

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22792000

 研究課題名（和文） 臨床応用を目指した羊膜を基質とした培養歯根膜由来細胞シートの
開発に関する研究

 研究課題名（英文） Development of the periodontal ligament cell sheets cultured on
amniotic membrane for clinical application

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：90398389

研究成果の概要（和文）：羊膜を用いた新たな臨床応用可能な培養細胞シートの開発を念頭に、羊膜上にて歯根膜由来細胞（PDL細胞）の培養を行った。歯根膜組織より分離培養したPDL細胞は、羊膜上にて増殖し、強固な細胞間接着装置および基底膜を有した細胞シートを形成した。実験動物への移植後においても、羊膜上培養PDL細胞は象牙質片上に付着・増殖し、歯根膜としての性質を保持しており、歯周組織を再生する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We developed the use of amniotic membrane tissue as a substrate for culturing periodontal ligament cells (PDL cells). Then, we cultured PDL cells on the tissue to develop a novel cultured PDL cell sheet. PDL cells, isolated and cultured from periodontal ligament tissue, were found to proliferate on the amniotic membrane tissue and form a sheet with tight cell-cell adhesion and a basement membrane. The cultured PDL cell sheet was placed on dentin slices for each amniotic membrane to be transplanted an experimental animal. The PDL cells adhered to the dentin slice, and the spindle-shaped periodontal ligament-like cells proliferated in several layers. Thus, the features of the periodontal ligament were retained even after transplantation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに羊膜の有用性に注目し、この羊膜を細胞培養基質として用いた研究を行ってきた。すでに当大学医学倫理審査委員会の許可（RBMR-R-19）を得、羊膜を基質とした培養口腔粘膜上皮細胞シートの作成方法を確立し、基盤研究(C)課題名「羊膜を基質とした培養口腔粘膜上皮シートの臨床応用」（平成 18-20 年度）、および基盤研究(C)課題名「羊膜上培養自己口腔粘膜上皮シートの多様な臨床応用に関する研究」（平成 21-23 年度）の分担研究者として、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を得た。これら研究結果より、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培養に応用することを立案した。

歯周病は成人の 8 割が罹患しているといわれており、歯周病等で失われた歯周組織の再生は歯科医療にとって大きな目標である。近年の歯科医学の進歩により歯周病の原因や機序が次第に明らかになりつつあり、歯周組織の再生には、新生歯根膜が重要であることは既に過去の研究より強く示されている。また、歯根膜組織を *in vitro* で培養し自家移植する方法が歯周組織再生に有効とされ、さらに培養基質を用いることで歯根膜由来細胞がより緊密に歯根面と接着し、有意に歯周組織の再生をみたと報告されている。ゆえに、研究代表者は歯根膜由来細胞の培養は適当な基質を用いることが重要と考え、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に着想した。

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。また、各種細胞の培養基底膜として適し、抗炎症作用・感染抑制作用などを有し、他の組織にはない特徴を備えている。さらには生物学的材料として皮膚移植、膈形成術、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る報告があり、その移植材料としてだけでなく、培養基質としても高い有用性・有効性が注目されている。

研究代表者は、これまでに羊膜を基質に用いた歯根膜由来細胞の培養を行っており、シート状培養が可能であることを確認した。また、ビーグル犬を用いた実験動物にて、羊膜上培養歯根膜由来細胞シートをルートプレニングした露出根面へ自家移植し、移植部位に新生セメント質様硬組織および新生骨を観察したことで、同培養シートは歯周組織を再生する能力を持つことを示した。さらに、培養ヒト歯根膜由来細胞は羊膜上にて増殖し、デスモゾームやタイト結合といった強固な細胞間接着装置が存在することを報告した（第 54 回日本口腔外科学会総会・学術大会、平成 21 年、ゴールドリボン賞受賞）。

これら研究成果に加え、臨床応用可能な羊膜上培養歯根膜由来細胞シート作成の最適化、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、羊膜上の細胞培養系にて歯根膜由来細胞の培養を行い、羊膜上培養歯根膜由来細胞シート作成のための最適化を

行い、培養シートの組織学的・免疫組織学的検討を加えることである。さらに、移植後においても培養シートが正常組織の構造や性質を保持しているかを確認するためのデータ集積を行い、経時的な組織動態についても検討を加えることで、新たな臨床応用可能な培養シートの開発を行うことである。

3. 研究の方法

本研究における、抜去歯からの歯根膜組織、象牙質片および羊膜の研究利用について、患者に十分な説明を行い、同意を得た上で実施した。また、京都府立医科大学医学倫理審査委員会の許可 (C-1111) を得た上で実施した。

(1) 実験材料

① 羊膜

帝王切開予定の妊婦から羊膜を採取した。羊膜提供者は、全身的に合併症のな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、抗菌薬を含む洗浄液で洗浄した後、保存液中に浸した状態で -80°C 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かった場合は、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 (平成21年3月16日付承認、受付番号:09-03) を受けた。

羊膜は、実験使用前に解凍し、羊膜上皮細胞を剥離、除去し実験に使用した。

② 歯根膜由来細胞 (PDL 細胞)

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。抜去歯を抗菌薬添加 PBS(-)にて洗浄後、歯根膜以外の細胞の混入を可及的に避けるため、歯根中央約3分の1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%のウシ胎仔血清 (FBS) および抗菌薬を添加した標準的な細胞培養液を用い、3~4継代培養したものを PDL 細胞とした。

(2) 実験方法

① 羊膜上培養 PDL 細胞シートの作成

PDL 細胞浮遊液を作製し、静置した羊膜上に播種し約2週間の培養を行った。作成した羊膜上培養 PDL 細胞が、どの程度正常歯根膜に近いのか、また上皮を剥離・除去した羊膜が PDL 細胞の培養の基質として適しているかを検討した。正常歯根膜は、紡錘形で線維芽細胞様を呈した形態的な特徴を持った細胞が層をなしている。また、歯根膜は間葉系細胞を含み、その細胞間にはデスモソームやタイト結合といった強力な細胞接着装置が存在するとされる。羊膜上にて培養した PDL 細胞においても、同様の細胞形態を呈しているか、さらには PDL 細胞が羊膜上で増殖し、細胞間接着構造が形成されるか検討を行った。

② 羊膜上培養 PDL 細胞シートの移植

上記にて作成した羊膜上培養 PDL 細胞シートを羊膜ごと象牙質切片上に静置し、実験動物 (ヌードマウス) の腎皮膜下への移植を行った。移植後4週間にて摘出し、*in vivo* における羊膜上培養 PDL 細胞の動態について検討した。

4. 研究成果

(1) 羊膜上培養 PDL 細胞シート

PDL 細胞は羊膜上にて層状構造を示し、

細胞増殖していた。電子顕微鏡像にて、表層および下層は平坦な細胞形態を示し、なおかつ約 5~6 層に重層化していた。蛍光抗体法での免疫染色では、細胞増殖マーカー (Ki-67)、間葉系細胞マーカー (ビメンチン陽性細胞) の局在が認められた。培養細胞間においてはデスモソーム構成タンパク (デスモプラキン)、タイト結合構成タンパク (ZO-1) の発現が認められ、電子顕微鏡像では、隣在する細胞間にデスモソーム様構造を認め、羊膜上培養 PDL 細胞にはデスモソームやタイト結合といった細胞間接着装置が存在することが示された。また、培養細胞の基底部分 (細胞-羊膜境) においては、基底膜構成細胞接着タンパク (ラミニン 5/10)、基底膜構成コラーゲン (IV 型/VII 型コラーゲン) の発現が認められ、電子顕微鏡像では基底部分の細胞は羊膜組織中に入り込んでおり、羊膜上培養 PDL 細胞は基底膜を構成して羊膜に強固に接着していることがわかった。以上より、PDL 細胞は羊膜上にて増殖して 1 枚の細胞シートを形成し、なおかつ歯根膜様の性質の一部を保持していることがわかった。

(2) 羊膜上培養 PDL 細胞シートの移植後における細胞動態

羊膜上培養 PDL 細胞は象牙質片上に付着しており、4~5 層の紡錘形の歯根膜様細胞が層状に増殖しており、免疫染色にて象牙質切片周囲にビメンチン陽性細胞の局在が認められた。

本研究では、PDL 細胞は羊膜上にて増殖し、歯根膜組織の性質を保持していた。また、PDL 細胞間にみられた強固な細胞間接着装置の存在は、培養細胞が 1 枚の細胞シートとしての構造的性を維持していることを示しているものと考えられた。また、羊膜上にて基底膜を構成して接着していた

ことで、羊膜が PDL 細胞の分化と増殖に適切な基質であることを示していると考えられた。羊膜上培養 PDL 細胞は、マウス腎皮膜下への移植後においても、羊膜を基質とすることで細胞増殖の足場が形成され、象牙質片面と緊密に接着し、歯根膜様細胞の新生がみられたものと考えられた。また、間葉系細胞マーカーの発現が確認されたことで、歯根膜としての性質を保持していることが明らかとなった。以上より、羊膜上培養 PDL 細胞シートは歯周組織の再生を促進する細胞を有しているものと考えられた。

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 3 件)

- ① 雨宮 傑、中村 隆宏、本城 賢一、熊本 園子、足立 圭司、山本 俊郎、木下 茂、金村 成智. ヒト羊膜を用いた新たな歯周組織再生法の開発. 日本歯科医学会誌, 32: 44-48, 2013. 査読有.
- ② Narisato Kanamura, Takeshi Amemiya, Toshiro Yamamoto, Kenji Mishima, Masahiro Saito, Takashi Tsuji, Takahiro Nakamura. Dental regenerative therapy using oral tissues. Web Journal Anti-Aging Medicine, 9(1): 14-23, 2012. 査読有, [http://www.anti-aging.gr.jp/english/pdf/2012/9\(1\)1423.pdf](http://www.anti-aging.gr.jp/english/pdf/2012/9(1)1423.pdf).
- ③ 雨宮 傑、足立 圭司、赤松 佑紀、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おける免疫組織化学的検討. 日本歯科保存学雑誌, 53(2): 214-221, 2010. 査読

有.

[学会発表] (計 11 件)

海外

- ① Takeshi Amemiya, Takahiro Nakamura, Keiji Adachi, Toshiro Yamamoto, Narisato Kanamura. Cultivated of periodontal ligament-derived cells on amniotic membrane. The 89th General Session and Exhibition of the International Associations for Dental Research (IADR), San Diego, USA, 平成 23 年 3 月 17 日.

国内

- ② 雨宮 傑、山本俊郎、金村成智. 羊膜上培養歯根膜由来細胞を用いた骨再生に関する免疫組織学的検討. 第 33 回日本炎症・再生医学会、福岡、平成 24 年 7 月 5 日.
- ③ 熊本園子、雨宮 傑、本城賢一、足立圭司、西垣 勝、大迫文重、金村成智. 羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞による歯周組織再生に関する検討. 日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会 (第 136 回)、宜野湾、平成 24 年 6 月 29 日.
- ④ 雨宮 傑、足立圭司、山本俊郎、金村成智. 羊膜を用いた培養歯根膜由来細胞の免疫組織化学的および電子顕微鏡的観察. 第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、平成 23 年 10 月 21 日.
- ⑤ 雨宮 傑、山本俊郎、金村成智. 歯周組織再生を目指した羊膜上培養歯根膜由来細胞の免疫組織学的検討. 第 32 回日本炎症・再生医学会、京都、平成 23 年 6 月 3 日.
- ⑥ 雨宮 傑、足立圭司、大迫文重、高橋慶太、西出直人、山本俊郎、金村成智. 歯周組織の再生を目指した羊膜上培養ヒ

ト歯根膜由来細胞の作成. 第 11 回日本抗加齢医学会総会、京都、平成 23 年 5 月 28 日.

- ⑦ 雨宮 傑、足立圭司、西垣 勝、山本俊郎、金村成智. 羊膜を基質とした培養ヒト歯根膜由来細胞の免疫組織化学的および電子顕微鏡的観察. 第 54 回春季日本歯周病学会学術大会、福岡、平成 23 年 5 月 27 日.
- ⑧ 雨宮 傑、中村 隆弘、足立 圭司、山本 俊郎、木下 茂、金村 成智. ヒト羊膜を用いた新たな歯周組織再生法の開発. 日本歯科医学会・第 27 回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い、東京、平成 23 年 1 月 8 日.
- ⑨ 雨宮 傑、足立 圭司、赤松 佑紀、西垣 勝、大迫 文重、坂下 敦宏、中村 亨、山本 俊郎、金村 成智. 羊膜を培養基質とした歯根膜由来細胞の免疫組織化学的研究. 日本歯科保存学会 2010 年度秋季学術大会 (第 133 回)・第 12 回日韓歯科保存学会学術大会、岐阜、平成 22 年 10 月 28 日.
- ⑩ 雨宮 傑、足立 圭司、赤松 佑紀、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に対する免疫組織学的研究. 第 64 回日本口腔科学会学術集会、札幌、平成 22 年 6 月 24 日.
- ⑪ 足立 圭司、雨宮 傑、赤松 祐紀、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の作成および免疫組織化学的検討. 日本歯科保存学会 2010 年度春季学術大会 (第 132 回)、熊本、平成 22 年 6 月 5 日.

[その他]

受賞学術賞

- ① 雨宮 傑. 羊膜を用いた培養ヒト歯根膜

由来細胞に対する免疫組織学的研究. 第
64 回日本口腔科学会学術集会、札幌、平
成 22 年 6 月 24 日. 第 64 回日本口腔科学
会学会賞優秀発表賞.

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：90398389

(2) 研究協力者

中村 隆宏 (NAKAMURA TAKAHIRO)
同志社大学・生命医科学部・准教授
研究者番号：30411078

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：90613563

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：40347472

木下 茂 (KINOSHITA SHIGERU)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：30116024

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：70204542