

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11261

研究課題名(和文) 骨再生医療のための新規羊膜上培養骨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 human periosteal-derived cell sheets cultured on an amniotic membrane substrate for bone regeneration.

研究代表者

金村 成智 (Kanamura, Narisato)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70204542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新規骨膜由来細胞シートの作製を念頭に、羊膜上にて骨膜由来細胞の培養を行い、同培養シートについて検討を加えた。羊膜は、帝王切開時の胎盤より採取したものを研究に供し、骨膜細胞は、歯槽骨上にある組織を骨膜組織より骨膜由来細胞を得、羊膜上にて培養を行った。結果、骨膜由来細胞は羊膜上で1枚の細胞シートを形成して増殖しており、羊膜は培養に適切な基質であることが示唆された。また、同細胞シートにて骨芽細胞が産生するタンパクの発現を認め、in vivoの環境下でもその性質を保持していた。羊膜上培養骨膜由来細胞シートは骨再生能、すなわち歯周組織再生を促進する細胞が含まれている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Periosteal-derived cells (PDCs) were cultured on AM to generate novel periosteal cell sheets, and the kinetics of the cell sheets were immunohistochemically investigated in vivo. The AM was collected from the placenta during a caesarean section. For PDCs, primary culture of the periosteal tissue was passaged 3-4 times. These cells were cultured on AM. The resulting culture sheets were transplanted under the renal capsules of nude mice, and were removed after 4 weeks.

PDCs proliferated on AM, forming single cell sheets, which demonstrates that AM is suitable as a culture substrate. The periosteum contains cells that have the ability to differentiate into osteoblasts and osteocytes. The cell sheets expressed osteoblast proteins, which were maintained even in an in vivo environment.

研究分野：歯学・外科系歯学

キーワード：移植・再生医療 再生医学 細胞・組織 歯学

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らはこれまでに羊膜の培養基質としての有用性に着目し、羊膜は骨膜由来細胞の培養の基質として適していることを明らかにしてきた。

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。骨膜組織は、その速い増殖力から歯周組織の再生における最適な細胞の供給源となる可能性を秘めているとされ、骨膜細胞による骨再生医療への有用性が期待されている。骨膜細胞を用いた歯周組織の再生において、適切な細胞の足場(基質)と増殖因子の存在が骨形成に必要とされ、骨膜細胞の培養基質の選択は重要な要素である。そこで、われわれは骨膜由来細胞の培養の基質として、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。

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。そこで研究代表者らは、基質として羊膜を用いた羊膜は、胎盤の最表層を覆う薄膜で、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あり、倫理的・技術的に入手が容易である。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。そして本研究にて研究代表者らは、この羊膜を培養基質として用いた骨膜由来細胞の骨分化誘導培養を行い、骨再生を目的とした新規培養骨膜由来細胞シート作製のための検討を加えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者らが確立した羊膜上の骨膜由来細胞培養系を応用して、歯

周組織の再生(骨再生)をめざした新規培養骨膜由来細胞シートの作製を行うことである。すなわち、羊膜上にて骨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新生骨を再生する能力を有しているかを確認するためのデータ集積を行い、検討を加えた。

3. 研究の方法

羊膜は、帝王切開時の胎盤より採取したものを研究に供し、骨膜組織は、口腔外科手術時の粘膜骨膜弁作製時に、歯槽骨上にある組織を骨膜組織として採取した。得られた骨膜組織の初代培養を行い、3~4代継代したものを骨膜由来細胞とした。得られた細胞を、上皮細胞を剥離・除去した羊膜上に播種し、骨分化誘導培地にて約3週間の培養を行った。上記にて得られた培養シートを、ヌードマウス腎被膜下への移植を行い、4週間後に摘出し、H-E染色、ならびに免疫染色を行った。なお、対照群は羊膜のみとした。

なお、骨膜組織の採取および羊膜の実験への利用については、患者に十分な説明を行い、同意を得たうえで実施した。また、本研究は京都府立医科大学医学倫理審査委員会ならびに京都府立医科大学動物実験委員会にて承認を得、ヘルシンキ宣言を遵守して行った。

4. 研究成果

骨膜由来細胞は羊膜上にて層状構造を示し、免疫染色像では細胞増殖マーカーである Ki-67、間葉系細胞マーカーである vimentin、骨芽細胞マーカーである osteocalcin の発現が認められた。また、デスモソームのマーカーである desmoplakin およびタイト結合のマーカーである ZO-1 が発現し、細胞シートを形成していた。また、羊膜上培養骨膜由来細胞の腎皮膜移植後においても vimentin、

osteocalcin の発現を認め、その性質を保持していた。一方、対照群（羊膜のみの移植）においては、いずれの発現も認めなかった。

以上より、羊膜上培養骨膜由来細胞シートは骨再生能、すなわち歯周組織再生を促進する細胞が含まれている可能性が示された。しかしながら、石灰化物質の存在は認められず、今後、われわれは骨再生を目的とした新規骨膜由来培養シート作製のための培養方法の最適化、ならびに長期移植後における *in vivo* での細胞動態および基質の変化についての検討を加える必要があると考えられた。

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)

雨宮 傑 . 歯周組織再生を目指したヒト羊膜を用いた新たな培養細胞シートの開発 . 日本歯科保存学雑誌 . 査読無 . 60 巻 6 号 , 2017 , 270-272, DOI: 10.11471/shikahozon.60.270.

Amemiya T, Endo Y, Asai T, Adachi T, Adachi K, Nishigaki M, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N. Development of human periosteal-derived cell sheets cultured on an amniotic membrane substrate. 日本歯科保存学雑誌 . 査読有 . 59 巻 5 号 , 2016, 394-401, DOI: 10.11471/shikahozon.59.394.

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.

〔学会発表〕(計 11 件)

雨宮 傑, 足立哲也, 遠藤悠美, 市岡宏顕, 足立圭司, 大迫文重, 山本俊郎, 金村成智. ヒト歯根膜細胞シートの成長因子産生に羊膜が及ぼす影響について . 日本歯科保存学会 2017 年度春季学術大会 (第 146 回), 平成 29 年 6 月 9 日, リンクステーションホール青森, 青森県・青森市 .

Amemiya T, Adachi T, Adachi K, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N. Cultivate of periosteal-derived cell sheets on an amniotic membrane substrate. 39th Asia Pacific Dental Congress, 平成 29 年 5 月 22-25 日, Convention and Exhibition Center at The Venetian Resort Macau, Macau, China.

Yamamoto T, Honjo K, Amemiya T, Asai T, Kita M, Kanamura N. Bone differentiation induction of dental pulp-derived cell sheet cultured on human amniotic membrane and its application to alveolar bone regeneration. 39th Asia Pacific Dental Congress, 平成 29 年 5 月 22-25 日, Convention and Exhibition Center at The Venetian Resort Macau, Macau, China.

Adachi K, Amemiya T, Adachi T, Nishigaki M, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N. Search for genes involved in periodontal tissue regeneration expressed by periodontal ligament cell sheets cultured on amniotic membrane substrate, 39th Asia Pacific Dental Congress, 平成 29 年 5 月 22-25 日, Convention and Exhibition Center at The Venetian Resort Macau, Macau, China.

雨宮 傑, 足立哲也, 足立圭司, 大迫文

重, 山本俊郎, 金村成智. 羊膜基質がヒト歯根膜線維芽細胞シートの成長因子産生に与える影響について. 第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 平成 29 年 4 月 27 日, ひめぎんホール, 愛媛県・松山市.

Amemiya T, Adachi T, Asai T, Adachi K, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N. Human periosteal-derived cell sheets cultured on amniotic membrane substrate. 95th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR), 平成 29 年 3 月 24 日, Moscone West Center, San Francisco, CA, USA.

Yamamoto T, Honjo K, Nishigaki M, Amemiya T, Kita M, Kanamura N. Examination of implanted dental pulp-derived cell sheets cultured on amnion. 94th General Session and Exhibition of the International Association of Dental Research (IADR), 平成 28 年 6 月 22-25 日 COEX, Seoul, Korea.

Amemiya T, Adachi T, Adachi K, Nishigaki M, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N. Immunohistochemical investigation of periosteal-derived cell sheet cultured on amnion. 38th Asia Pacific Dental Congress, 平成 28 年 6 月 17-19 日, Hong Kong Convention and Exhibition Centre, Hong Kong, China.

Adachi K, Amemiya T, Adachi T, Nishigaki M, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N. Examination of osteogenic potential in nude mice transplantation of the periodontal ligament-derived cell sheet cultured on amnion. 38th Asia Pacific Dental Congress, 平成 28

年 6 月 17-19 日, Hong Kong Convention and Exhibition Centre, Hong Kong, China.

雨宮 傑, 足立哲也, 遠藤悠美, 市岡宏顕, 足立圭司, 西垣 勝, 大迫文重, 山本俊郎, 金村成智. 羊膜を培養基質とした培養歯根膜由来細胞シートにおける歯周組織再生に関わる因子の検索. 日本歯科保存学会 2016 年度春季学術大会 (第 144 回), 平成 28 年 6 月 10 日, 栃木県総合文化センター, 栃木県・宇都宮市.

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 北九州国際会議場, 福岡県・北九州市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

本城 賢一 (HONJO, Ken-ichi)
京都府立医科大学・医学研究科・特任助教
研究者番号: 0 0 7 5 6 8 7 7
辞退: 平成 28 年 3 月 18 日

足立 哲也 (ADACHI, Tetsuya)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：10613573
追加：平成28年3月18日

(3)研究協力者

外園 千恵 (SOTOZONO, Chie)
中村 隆宏 (NAKAMURA, Takahiro)
足立 圭司 (ADACHI, Keiji)