、生後7週齢のラットの下顎左側第一臼歯を抜歯し、抜歯窩の骨形成を促進する[Matin Int J Oral Maxillofac Implants 2001]。抜歯後、実験

群には 1 項で検討した注入型骨膜幹細胞含有ゲルを投与する。比較にはハイドロゲルのみを注入するゲル群、および抜歯窩になにも投与しない無処置群を用いる。投与後経時的に観察を行う。下顎を固定し、包埋非脱灰組織切片またはパラフィン包埋脱灰組織切片を作製する。抜歯窩の石灰化を CMR により評価するとともに、対応するパラフィン包埋脱灰組織切片において HE 染色を行う。これらの結果を下に、歯槽骨増量における注入型骨膜幹細胞含有ゲルの有用性を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 限界希釈法によるコロニー形成能の評価

ラットの下顎骨から骨膜を採取し、単離後、低密度で培養を行った。4 週間後、50 細胞以上の細胞塊をコロニーとし、コロニー数を計測した。対象として、同様な単離方法、培養方法で増殖させた歯根膜、骨髄、歯髄の細胞と比較を行ったところ、骨膜由来の細胞では、対象細胞と比較してコロニー形成率が有意に高値を示した。ヒト由来の骨膜でも同様な検討を行い、有用性を検証した。オトガイ形成術の際にオトガイ部骨膜をインフォームドコンセント後に患者から採取した(東京大学医学部倫理委員会承認済み#622)。採取した骨膜をラットで確立した方法で培養を行い、コロニー形成率を計測した結果、コロニーが多数認められ、肉眼的にも良好なコロニー形状が観察された。コロニー形成細胞より算出した増殖曲線からも良好な増殖が認められたことから、ラットおよびヒト由来の骨膜由来細胞は他の口腔領域由来の細胞よりも幹細胞特性を有する細胞が多く存在していることが確認された。

##### (2) コロニー形成細胞の特性を用いた幹細胞単離

確立した骨膜由来のコロニー形成細胞と通常の培養骨膜由来細胞を比較するために、レクチンアレイを用いて表面糖鎖の網羅的

な解析を行った。並行して GeneChip を用いたマイクロアレイによる遺伝子情報を得ることにより、細胞表面の糖鎖構造変化と遺伝子発現の関連性を検討した。また、それらのデータを用いてクラス分析を行い、統計学的に有意なマーカーの探索を行った。代表的な間葉系細胞のマーカーである CD44, 49a, 49c, 49e, 73, 90, 105, 144a, 146, 151, 166, 271 や、骨髄由来幹細胞マーカー CD34, 117, 133、などの発現レベルを検討し、骨膜由来幹細胞の特異的なマーカーを検索した。

##### (3) オトガイ部骨膜由来幹細胞の培養法・投与方法確立

ラット下顎骨より骨膜を採取した後、洗浄およびプレカラムフィルターを交互に使用することにより、不純物や他組織の混入を防止することに成功し、夾雑物の少ない骨膜由来細胞を単離する方法を確立した。その方法により単離した骨膜由来細胞を培養し、約 4 週間後に純度の高いコロニーを得ることに成功した。次に、コロニー形成細胞と通常の培養骨膜由来細胞を用いてレクチンアレイによる簡便にかつ網羅的に表面糖鎖を評価し、両者の相違性を把握し、マーカーとなる指標を検討した。ツールとして、クラスタリングアルゴリズムおよびグラフ比較アルゴリズムの生物統計学的手法を用いた。オトガイ部骨膜幹細胞の培養法・投与方法の確立として、新規ペプチドゲル PuraMatrix を第一候補と考え、コートする際の蛋白濃度を検討する。対照素材としてはアテロコラーゲン、ヒアルロン酸などを検討する。増殖因子には FGF-2、IGF-I、insulin、BMB-2、growthhormone、PTH、dexamethasone、vitamin D、T3、estrogen、testosterone、IL-1RA の最適な組み合わせを選択し、統計学的に優位な組み合わせを絞った。

##### (4) ラット骨欠損モデルにおける骨再生の

## 検討

ラットの頭蓋骨に 5 mm の全層欠損を作製し、骨膜由来幹細胞を移植した。移植後 2, 4, 6 週で頭蓋骨を摘出・固定し、骨再生を確認した。

### (5) ラット抜歯窩モデルへの注入型骨膜幹細胞含有ゲルの応用

ラット抜歯窩モデルへの注入型骨膜幹細胞含有ゲルの応用として、抜歯窩モデルを作製した。ラットに注入型骨膜幹細胞含有ゲルを投与したところ、骨形成が観察され、注入型骨膜幹細胞含有ゲルの有用性が検証できた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Mori Y, Fujihara Y, Misawa M, Inoue H, Inaki R, Suenaga H, Ohkubo K, Saijyo H, Takato T, Hoshi K. Fabrication of Stereotyped Beta-Tricalcium-Phosphate Blocks into a Conjugated Structure using Mesenchymal Stem Cell Sheets Prepared in Temperature-Responsive Culture Dishes. J. Hard Tissue Biol. Vol. 23 (2014) No. 2 p. 217-224.

<http://doi.org/10.2485/jhtb.23.217>

Ohkubo K, Susami T, Inokuchi T, Okayasu M, Takahashi N, Uwatoko K, Uchino N, Suenaga H, Koga Y, Saijyo h, Mori Y, Takato T. Incisor Inclination after Presurgical Orthodontic Treatment in Patients with Mandibular Prognathism. Jpn. J. Jaw. Deform. Vol. 24 (2014) No. 1 p.16-26.

<http://doi.org/10.5927/jjdd.24.16>

〔学会発表〕(計3件)

井口隆人、須佐美隆史、長濱浩平、内野夏子、阿部雅彦、末永英之、森良之、高戸毅 第24回日本顎変形症学会総会・学術大会 2014年6月10日-11日 アクロス福岡(福岡県、福岡市)

井口隆人、須佐美隆史、大久保和美、岡安麻里、内野夏子、上床喜和子、高橋直子、末永英之、高戸毅 唇顎口蓋裂患者の混合歯列における口蓋形態・上下顎骨関係と矯正歯科治療との関連性 第38回日本口蓋裂学会学術大会・総会 2014年5月29日-30日 札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)

内野夏子、須佐美隆史、井口隆人、岡安麻里、大久保和美、上床喜和子、高橋直子、森良之、高戸毅 先天異常患者における疾患

別平均側面頭部 X線規格写真トレース像の作成  
第72回日本矯正歯科学会大会 2013年10月7日-9日 長野キッセイ文化ホール(長野県、松本市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内野 夏子 (NATSUKO Uchino)  
東京大学医学部附属病院・助教  
研究者番号: 30569637

### (2) 研究分担者

大久保 和美 (KAZUMI Ohkubo)  
東京大学医学部附属病院・講師  
研究者番号: 10396715