

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861966

研究課題名(和文) 羊膜上培養歯根膜由来細胞シートを用いた新たな骨再生医療に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study on novel bone regeneration medicine using a periodontal ligament cell sheet cultured on an amniotic membrane

研究代表者

雨宮 傑 (Amemiya, Takeshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90398389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：羊膜の有用性に注目し、歯根膜由来細胞(PDL細胞)の羊膜上での骨分化誘導培養を行った。PDL細胞は、羊膜上にて増殖し、免疫染色像では細胞増殖マーカー、間葉系細胞マーカー、骨芽細胞マーカー、細胞間接着装置、基底膜構成成分が発現し、1枚の細胞シートを形成した。実験動物への移植にて石灰化細胞基質の形成を認めた。羊膜上培養PDL細胞シートは骨分化能を有しており、新たな骨再生医療への応用の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The bone differentiation of periodontal ligament cells (PDL cells) was induced on an amniotic membrane. PDL cells grown on the amniotic membrane formed a single cell sheet, with the expressions of cell proliferation, mesenchymal cell, and osteoblast markers, intercellular adhesion molecules, and basement membrane components detected by immunostaining. The sheet formed a calcified cell substrate when transplanted into a laboratory animal. The sheet cultured on the amniotic membrane had a bone differentiation potential, suggesting its applicability to novel bone regenerative medicine.

研究分野：歯科・外科系歯学

キーワード：移植・再生医学 再生医学 細胞・組織 歯学 臨床

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに羊膜の培養基質としての有用性に着目し、研究を行ってきた。これまでに各種口腔粘膜上皮欠損患者に対しての臨床応用を行い、拒絶反応等の異常なく良好な結果が得られている。これらの研究結果より、羊膜は細胞培養の基質として適し、また新たな再生医療的治療法として極めて有用かつ有効であることが分かった。

本学医学倫理審査委員会の許可を得 (RBM-R-21)、この羊膜上の細胞培養系を用い、歯根膜由来細胞を羊膜上にて培養を行ったところ、歯根膜由来細胞は歯根膜としての性質を保ち羊膜上にて増殖し、細胞間には強固な細胞間接着装置が存在した羊膜上培養歯根膜由来細胞シートの作製が可能であり、また *in vivo* の環境下を想定したヌードマウス腎皮膜下移植後においても歯根膜としての性質を保持し、細胞増殖していた。

これらの研究成果より、羊膜は各種細胞培養の基質として適し、また新たな再生医療的治療法として極めて有用かつ有効であることがわかった。そして今回、この細胞培養系を歯根膜由来細胞の骨分化誘導培養に応用することを立案した。近年では、適当な基質を用いて細胞シートを作製し、歯周組織の再生をめざす報告が散見される。しかしながら、歯周組織再生のための理想的な基質は、未だ開発されていないのが現状である。そこで研究代表者は、基質として生物学的材料として様々な医療領域分野で注目されている羊膜を用いることを着想した。

羊膜は、胎盤の最表層を覆う薄膜で、免疫学的に胎児を母体から隔離する特異な機序が存在する。また分娩後に胎盤よりほぼ無菌的に採取され、胎盤は分娩後に通常廃棄される組織で、倫理的、技術的に入手が容易である。これまでに生物学的材料として皮膚移植、腔形成術、腹部手術の際の癒着・癒痕防止、皮膚熱傷後などの創部の被覆による治癒促進、さらには眼表面の再建などの手術療法に用いられている。この羊膜の特筆すべき特徴として、各種細胞の培養基質として適し、抗炎症作用・感染抑制作用を有し、他の組織にはない特徴を備えていることである。

われわれが確立した羊膜上細胞培養系を用いて歯根膜由来細胞の骨分化誘導培養を行うことで、骨再生を目的とした新規培養シート作製のための最適化、また羊膜独自の有用性を併せ持つ新たな培養シートとしての検討を加えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、われわれが確立した羊膜上の細胞培養系を用いて、歯周組織の再生 (骨再生) をめざした新規培養シート作製を行うことである。すなわち、羊膜上にて歯根膜由来細胞の骨分化誘導培養を行い、作製した培養シートにおける組織学的検討ならびに免疫組織学的検討を加えた。さらに、移植

後においても培養シートが新生骨を再生する能力を有しているかを確認するために実験動物への移植を行い、培養シートの移植後における組織動態について検討を加えた。

なお当該研究の実施は、本学医学倫理審査委員会ならびに本学動物実験委員会の許可を受けた。

### 3. 研究の方法

歯根膜由来細胞の骨分化誘導培養は、すでに確立している羊膜上の細胞培養系を応用し、骨再生を念頭に置いた羊膜上培養歯根膜由来細胞シート作製のために最適な培養技術の改良および調整を行った。そして作製した培養シートの組織学的、免疫組織学的な検討を加え、さらに培養シートを実験動物への移植を行い、*in vivo* における細胞動態についての検討を加えた。

#### (1) 歯根膜由来細胞の羊膜上での骨分化誘導培養による培養シートの作製

##### 羊膜の採取および保存方法

当研究にて使用する羊膜については、当大学附属病院産科の協力を得、帝王切開予定の妊婦から羊膜を採取する。羊膜提供者は全身的に合併症の無い帝王切開予定の妊婦で、3ヶ月以内の血清検査で感染症 (B 型・C 型肝炎、梅毒、ヒト免疫不全ウイルス、クロイツフェルトヤコブ病、ウエストナイル熱など) が陰性であるものを対象とした。具体的には、当院産科分娩室にて帝王切開時に取り出された胎盤から無菌的に羊膜を採取し、抗菌剤を含む洗浄液で洗浄した後、保存液中に浸した状態で -80 の冷凍庫で保存した。なお、安定した羊膜の供給が得られない場合は、特定非営利活動法人・再生医療支援機構・近畿羊膜バンク (京都) からの研究用羊膜の譲渡・供給を受けた。

##### 歯根膜の採取、および羊膜上での歯根膜由来細胞の骨分化誘導培養

当大学附属病院歯科所属の歯科医師により、抜歯術予定患者から歯根膜を採取した。具体的には、智歯や歯科矯正治療の便宜抜歯等により抜去された歯より歯根膜組織のみを採取した。抜去歯を抗菌剤添加 PBS (-) にて洗浄後、歯根面の歯根膜組織を剥離・採取し、初代培養を行った。培養液として感染症フリーの 10% ウシ胎仔血清 (FBS) および抗菌薬を添加した標準的な細胞培養液を用いた。3~4 継代培養後、羊膜上にこれら歯根膜由来細胞を播種・培養し、骨分化誘導培地を用いて約 4 週間の培養を行った。

なお、歯根膜由来細胞の骨分化誘導培養には、感染症フリーの 10% FBS および抗菌薬を添加した標準的な細胞培養液に、アスコルビン酸、 $\beta$ -グリセロリン酸、デキサメタゾン を添加したものをを用いた。

#### (2) 羊膜上にて骨分化誘導培養した歯根膜由来細胞シートの組織学的・免疫組織学的検

討

作製した培養シートについて、以下の項目にて検討を加えた。

組織学的検討：ヘマトキシリン-エオジン染色を行い組織学的に検討した。

免疫組織化学的検討：細胞増殖能および細胞間接着装置、培養細胞-基質（羊膜）間の接着（基底膜）、ならびに骨芽細胞が産生するタンパクの局在について検討した。

(3)羊膜上歯根膜由来細胞シートの実験動物への移植

骨分化誘導培養を行った羊膜上培養歯根膜由来細胞シートは、実験動物（BALB/c ノードマウス）背部皮下への移植を行い、8週間後に移植部位を採取し、生体内の環境下における細胞遊走増殖について組織学的、免疫組織化学的検討を行った。

#### 4. 研究成果

骨分化誘導を行い作製した羊膜上歯根膜由来細胞は、vimentin、Ki-67 陽性細胞の局在を認め、細胞間には desmoplakin、ZO-1 が発現していた。また、基底膜には laminin5/10、collagen IV/VII が発現しており、骨芽細胞マーカーである osteocalcin、osteopontin および bone sialoprotein も発現を認めた。

骨分化誘導培養を行い作製した羊膜上培養歯根膜由来細胞は、羊膜上において歯根膜としての性質を保持しつつ歯根膜由来細胞が増殖していた。また、デスモソームやタイト結合のマーカー、基底膜構成成分の発現を認めたことより、細胞間接着装置が存在し、基底膜構造を有する培養細胞シートであることが示された。そしてさらに骨芽細胞マーカーの発現を認めたことより、新生骨形成能、すなわち歯周組織再生を促進する細胞を有していることが示された。

上記にて得られた培養シートを、羊膜ごと実験動物（BALB/c ノードマウス）背部皮下への移植を行い、8週後に移植部位を採取した。移植8週後、軟X線写真にて羊膜上培養 PDL 細胞シートの移植部に不透過像を認め、H-E 染色像で同部位に石灰化様組織を認めた。さらに、アリザリン・レッド S 染色で石灰化物形成を、また von Kossa 染色で石灰化用組織を認めた。免疫染色像では、間葉系細胞マーカーである vimentin、骨芽細胞マーカーである bone Gla-protein (osteocalcin) の発現を認め、生体内の環境下においてもその性質を維持していることが示された。アリザリン・レッド S 陽性、von Kossa 陽性の石灰化細胞外基質の形成が認められたことより、羊膜上培養 PDL 細胞シートは骨分化能を有した細胞シートであることが示され、新たな骨再生医療への応用の可能性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Amemiya T, Nakamura T, Yamamoto T, Kinoshita S, Kanamura N, Autologous transplantation of oral mucosal epithelial cell sheets cultured on an amniotic membrane substrate for intraoral mucosal defects, PLoS ONE, 査読有, 10 巻 4 号, 2015, e0125391, DOI: 10.1371/journal.pone.0125391.

Honjo K, Yamamoto T, Adachi T, Amemiya T, Mazda O, Kanamura N, Kita M, Evaluation of a dental pulp-derived cell sheet cultured on amniotic membrane substrate, Bio-Medical Materials and Engineering, 査読有, 25 巻 2 号, 2015, 203-212, DOI: 10.3233/BME-151270.

Adachi K, Amemiya T, Nakamura T, Honjyo K, Kumamoto S, Yamamoto T, Bentley A, Fullwood NJ, Kinoshita S, Kanamura N, Human periodontal ligament cell sheets cultured on amniotic membrane substrate, Oral Diseases, 査読有, 20 巻 6 号, 2014, 582-590, DOI: 10.1111/odi.12176.

〔学会発表〕(計22件)

1. 本城賢一、山本俊郎、山本健太、滝沢茂太、木村 功、雨宮 傑、中井道明、金村成智、羊膜を基質とした培養歯髓由来細胞シートのマウス腰背部皮下での免疫組織学的検討、第60回日本口腔外科学会学術大会、平成27年10月16日、名古屋国際会議場、愛知県・名古屋市
2. 遠藤悠美、雨宮 傑、本城賢一、市岡宏顕、足立圭司、大迫文重、西垣 勝、山本俊郎、中村 亨、金村成智、マウス皮下移植における羊膜上培養歯根膜由来細胞シートの骨形成能の検討、日本歯科保存学会2015年度春季学術大会(第142回)、平成27年6月25日、西日本総合展示場、北九州国際会議場、福岡県・北九州市
3. 山本俊郎、本城賢一、雨宮 傑、松下雄亮、中村 亨、金村成智、in vivoにおける羊膜上培養歯髓由来細胞シートの免疫組織化学的検討、2015日本歯周病学会春季学術大会(第58回)、平成27年5月14日、幕張メッセ国際会議場、千葉県・千葉市
4. 足立圭司、雨宮 傑、本城賢一、市岡宏顕、西垣 勝、大迫文重、山本俊郎、金村成智、羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞シートの骨分化に関する検討、第26回NPO 法人日本口腔科学会近畿地方部会、平成26年12月6日、京都大学百周年時計台記念館2階国際交流ホール、京都府・京都市
5. 本城賢一、山本俊郎、足立圭司、大迫文重、雨宮 傑、坂下敦宏、喜多正和、金村成智、マウス腰背部皮下に移植した羊

- 膜上培養歯髓由来細胞シートの免疫組織学的検討、日本歯科保存学会 2014 年度秋季学術大会(第 141 回)、第 16 回 日韓歯科保存学会学術大会、平成 26 年 10 月 31 日、山形テルサ、山形県・山形市
6. 雨宮 傑、本城賢一、遠藤悠美、市岡宏顕、足立圭司、西垣 勝、山本俊郎、中村 亨、金村成智、羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞シートの *in vivo* 骨再生の検討、日本歯科保存学会 2014 年度秋季学術大会(第 141 回)、第 16 回 日韓歯科保存学会学術大会、平成 26 年 10 月 31 日、山形テルサ、山形県・山形市
  7. 足立圭司、雨宮 傑、本城賢一、西垣 勝、大迫文重、山本俊郎、金村成智、*In vivo* における羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞シートの骨分化能に関する検討、第 59 回日本口腔外科学会学術大会、平成 26 年 10 月 18 日、幕張メッセ国際会議場、千葉県・千葉市
  8. 雨宮 傑、中村隆宏、本城賢一、足立圭司、西垣 勝、大迫文重、山本俊郎、木下茂、金村成智、ヒト羊膜を用いた新たな培養細胞シートの開発、第 27 回京都府歯科医学大会(第 66 回近畿北陸地区歯科医学大会併催)、平成 26 年 9 月 28 日、シルクホール、京都府・京都市
  9. Adachi K, Amemiya T, Honjo K, Ichioka H, Nishigaki M, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N, *in vivo* investigation of the osteogenic potential of Human periodontal ligament cell sheet cultured on amniotic membrane, 96th The American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) Meeting, Scientific Sessions and Exhibition, 平成 26 年 9 月 12 日, Honolulu, Hawaii, USA
  10. Honjo K, Yamamoto T, Oseko F, Amemiya T, Kita M, Mazda O, Kanamura N, Examination of bone differentiation for human dental pulp-derived cells cultured on amniotic membrane, 96th The American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) Meeting, Scientific Sessions and Exhibition, 平成 26 年 9 月 12 日, Honolulu, Hawaii, USA
  11. Amemiya T, Honjo K, Adachi K, Nishigaki M, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N, Immunohistochemical study of periosteal-derived cell sheet cultured on amniotic membrane aiming at periodontal tissue regeneration, 96th The American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) Meeting, Scientific Sessions and Exhibition, 平成 26 年 9 月 12 日, Honolulu, Hawaii, USA
  12. 本城賢一、山本俊郎、市岡宏顕、足立圭司、大迫文重、雨宮 傑、喜多正和、金村成智、骨分化を目指した羊膜上培養歯髓由来細胞シートの作成、第 14 回日本抗加齢医学会総会、平成 26 年 6 月 6 日、大阪国際会議場、大阪府・大阪市
  13. 本城賢一、山本俊郎、足立圭司、雨宮 傑、金村成智、骨分化した羊膜上培養歯髓由来細胞シートの免疫組織化学的検討、日本歯周病学会 2014 春季学術大会(第 57 回)、平成 26 年 5 月 23 日、長良川国際会議場、岐阜県・岐阜市
  14. 雨宮 傑、本城賢一、足立圭司、西垣 勝、大迫文重、山本俊郎、長谷川彰則、金村成智、羊膜を用いたヒト骨膜由来細胞の培養および免疫組織学的検討、第 68 回日本口腔科学会学術集会、平成 26 年 5 月 9 日、京王プラザホテル、東京都・新宿区
  15. 雨宮 傑、本城賢一、遠藤悠美、市岡宏顕、熊本園子、足立圭司、西垣 勝、大迫文重、山本俊郎、中村 亨、金村成智、羊膜を用いた培養骨膜由来細胞シートの作製、日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会(第 139 回)、平成 25 年 10 月 18 日、秋田県総合生活文化会館(アトリオン)、秋田県・秋田市
  16. 本城賢一、山本俊郎、西野悠貴、木村 功、雨宮 傑、中井道明、金村成智、羊膜を基質とした培養歯髓由来細胞シートの作成および骨分化能に関する検討、第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会、平成 25 年 10 月 11 日、福岡国際会議場、福岡県・福岡市
  17. 雨宮 傑、足立圭司、西垣 勝、大迫文重、山本俊郎、金村成智、羊膜を用いた培養ヒト歯根膜由来細胞の骨形成能に関する検討、第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会、平成 25 年 10 月 11 日、福岡国際会議場、福岡県・福岡市
  18. Amemiya T, Nakamura T, Honjo K, Kumamoto S, Adachi K, Nishigaki M, Oseko F, Yamamoto T, Kinoshita S, Kanamura N, Cell sheet culture on amnion aiming at periodontal tissue regeneration, 2nd Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region (IADR-APR), 平成 25 年 8 月 21 日, Bangkok, Thailand
  19. 山本俊郎、本城賢一、熊本園子、雨宮 傑、金村成智、羊膜上培養歯髓由来細胞シートの作成及び骨分化能に関する研究、第 34 回日本炎症・再生医学会、平成 25 年 7 月 2 日、国立京都国際会館、京都府・京都市
  20. 足立圭司、雨宮 傑、本城賢一、熊本園子、西垣 勝、大迫文重、山本俊郎、金村成智、羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞による骨再生に関する免疫組織学的検討、日本歯科保存学会 2013 年度春季学

- 術大会（第 138 回）平成 25 年 6 月 27 日、福岡国際会議場、福岡県・福岡市
21. 山本俊郎、本城賢一、市岡宏顕、足立圭司、雨宮 傑、中村 亨、金村成智、羊膜上培養歯髓由来細胞シートの骨分化能に関する検討、第 56 回春季日本歯周病学会学術大会、平成 25 年 5 月 31 日、タワーホール船堀、東京都・江戸川区
22. 雨宮 傑、足立圭司、本城賢一、市岡宏顕、熊本園子、西垣 勝、大迫文重、山本俊郎、金村成智、歯周組織再生をめざした羊膜上培養歯根膜由来細胞の骨形成能に関する免疫組織化学的検討、第 67 回日本口腔科学会学術集会、平成 25 年 5 月 23 日、栃木県総合文化センター、栃木県・宇都宮市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

雨宮 傑 (AMEMIYA, Takeshi)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：9 0 3 9 8 3 8 9

### (2) 研究協力者

本城 賢一 (Honjo, Ken-ichi)  
京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医  
研究者番号：0 0 7 5 6 8 7 7

熊本 園子 (KUMAMOTO, Sonoko)  
京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医  
研究者番号：9 0 6 1 3 5 6 3

足立 哲也 (ADACHI, Tetsuya)  
京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医  
研究者番号：1 0 6 1 3 5 7 3

山本 健太 (YAMAMOTO, Kenta)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：0 0 6 3 6 1 6 0

中村 隆宏 (NAKAMURA, Takahiro)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：3 0 4 1 1 0 7 8

山本 俊郎 (YAMAMOTO, Toshiro)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：4 0 3 4 7 4 7 2

金村 成智 (KANAMURA, Narisato)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：7 0 2 0 4 5 4 2