

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462987

研究課題名(和文)細胞シートを用いた下顎頭再生への試み

研究課題名(英文)The study of the mandibular condyle regeneration using the cell sheet

研究代表者

中塚 美智子 (NAKATSUKA, Michiko)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70368158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞による軟骨細胞分化および再生について検討するため、ラット骨髄由来細胞を三次元培養した。雄性ラット骨髄由来細胞(1000000 cells/ml)を50 ml遠沈管に播種し、Dulbecco's modified Eagle's medium - high glucoseに1% FBS、1% ITS、0.1  $\mu$ M dexamethasone、50  $\mu$ g/ml ascorbic acid、10 ng/ml TGF- $\beta$ 3を1 ml添加して培養した。

その結果三次元培養において3週後にアルシアンブルー、Sox9およびアグリカンにより著明に染色された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the chondrocyte differentiation ability of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, we experimented with the cells that formed spheroids in vitro. The cells were cultured into cryo vials (100000 cells/ml) and incubated in culture media (1% FBS, 1% insulin - transferrin - selenite (ITS), dexamethasone (0.1  $\mu$ M), sodium pyruvate (1mM), TGF- $\beta$ 3 (10 ng/ml-containing). The differentiation of the spheroids that the cells formed (day 21 specimen) was assayed. Cell differentiation was evaluated by Alcian blue staining. We also examined immunohistochemically by using Sox9 and aggrecan antibodies. In the experimental group, these structures showed positive reaction of Alcian blue, Sox9, and aggrecan. On the other hand, there were no evidences of chondrocyte differentiation in the control group. Therefore, these results suggest that spheroid formation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells might be useful in chondrocyte regeneration therapy.

研究分野：口腔組織学

キーワード：骨髄由来細胞 軟骨分化

## 1. 研究開始当初の背景

下顎骨は生後特に下顎頭部が活発に成長し、人類特有の顎骨形態を示す。しかし若年性リウマチや顎関節症などにより下顎頭部の軟骨内骨形成が障害あるいは抑制されると、下顎頭の変形や重篤な顎変形症を起しかねない(Schellhas, Am J Orthod., 104, 51-59, 1993, 溝口, 東北歯誌, 18, 1-21, 1999)。また、加齢により下顎頭軟骨の変性やすり減りが生じることによって変形性顎関節症を引き起こすことがある。変形性顎関節症では関節痛や関節雑音、開口障害が生じ QOL が大きく損なわれるが、関節軟骨は再生能が乏しく、自然修復が期待できない。従って、細胞移植などの再生療法により従来の形態と機能に限りなく近い状態に戻す意義は非常に大きい。

膝関節や股関節では近年自己軟骨移植法などの再生工学を応用した治療が行われているが、以前は軟骨下の骨組織にドリルで穴を開け、骨髄間葉系幹細胞を誘導して治療していた。しかしこの方法では硝子軟骨ではなく線維軟骨が形成されるため、長期的に軟骨の変性が起こることが問題であった。

本研究ではこの現象に着目し、骨髄由来間葉系幹細胞を用いて積極的に線維軟骨形成を誘導し、下顎頭の再生を目指すことにした。我々はこれまでに下顎頭表層細胞の初代培養を行い、EGF および bFGF 添加後に線維層と軟骨の細胞が誘導されることを明らかにした。(小児口腔外科 8, 6-11, 1998 ; 小児口腔外科 10, 1-7, 2000)。また、単層培養およびゲル包埋培養により骨髄由来間葉系幹細胞から線維性組織を伴う機能的な石灰化硬組織の誘導ならびに三次元構築法を確立(Mikami et al., J Oral Tissue Engin 8, 60-73, 2010; Iwai et al., Okajimas Folia Anat Jpn 88,

133-140, 2012; 三上ら, 再生歯誌 11, 1-11, 2013)している。

本研究は骨髄由来間葉系幹細胞の培養系に種々の成長因子を添加し、線維層ならびに線維軟骨層の細胞への分化誘導法を検討するために計画された。さらに誘導した細胞から作製した二種類の細胞シートを下顎頭欠損部へ応用し、細胞を用いた下顎頭再生療法の開発による咀嚼機能維持、回復を目指す基礎研究として企図した。

## 2. 研究の目的

下顎頭の変形や重篤な顎変形症、変形性顎関節症などは関節痛や開口障害が生じ、QOL が大きく損なわれる。関節軟骨は再生能が乏しく、自然修復が期待できないため、細胞移植などの再生療法の開発が期待されている。

近年顎骨再生医療が進み、本来の形態に近い顎骨の再建が可能になってきた。しかし、下顎頭は表層に線維層および線維軟骨層を有し、再生手法も確立されていないため再生が極めて困難である。

本研究は間葉系幹細胞の三次元培養による軟骨再生に向けた基礎研究を行う目的で、骨髄から採取した細胞を用い、下顎頭の線維層ならびに線維軟骨層を形成する細胞への効率的な分化誘導法について検討した。

## 3. 研究の方法

本研究では細胞培養系の確立を目指すため、細胞の採取や組織の観察等が容易なラットを用いた。ラット脛骨骨髄から細胞を採取後、各種成長因子を添加し、細胞形態や基質の発現などから分化能を評価した。骨髄細胞は培養 dish に接着したものを間葉系幹細胞とした。

当初線維層ならびに線維軟骨層の細胞への分化誘導法を検討し、さらに誘導した細胞から作製した二種類の細胞シートを下顎頭欠損部へ応用する方向で検討していた。しか

し、骨髄由来間葉系幹細胞を軟骨形成細胞に分化させる実験に当初の予想を大幅に上回る時間を費やした。そこで我々は本研究を以下に大別して行った。

#### (1) 培養法の確立

Wistar ラット (雄性、5 週齢) の脛骨骨髄から細胞を採取し、培養法を確立した。細胞は継代を繰り返すと分化してしまうため、継代 1-2 回の細胞のみを使用した。

培地には 10% ウシ胎児血清 (FBS)、2mM L-グルタミン、50ng/ml 線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、1x の抗菌薬を添加して培養を行った。

#### (2) 平面培養

(1) で培養した細胞を  $2.0 \times 10^4$  個/ml の濃度で 48 ウェルプレートに播種した。培養は 37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で行った。培地は、実験群は Dulbecco's modified Eagle's medium - high glucose、1x の抗菌薬、1% または 10% FBS、1% ITS、0.1 μM デキサメタゾン、50 μg/ml アスコルビン酸、10 ng/ml トランスフォーミング増殖因子 (TGF) β-3 を添加して培養した。対照群は TGF β-3 を添加せずに培養した。培養期間は 5 週間であった。

#### (3) 3次元培養 (図1)

3次元培養 (細胞スフェロイド形成培養) を行うため、(1) で培養した細胞を  $1.0 \times 10^6$  個/ml の濃度で 50ml 遠沈管に播種した。培養は 37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で行った。培地は、実験群は Dulbecco's modified Eagle's medium - high glucose、1x の抗菌薬、1% FBS、1% ITS、0.1 μM デキサメタゾン、50 μg/ml アスコルビン酸、10 ng/ml TGF β-3 を添加して培養した。対照群は TGF β-3 を添加せずに培養した。培養期間は 3 週間であった。

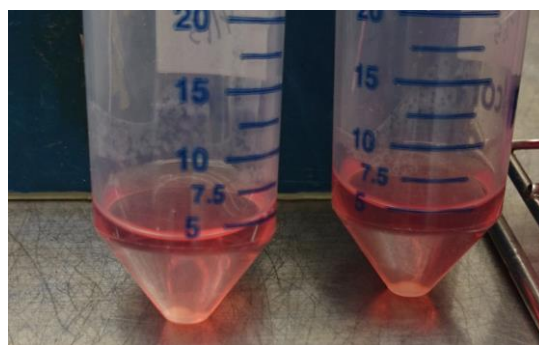


図1：3次元培養 (細胞スフェロイド形成培養)

#### (4) 観察及び解析

平面培養では培養期間終了後にアルシアンブルー染色を行った。また II 型コラーゲンおよびアグリカンの発現を免疫組織化学的染色によって検索した。

3次元培養では、培養期間終了後に凍結切片を作製し、アルシアンブルー染色を行うとともに、I 型および II 型コラーゲン、アグリカン、Sox9 の発現を免疫組織化学的染色によって検索した。

### 4. 研究成果

#### (1) 平面培養 (図2-4)

①1% FBS の実験群では、分化誘導開始 21 日後において球形の骨髄由来間葉系幹細胞の増殖が顕著に認められたが (図2黄色矢印)、それ以外の群では球形骨髄由来間葉系幹細胞は著明には認められなかった。

②10% FBS の対照群では、分化誘導開始 14 日後において石灰化が顕著に認められたが (図2白色矢印)、実験群ではあまりみられなかった。

③1% FBS の実験群と 10% FBS の実験群を比較すると、分化誘導開始 35 日後では 10% FBS の細胞は死滅しているものもみられたが、1%FBS の細胞ではほとんど認められなかった。

④1% FBS の対照群と 10% FBS の対照群はともに線維芽細胞様の形態を示した。

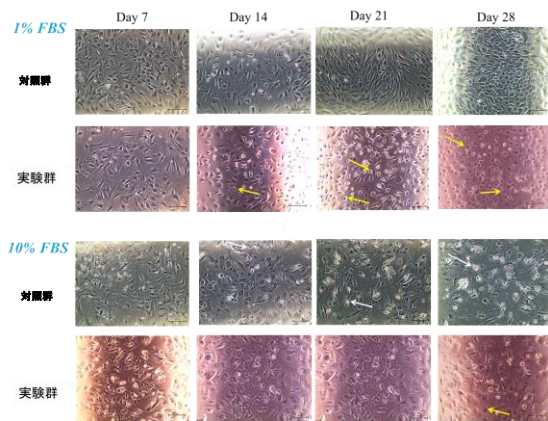


図2：平面培養（1%FBS 添加培地（上）および10%FBS 添加培地）

以上より、軟骨細胞への分化誘導実験では10% FBS 添加培地よりも1% FBS 添加培地の方が有用であると示唆された。従って、以後の実験では1% FBS 添加培地を使用した。

次に1% FBS 添加培地を用いて分化誘導実験を行った。分化誘導開始2週間後より、実験群はアルシアンブルーにより染色された。

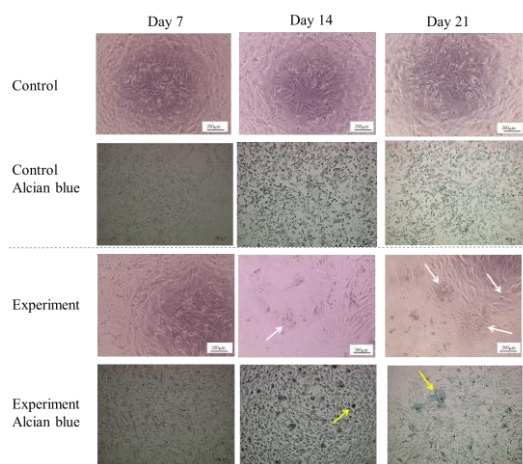


図3：平面培養（アルシアンブルー染色）

また分化誘導21日後、実験群においてII型コラーゲン免疫陽性組織、またアグリカン免疫陽性組織が観察された。しかし、対照群においては細胞の形態が未分化の骨髄由来間葉系幹細胞の形態に似ていた。

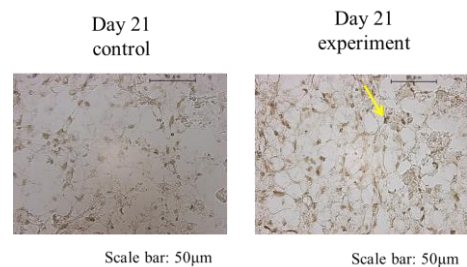


図4：平面培養（アグリカンの免疫組織化学的染色）

## (2) 3次元培養（図5）

実験群では、三次元培養において3週後にアルシアンブルーより著明に染色された。またI型およびII型コラーゲン、アグリカン、Sox9免疫陽性組織が観察された。対照群では認められなかった。

さらに以下の結果が得られた。

①遠沈管内に細胞スフェロイドを形成していた。スフェロイドの直径は1mm前後であった。

②対照群では培養開始2-3週間後に漸くスフェロイドを形成するものが多かった。多くの細胞が確認できるが、アルシアンブルーにより染色された細胞は観察できなかった。一方、実験群ではアルシアンブルーにより染色された細胞が観察された。染色された細胞はスフェロイド中心部より周辺部において著しく認められた。

③対照群、実験群ともにスフェロイド中心部では細胞の形態が不明瞭であった。

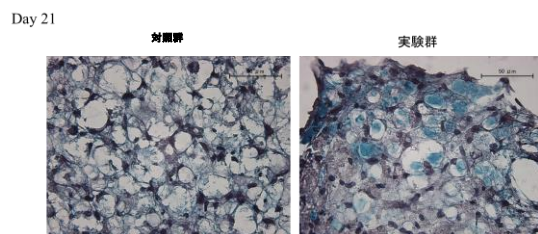


図5：3次元培養（アルシアンブルー染色）

以上(1)および(2)より、間葉系幹細胞を成長因子を添加した培地により培養すると、軟骨細胞へ分化誘導されることが示唆された。

## 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)

[学会発表] (計3件)

①中塚美智子, 細矢明宏, 隈部俊二, 田村 功.  
間葉系幹細胞の三次元培養による軟骨再生  
に向けた基礎研究、第122回日本解剖学会総  
会・全国学術集会、2017.3.28 長崎大学(長  
崎県長崎市)

②NAKATSUKA M, HOSOYA A, KUMABE S, TAMURA  
I. Bone marrow-derived mesenchymal stem  
cells are differentiated into  
chondrocyte-like cells by forming  
spheroids in vitro. 第58回歯科基礎医学  
会学術大会・総会、2016.8.26 札幌コンベ  
ンションセンター(北海道札幌市)

③中塚美智子, 松田哲史, 細矢明宏, 隈部俊  
二. 骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨細胞への  
分化誘導. 第57回歯科基礎医学会学術大会・  
総会、2015.9.13 朱鷺メッセ(新潟県新潟  
市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中塚 美智子 (NAKATSUKA, Michiko)  
大阪歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 70368158

### (2) 研究分担者

隈部 俊二 (KUMABE, Shunji)  
大阪歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 30288774

乾 千珠子 (山本 千珠子)  
(INUI-YAMAMOTO, Chizuko)  
大阪大学・歯学研究科・助教  
研究者番号: 00419459

細矢 明宏 (HOSOYA, Akihiro)  
松本歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 70350824