

令和元年6月25日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20496

研究課題名(和文) 骨欠損部への移植を目標とするサンゴを足場材料とした毛細血管の三次元培養

研究課題名(英文) Three-dimensional culture of capillaries using coral as scaffolding material for transplantation to bone defect

研究代表者

岡村 友玄 (OKAMURA, Tomoharu)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10567473

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)：今回、将来的な臨床応用の為に、サンゴ外骨格と培養細胞(特に毛細血管に対する)の親和性を調べた。実験はin vivoで行い、生化学的および形態学的手法を用いられた。非添加のグループと比較してサンゴ外骨格を添加して培養したヒト正常皮膚線維芽細胞では細胞増殖とコラーゲン線維産生の亢進を認めた。また、ヒト正常皮膚線維芽細胞およびヒト血管由来血管内皮細胞の共培養にサンゴ外骨格を添加したグループではサンゴ周囲に豊富な毛細血管の形成を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、サンゴ外骨格と肉芽組織形成に必要な線維芽細胞、毛細血管の親和性を認める研究成果を認めた。骨欠損部に骨補填材としてサンゴ外骨格を移植した際、毛細血管の足場としてコラーゲン線維が形成され、続いて毛細血管が形成される。in vitroで毛細血管の外骨格を覆い、外骨格の内腔内に侵入する過程を形態学的に確認できたことは、サンゴ外骨格が骨補填材として臨床応用されることへの一助となる意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the affinity of the coral exoskeleton and cultured cells (especially for capillaries) for future clinical application. The experiments were performed in vitro and used biochemical and morphological techniques. Compared to the non-added group, human normal dermal fibroblasts cultured with the addition of the coral exoskeleton showed enhanced cell proliferation and collagen fiber production. On the other hand, in the group in which the coral exoskeleton skeleton was added to coculture of normal human dermal skin fibroblasts and human umbilical vein endothelial cells, formation of abundant capillaries around coral was observed.

研究分野：再生歯科医療

キーワード：サンゴ外骨格 骨補填材 コラーゲン 毛細血管 培養細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞培養を単層で行う二次元培養は *in vitro* での因子、細胞、薬剤などとの相互作用の観察や研究に便利な方法であるが、*in vivo* での細胞増殖とは異なる。実際の生体内においては、細胞は三次元的に増殖して組織や臓器を形成する。そのため生体内に近い培養環境を実現するために、二次元培養から三次元培養にパラダイムシフトが occurring。三次元培養に欠かせない足場材料は培養する組織によって異なり、培養組織は材料特性および足場特性によって制御される。細胞を *in vitro* で培養後移植して患者の失われた組織、臓器、特に骨を補填するという臨床応用の実現のためには、物理的強度を有す大規模な足場材料(スキャフォールド)を用いた三次元培養が必要である。一方で、三次元培養は培養組織サイズが大きくなるにつれて、循環系をもたないため、老廃物の蓄積により中心部が壊死するという問題を抱える。そのため足場材料には1 多孔性 2 連通性 3 気孔率 4 露出表面積 5 物理的強度といった性質が求められる。培養組織中心部に液体培地を浸透させるためには毛細血管の形成が重要である。三次元培養組織に毛細血管が形成できれば、中心部壊死という問題を改善できる可能性がある。

2. 研究の目的

既存の血管からの血管新生は、組織工学における重要なプロセスである。近年、臓器が大きな面積を損傷した場合、創傷治癒期間を促進するために、身体の外側に形成される組織工学血管移植片(TEVG)が注目を集めている。本研究の目的は、移植前に、サンゴ外骨格を用いて TEVG を作成することである。

3. 研究の方法

サンゴ外骨格は琉球大学理学部から提供された *Montipora digitata*(エダコモンサンゴ)を2 規定水酸化ナトリウムと次亜塩素酸ナトリウムで細胞成分を含めた徐タンパク処置を施した後十分に水洗した外骨格を高圧蒸気滅菌したものを用いた。

(1) サンゴ外骨格の微細構造：走査型電子顕微鏡(SEM)で観察。

(2) *Montipora digitata* とヒト正常皮膚線維芽細胞 (NHDF) およびヒト歯根膜線維芽細胞 (HPLF) との親和性：MTT 法を用いてサンゴ外骨格上で増殖した細胞(NHDF;ヒト正常皮膚線維芽細胞および HPLF;ヒト歯根膜線維芽細胞)、の細胞増殖能を培養後 1,3,7 日後に測定。

(3) サンゴ外骨格が線維芽細胞のコラーゲン産生能に与える影響：サンゴ外骨格を添加して NHDF を培養しヒドロキシプロリン分析を用いて定量して培養後 28 日に測定。SEM によってサンゴ外骨格上で増殖する細胞とコラーゲン線維を培養後 1,7,14,21 日後に観察。

(4) サンゴ外骨格とヒト毛細血管の親和性：ヒト正常皮膚線維芽細胞およびヒト由来血管内皮細胞の共培養にサンゴ外骨格を添加し 21 日後に 14 日後に蛍光免疫染色法でサンゴ周囲に形成された毛細血管を観察。

4. 研究成果

(1) サンゴ外骨格の微細構造

Montipora digitata:エダコモンサンゴ (Fig. 1)を走査型電子顕微鏡 (SEM)で微細構造を観察した(Fig. 2)。孔径およそ 200 μm 、多孔性で連通性である構造が観察された。



Fig. 1 肉眼像

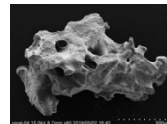


Fig. 2 SEM 像

(2) *Montipora digitata* とヒト正常皮膚線維芽細胞 (NHDF) およびヒト歯根膜線維芽細胞 (HPLF) との親和性

サンゴを骨補填材として骨欠損部に填入した後、毛細血管新生の足場となる NHDF および HPLF の細胞増殖 (Fig. 3, 4) を観察した。MTT 法ではサンゴ外骨格を添加して培養することで非添加の培養に比べて細胞増殖が亢進することが推察された。

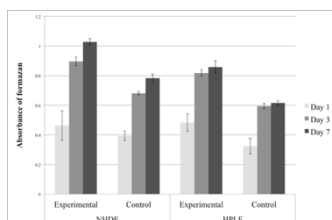


Fig. 3 *Montipora digitata* を添加した NHDF および HPLF の細胞増殖能の変化

(3) サンゴ外骨格が線維芽細胞のコラーゲン産生能に与える影響

コラーゲン線維の産生量 (Fig 5) を SEM で観察した。培養 1-7 日後ではサンゴ外骨格表面および内腔に細胞が増殖する様子を観察した。培養 14-21 日後ではサンゴ外骨格表面に増殖した細胞とサンゴ外骨格をコラーゲン線維が覆う様子を観察した。

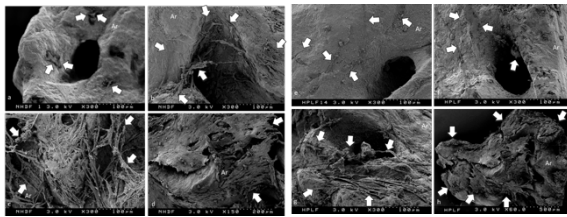


Fig. 4 *Montipora digitata* 顆粒上の NHDF および HPLF、コラーゲン線維

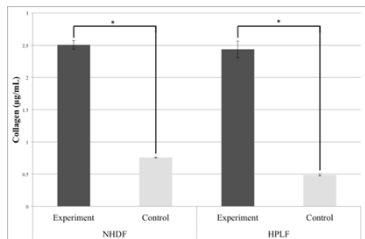


Fig. 5 *Montipora digitata* を添加した NHDF および HPLF のコラーゲン産生量の変化

NHDF および HPLF のどちらも *Montipora digitata* 顆粒を添加した群で非添加群に比べてコラーゲン産生量が亢進することが推察された。

(4) サンゴ外骨格とヒト毛細血管の親和性

ヒト正常皮膚線維芽細胞とヒト由来血管内皮細胞を共培養してサンゴを添加 21 日後にサンゴ外骨格周囲にネットワークを伴う毛細血管形成を免疫蛍光染色法で観察した (Fig. 6)。形成された毛細血管の最大幅径は幅径 (table 1) は、サンゴ外骨格を非添加群に比べておよそ 3 倍大きい値を示し、サンゴ外骨格の添加が毛細血管の成熟に関連する可能性が示唆された (table 1)。

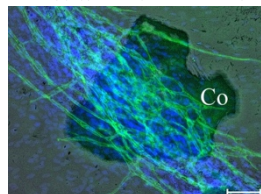


Fig. 6 サンゴ外骨格周囲に形成されたヒト毛細血管

table 1

	Minimum (μm)	Maximum (μm)	Mean (μm)
Control	1.3	20.95	10.79 ± 5.49
Coral	1.3	67.19	12.52 ± 9.91

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

1. Effect of Heating at 37°C and Peripheral Parenteral Nutrition as a Cell Preservation Solution in Cultured Human Periodontal Ligament Fibroblasts. Okamura T, Nishikawa T, Matsumoto H, Takeuchi T, Ikeda C, Dateoka S, Ono Y, Inami K, Matsumoto N, Higuchi S, Imai K, Tominaga K Nano Biomedicine 2018. 10(2):91-96. 査読有り
2. *Montipora digitata* exoskeleton derived aragonite particles are useful scaffold for tissue-engineered vascular graft in vitro. Okamura T, Uemura N, Baba S, Yasuda N, Yamashiro H, Imai K, Nishikawa T, Shimizu H, Shida M, Tominaga K, Tanaka A Nano Biomedicine 2017. 9(2):105-111. 査読有り
3. Effects of *montipora digitata* exoskeleton- derived aragonite particles on human fibroblasts for cell proliferation and collagen production in vitro. Okamura T, Takeuchi T, Honda S, Tominaga K, Naruse K, Morita S, Imai K, Masuno K, Ono Y, Nishikawa T, Tanaka A Journal of Oral Tissue Engineering 2017. 15(1):41-48. 査読有り
4. Comparative study of tissue affinity, chemical characteristics of cultured and natural coral as a bioabsorbable scaffold. Matsuda Y, Nishikawa T, Okamura T, Tominaga K, Wato M, Tabata H, Umeda M, Okusa N, Imai K, Tanaka A, Tamura I. Journal of Oral Tissue Engineering 2017. 14(3):164-170. 査読有り
5. Comparative study of physical and morphological characteristics of cultured and natural coral as a bone

augmentation scaffold. Nishikawa T, Okamura T, Masuno K, Matsumoto H, Hirose M, Uemura N, Yasuda N, Hidaka M, Baba S, Imai K, Tanaka A. Journal of Oral Tissue Engineering 2016. 14(2):107-113. 査読有り

〔学会発表〕（計6件）

1. 多孔質性カルシウム製材に浸透させた新規合成ペプチドの動態. 富永 和也, 岡村 友玄, 和唐 雅博, 西川 哲成, 田中 昭男. 第58回歯科基礎医学会学術大会 2016.
2. サンゴを足場材料として三次元培養された正常ヒト皮膚線維芽細胞および正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞におけるサンゴ表層カルシウムの局在変化. 岡村 友玄, 富永 和也, 和唐 雅博, 西川 哲成, 田中 昭男. 第58回歯科基礎医学会学術大会 2016.
3. エダコモンサンゴ由来アラゴナイトを足場として応用した正常皮膚線維芽細胞の長期培養. 岡村 友玄, 富永 和也, 和唐 雅博, 今井 弘一, 西川 哲成, 田中 昭男. 日本バイオマテリアル学会第11回関西若手研究発表会 2016.
4. Effects of aragonite particles derived from skeleton of *Montipora digitata* applied as a scaffold on cell proliferation and collagen fiber productivity of cultured human normal dermal fibroblasts. Okamura T, Tominaga K, Nishikawa T, Tanaka A. The 2017 American Society for Cell Biology (ASCB) | European Molecular Biology Organization (EMBO) Meeting 2017.
5. ヒト正常皮膚線維芽細胞の増殖およびコラーゲン線維産生能における *Montipora digitata* 由来アラゴナイトの影響. 岡村 友玄, 富永 和也, 西川 哲成, 今井 弘一, 田中 昭男. 第15回日本再生歯科医学会 2017.
6. CAD/CAM 技術によるサンゴ外骨格由来試作カスタムメイド骨補填材のイヌ顎骨への移植. 松田 哲史, 川添 堯彬, 馬場 俊輔, 西川 哲成, 岡村 友玄, 上村 直也, 田幡元. 第48回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 2018.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：異種骨補填材

発明者：西川哲成、岡村友玄、上村直也、田幡元、松田哲史、馬場俊輔、川添堯彬

権利者：大阪歯科大学

種類：特許

番号：特願2018-37336

出願年：2018年

国内外の別：国内

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。