

平成30年6月14日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20535

研究課題名(和文) 舌筋由来幹細胞とbioactive scaffoldを用いた新規骨再生法の開発

研究課題名(英文) Development of new bone regeneration method using the tongue muscle-derived stem cells and bioactive scaffold

研究代表者

梅田 浩嗣 (UMEDA, Hirotsugu)

山口大学・医学部附属病院・診療助教(4日/週)

研究者番号：90610618

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)：舌筋由来Sca-1陽性細胞(MTDSC)よりもヒト歯髄幹細胞(hDPSC)を用いてNanog遺伝子発現を増強させた細胞(hDPSC-Nanog)の方が、より高い骨分化能を示した。また、気孔性炭酸アパタイトフォーム、ゼラチン炭酸アパタイトフォーム、GC研究用scaffold(GC)ならびにβ-TCP強化型ゼラチンスポンジ(MedGel)と比較して、bFGF徐放型bioactive scaffoldをscaffoldとしてヌードマウス皮下に埋入し、骨分化誘導をかけたhDPSC-Nanogを注入した方が、途中で異物として排泄されることなく、最も良好な骨様組織の形成につながった。

研究成果の概要(英文)：The hDPSC-Nanog showed higher bone differentiation ability than MTDSC-Nanog when we compared MTDSC-Nanog to hDPSC-Nanog. Next, we developed pore-related apatite foam carbonate, gelatine apatite foam carbonate, bFGF controlled release type bioactive scaffold, scaffold (GC) for GC studies and β-TCP reinforcement type gelatin sponge (MedGel). Then, we inserted each scaffold under the skin of nude mice, and injected each transfectant treated with bone differentiation medium into each scaffold. The pore-related apatite foam carbonate and gelatine apatite foam carbonate were eliminated from the body as exogenous material over a period 3 weeks after insertion. On the other hand, scaffold for GC studies and β-TCP reinforcement type gelatin sponge were not eliminated from the body as exogenous material over a period a month after insertion. However, the combination with hDPSC-Nanog and FGF2 controlled release type bioactive scaffold was the best on formation of the bone-like tissue.

研究分野：外科系歯学

キーワード：Nanog bone-like tissue

## 1. 研究開始当初の背景

口腔外科的疾患の治療により失った顎骨の再建は、咬合回復につながり QOL の観点からも大変重要である。そこで我々は、以前から骨欠損部への骨再生を bone tissue engineering の基本戦略から、骨再生の足場となる基質や骨再生の場所を確保するための材料についての開発研究(気孔性アパタイト焼結体)(Biomaterials 2002, Biomaterials 2002)と、骨再生に必要な細胞に関しては骨髄細胞に含まれる間葉系幹細胞を用いて scaffold 内で分化誘導し骨再生に関する検討を行ってきた(J Mater Sci Mater Med 2006)。しかしこれまでの実験結果では、骨髄から採取される骨髄間葉系幹細胞は非常に少なく、骨芽細胞様細胞までの分化に長時間を要した。さらに、開発研究した気孔性アパタイトが scaffold として細胞を保持し増殖・分化に十分に寄与していなかった。以上の研究結果から、骨髄由来間葉系幹細胞を用いた骨再生を臨床応用に持って行くのは大変困難であると考えた。そこで、骨格筋組織中にはサテライト細胞や筋 SP 細胞と呼ばれる幹細胞が存在し、特に舌筋由来幹細胞では大腿筋由来幹細胞や心筋由来幹細胞と比較して、骨形成に関与する BMP2 や BMP4 が特異的に発現していること(Japanese Circulation Society 2008)から、舌筋由来幹細胞に着目し舌筋由来 Sca-1 陽性細胞(MTDSC)を幹細胞として骨芽細胞への分化誘導の有無や、骨形成に対する検討を行い、以下について明らかにした(Molecular Medicine Reports 2015)。すなわち、MTDSC は筋細胞の 4.0% 以上収集可能であった。MTDSC は増殖期において線維芽細胞様の形態を示し倍加時間は約 48 時間で 50 代以上にわたり継代可能であった。MTDSC は間葉系幹細胞のマーカーである c-kit および Sca-1 の蛋白発現を示し、骨分化誘導培地処理にてその発現は経時的に減弱し、逆に骨分化マーカーの発現は経時的に増強したがその後減弱した。MTDSC は骨分化誘導培地処理にて石灰化細胞外基質の形成を示した。-TCP 強化型ゼラチンスポンジを scaffold として用いた場合のみ、MTDSC と培養後マウスに移植した時骨様組織の形成を確認した。以上の研究結果を踏まえて MTDSC を用いた

骨再生法を臨床に応用するには、MTDSC の実験結果では骨髄由来間葉系幹細胞より細胞数や分化・増殖においてすぐれていたが、依然十分ではなくさらなる細胞の増殖・分化を活性化する必要がある。さらに scaffold としてゼラチンが細胞の保持にすぐれていることが確認されたが、自由な形態付与には吸収性で気孔性のある生体材料が必要であり、骨形成に適した scaffold を開発し臨床に用いることが骨再生の鍵であり、骨再生を臨床応用するために、細胞の増殖・分化を高め、骨形成に適した bioactive scaffold を開発し動物実験で骨形成を確認することが急務と考えられた。

## 2. 研究の目的

骨再生医療を目指して、舌筋由来幹細胞あるいはヒト歯髄由来幹細胞を用いて、効率の良い骨再生を実現することである。そのためには、以下を研究目的とした。

- (1) 舌筋由来幹細胞あるいはヒト歯髄由来幹細胞に Nanog 遺伝子を導入することで幹細胞の増殖能、分化能をこれまで以上に高めること
- (2) 分化した幹細胞を保持し骨形成まで誘導させる三次元構造を有する bioactive scaffold を開発すること
- (3) 幹細胞から分化した細胞と開発された三次元構造を有する bioactive scaffold を実験動物に埋め込み三次元生物学的骨構造を作り出すこと

## 3. 研究の方法

- (1) Nanog 遺伝子導入マウス舌筋由来 Sca-1 陽性細胞(MTDSC-Nanog)および Nanog 遺伝子導入ヒト歯髄由来幹細胞(hDPSC-Nanog)の樹立

Addgene 社からマウス Nanog 遺伝子発現ベクター(pPyCAG-Nanog-IP)を購入し、トランスフォーメーションを行い、大量培養し精製後、このプラスミドベクターを、リポフェクタミンを用いて、舌筋由来 Sca-1 陽性細胞(MTDSC)に遺伝子導入し、上記ベクターの Selection marker である Puromycin を用いて stable clone(MTDSC-Nanog)を作製した。同様に空ベクターも MTDSC に遺伝子導入し、MTDSC-puro を樹立した。

Addgene 社からヒト Nanog 遺伝子発現ベク

ター(pCDNA3.1-Nanog)を購入し、トランスフォーメーションを行い、大量培養し精製後、このプラスミドベクターを、リポフェクタミンを用いて、ヒト歯髄幹細胞(hDPSC)[Lonza PT-5025]に遺伝子導入し、上記ベクターの Selection marker である Hygromycin を用いて stable clone(hDPSC-Nanog)を作製した。同様に、空ベクターを hDPSC 導入し、hDPSC-hyg を樹立した。

#### (2) MTDSC-Nanog および hDPSC-Nanog の増殖能の検討

親株 MTDSC、MTDSC-Nanog、MTDSC-puro、および親株 hDPSC、hDPSC-Nanog、hDPSC-hyg それぞれを、96 穴プレートに  $5 \times 10^3$  個ずつを播種し、設定した処理時間後に通法に従って MTT 溶液を加え、37 °C 4 時間反応させた。形成された MTT formazan を DMSO で溶解し、マイクロプレートリーダーを用いて OD490nm で吸光度を測定することにより生細胞数を評価した。

#### (3) MTDSC-Nanog および hDPSC-Nanog の骨分化能の検討

親株 MTDSC、MTDSC-Nanog、MTDSC-puro、および親株 hDPSC、hDPSC-Nanog、hDPSC-hyg それぞれを、骨分化誘導培地(Miltenyi Biotec 社)にて培養し、石灰化細胞外基質の形成を Alizarin red 染色および Von Kossa 染色にて検索し、骨分化能を評価した。

#### (4) 気孔性炭酸アパタイトフォームの作製

リン酸三カルシウムフォームの作製のために、まず軟質発砲ポリウレタンフォームの気孔を DMF 溶媒で溶解除去し、調整した連続気孔性ポリウレタンフォームにリン酸三カルシウム懸濁液を浸漬し、ウレタンフォームの骨梁表面にリン酸三カルシウムを付着させた。その後自然乾燥させ、フォームを電気炉で加熱することによりウレタンフォームを焼却するとともにリン酸三カルシウムの焼結がおりフォームを形成させた。作製したリン酸三カルシウムフォームを炭酸アンモニウム水溶液とともに水熱処理用ボンベに入れ 200 °C のオープンに 24 時間入れることにより炭酸アパタイトフォームを作製した。

#### (5) 3次元構造を有する bioactive scaffold の作製

上記(4)で作製した気孔性炭酸アパタイト

フォームをゼラチンハイドロゲル膜の2層構造(外側は3ヶ月程度の分解性と強度を有し、内側は2週間程度の薬剤の徐放性を有する)を構築するために、ブタ由来のコラーゲンから得られた酸性ゼラチン(新田ゼラチン社)に -TCP を含有させ、グルタルアルデヒド溶液を加えた後グリシン溶液にて未反応官能基を処理し、凍結乾燥を行い、-TCP 含有ゼラチンハイドロゲルを作製した。さらにこのゲルに酸性ゼラチンをコーティングし、熱架橋を行った後に凍結乾燥を行うことで2層構造を有したゼラチンハイドロゲル膜を作製した。

-TCP 含有ゼラチンハイドロゲル膜が内側となるように気孔性炭酸アパタイトフォームを包み込み、再度凍結乾燥を行うことにより3次元構造を有する bioactive scaffold (ゼラチン炭酸アパタイトフォーム)を作製した。

#### (6) FGF2 徐放型 bioactive scaffold の作製

メドジェル生理活性物質徐放剤 MedGel を応用して、FGF2(1 μg)を MedGel に滴下し、4 で一晩含浸させて、bFGF 徐放型 bioactive scaffold として用いた。

#### (7) 各種 bioactive scaffold を用いた骨再生能の比較検討

上記作製した気孔性炭酸アパタイトフォーム、ゼラチン炭酸アパタイトフォーム、bFGF 徐放型 bioactive scaffold に加えて、GC 研究用 scaffold(GC)ならびに -TCP 強化型ゼラチンスポンジ(MedGel)を scaffold としてヌードマウス背部皮下に埋入し、それぞれの中に、骨分化誘導をかけた親株 MTDSC、MTDSC-Nanog、MTDSC-puro、および親株 hDPSC、hDPSC-Nanog、hDPSC-hyg それぞれを注入した。注入1ヶ月後に骨再生部位を摘出し、組織学的(H-E染色)に骨形成の状態を検討した。

## 4. 研究成果

トランスフェクタント(MTDSC-Nanog)、親株である MTDSC および空ベクターを導入した MTDSC-puro の細胞増殖能および骨分化能に関して比較検討した。その結果、親株 MTDSC、空ベクターを導入した MTDSC-puro、MTDSC-Nanog は増殖能に関しては有意差を認めなかった(図1)。しかしながら、MTDSC においては Alizarin red 染色および Von Kossa 染色にて観察される石灰化細胞外基質の形成は14日目以降に確認され、空ベクターを導入した MTDSC-puro においても同

様に 14 日目以降に確認できたが、MTDSC-Nanog では 10 日目以降に石灰化細胞外基質の形成が認められた。

マウスでの骨再生とともにヒトでの骨再生を視野に入れて、ヒト歯随幹細胞 (hDPSC) [Lonza PT-5025] とヒト Nanog 遺伝子発現ベクター (pCDNA3.1-Nanog ; addgene 社) を用いて、トランスフェクタント (hDPSC-Nanog) を作製し (図 2)、親株である hDPSC および空ベクターを導入した hDPSC-hyg とともに、細胞増殖能および骨分化能に関して比較検討した。その結果、親株 hDPSC、空ベクターを導入した hDPSC-hyg、hDPSC-Nanog は 14 日目までの増殖能に関しては有意差を認めなかった (図 3)。しかしながら、hDPSC においては Alizarin red 染色および Von Kossa 染色にて観察される石灰化細胞外基質の形成は 14 日目以降に確認され、空ベクターを導入した hDPSC-hyg においても同様に 14 日目以降に確認できたが、hDPSC-Nanog では 7 日目以降に石灰化細胞外基質の形成が認められた (図 4)。すなわち、マウス Nanog 遺伝子発現ベクターを舌筋由来 Sca-1 陽性細胞 (MTDSC) に遺伝子導入して得た MTDSC-Nanog では 10 日目以降に石灰化細胞外基質の形成が認められたことから、今回のヒト Nanog 遺伝子発現ベクターをヒト歯随幹細胞 (hDPSC) に導入して得られた hDPSC-Nanog が骨再生により有用と考えられた。

有用な scaffold を探索するために、気孔性炭酸アパタイトフォーム、ゼラチン炭酸アパタイトフォーム、bFGF 徐放型 bioactive scaffold に加えて、GC 研究用 scaffold (GC) ならびに -TCP 強化型ゼラチンスポンジ (MedGel) を scaffold としてヌードマウス背部あるいは大腿部皮下に埋入し、それぞれの中に、骨分化誘導をかけた親株 MTDSC、MTDSC-Nanog、MTDSC-puro、および親株 hDPSC、hDPSC-Nanog、hDPSC-hyg それぞれを注入した。その結果、気孔性炭酸アパタイトフォームとゼラチン炭酸アパタイトフォームは、埋入後 3 週間後で異物として排泄されたが、GC 研究用 scaffold および -TCP 強化型ゼラチンスポンジ (MedGel) は、1 ヶ月以内に皮膚外へ異物として排出されることはなかった。またそれぞれ埋入部を切除して、ホルマリン固定後、パラフィンブロックを作製し、薄切切片を用いて HE 染色を行った所、bFGF 徐放型

bioactive scaffold が、最も良好な骨様組織を形成していた。すなわち、他の scaffold と比較して、MedGel 生理活性物質徐放剤 (MedGel) を用いて作製した bFGF 徐放型 bioactive scaffold が、最も有用と考えられた。

そこで、hDPSC-Nanog と FGF2 徐放型 bioactive scaffold との併用が最も骨再生に有用と考えられたため、FGF 徐放型 bioactive scaffold をヌードマウス皮下に埋入し、骨分化誘導をかけた hDPSC-Nanog と、コントロールとして空ベクターを導入した hDPSC-hyg に骨分化誘導をかけたものを、それぞれマウス皮下へ注入し長期に観察を行った。その結果、FGF2 徐放型 bioactive scaffold は、埋入後 3 ヶ月まで異物として排泄されることは無かった。埋入後 3 ヶ月後に埋入部を切除して、ホルマリン固定後、パラフィンブロックを作製し、薄切切片を用いて HE 染色を行った所、コントロールとして空ベクターを導入した hDPSC-hyg に骨分化誘導をかけたものと比較して、骨分化誘導をかけた hDPSC-Nanog を注入した bFGF 徐放型 bioactive scaffold 埋入部において、より良好な骨様組織が観察された (図 5)。MedGel のハイドロゲルから FGF2 が徐放されることで、hDPSC-Nanog からの骨分化誘導が促進されたと考えられた。ただし、三次元生物学的骨構造を有するまでには至らなかったため、今後更なる工夫が必要と考えられた。なお現在 BMP2 (1~5  $\mu$ g) を MedGel に滴下し、4 で一晩含浸させて、同様に hDPSC-Nanog、hDPSC-hyg それぞれとともにヌードマウス大腿骨相当部皮下に埋入し、BMP2 徐放による hDPSC-Nanog の骨分化誘導能を検討中である。

図 1

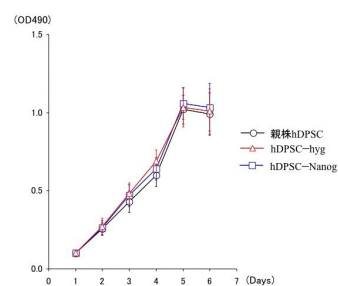
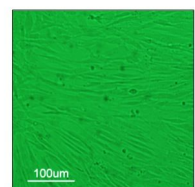


図 2



Nanog遺伝子導入ヒト歯髄由来幹細胞 (hDPSC-Nanog)

図 3

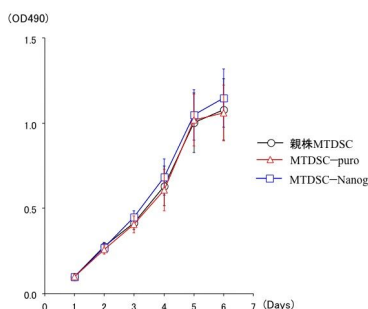
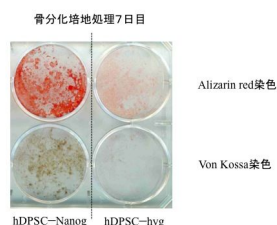


図 4



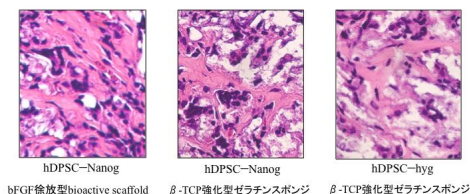
骨分化培地処理7日目

Alizarin red染色

Von Kossa染色

hDPSC-Nanog hDPSC-hyg

図 5



hDPSC-Nanog

hDPSC-Nanog

hDPSC-hyg

bFGF 誘発型 bioactive scaffold

$\beta$ -TCP 強化型セラチンスポンジ

$\beta$ -TCP 強化型セラチンスポンジ

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 2 件)

Appearance of cell-adhesion factor in osteoblast proliferation and differentiation of apatite coating titanium by blast coating method.  
Hirotsugu Umeda, Takamitsu Mano, Koji Harada, Ferdous Tarannum, Yoshiya Ueyama  
 J Mater Sci Mater Med,28:112,2017. 査読有.  
 DOI : 10.1007/s10856-017-5913-8

テリパラチド投与と外科的治療により治療したビスフォスフォネート関連顎骨壊死の1例.

真野隆充, 梅田浩嗣, 竹縄隆徳, 今釜 崇, 森 亜希, 上山吉哉.

日歯先技研会誌(Scient.J.Jpn.Inst.Advanc.Dent) 23:11-13, 2017.査読有.

〔学会発表〕(計 4 件)

過去 14 年間における遊離皮弁再建を行った症例の臨床的検討

梅田浩嗣, 真野隆充, 原田耕志,

内田堅一郎, 三島克章, 上山吉哉

第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2017

内視鏡鼻咽腔計測システムの小型化と改造に伴う精度の検証

三島克章, 白石麻美, 河井由衣, 梅田浩嗣, 上山吉哉

第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016

主成分分析を応用したスマイル時の口唇運動における性差

三島克章, 中野明日香, 白石麻美, 梅田浩嗣, 上山吉哉

第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2015

当科における顎矯正手術に生じた異常骨折の臨床的検討

堀永大樹, 真野隆充, 加藤芳明, 梅田浩嗣, 上山吉哉

第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅田 浩嗣 (UMEDA, Hirotsugu)  
山口大学・医学部附属病院・診療助教  
研究者番号：90610618

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし