

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：24303  
 研究種目：基盤研究(C)（一般）  
 研究期間：2016～2019  
 課題番号：16K11695  
 研究課題名（和文）羊膜の組織修復作用と骨再生能に着目した新規培養歯根膜由来細胞シートに関する研究

研究課題名（英文）the periodontal ligament-derived cell sheet cultured on amniotic membrane substrate for bone regeneration and tissue repair.

研究代表者  
 雨宮 傑（Amemiya, Takeshi）  
 京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・特任講師

研究者番号：90398389

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）：本研究の目的は、歯周組織再生に有効な新規培養細胞シートを開発することである。羊膜は抗炎症、感染抑制を有し、さまざまな細胞の培養基質としての有用性・有効性が注目されている生体材料である。われわれはこれまで、羊膜を基質に用いた培養ヒト歯根膜線維芽細胞（hPDLF）シートを作製し、実験動物への移植にて新生骨（歯周組織）再生能を有することを報告してきた。また、hPDLFの培養基質に羊膜を用いることで、ケモカインSDF-1/CXCL12やCXCL14の産生が促進され、羊膜の有用性を見出した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

羊膜上培養PDL細胞シートは骨分化能だけでなく、成長因子IGF-1やケモカインSDF-1/CXCL12やCXCL14の産生が促進され、羊膜の有用性を見出した。羊膜を基板とした細胞移植は、新たな骨再生医療への応用の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop a new cultured cell sheet effective for periodontal tissue regeneration. Amniotic membrane is a biomaterial that has anti-inflammatory and anti-infective properties and its attention as a useful and effective substrate for various cells. We have previously prepared cultured human periodontal ligament fibroblast (hPDLF) sheets using amniotic membrane as a substrate and reported that they have the ability to regenerate new bone (periodontal tissue) when transplanted into experimental animals. We also found that the use of amniotic membrane as the culture substrate for hPDLF promoted the production of chemokines SDF-1 / CXCL12 and CXCL14, and found the usefulness of amniotic membrane.

研究分野：口腔外科

キーワード：羊膜 骨再生 IGF-1 SDF-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、歯周病の原因や機序が次第に明らかになりつつあり、感染源を取り除き歯周病の進行を防止する治療から、歯周組織再生誘導療法が大きく注目されている。申請者は、歯周組織再生に重要と考えられている歯根膜細胞を採取し、*in vitro* で培養・増殖させ *in vivo* に移植することで歯周組織の再生ができるのではないかと考えた。具体的に、培養・増殖させた歯根膜由来細胞を羊膜上にてシート状培養を行い、歯根膜の欠損した露出根面に付着させることで歯周組織の再生を行うことである。すでにわれわれは、培養歯根膜由来細胞のシート状培養が可能であり、実験動物レベルにて自家移植を行い歯周組織が再生することを確認した。そこで本研究では、羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞シートを新たな歯周組織再生材料として確立を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周組織再生に有効な新規培養細胞シートを開発することである。羊膜は抗炎症、感染抑制を有し、さまざまな細胞の培養基質としての有用性・有効性が注目されている生体材料である。われわれはこれまで、羊膜を基質に用いた培養ヒト歯根膜線維芽細胞 (hPdLF) シートを作製し、実験動物への移植にて新生骨(歯周組織)再生能を有することを報告してきた。また、hPdLF の培養基質に羊膜を用いることで、ケモカイン SDF-1/CXCL12 や CXCL14 の産生が促進され、羊膜の有用性を見出した。今回、羊膜が hPdLF のへの増殖・分化を誘導するシグナル (成長) 因子の産生に与える影響について検討を行った。

### 3. 研究の方法

羊膜は帝王切開時の胎盤より採取し、hPdLF は抜去歯より採取した歯根膜を初代培養後、3 から4代継代したものを研究に供した。上皮細胞を剥離、除去した羊膜上にて PDL 細胞を約3週間の培養を行い、羊膜上培養 hPdLF シートを作製、組織再生・修復および骨再生に関する遺伝子解析を行った。なお、本研究は本学医学倫理審査委員会の許可を得た上で実施した。



図1. 培養基板用の羊膜シート。

### 4. 研究成果

初めに培養に使用する hPdLF のキャラクタライゼーションをフローサイトメトリーで行った。解析の結果、PDL 細胞は間葉系幹細胞のマーカーである CD105 や CD146 を高発現していたのに対し、CD31 (血管内皮細胞)・CD45 (白血球)・CD34 (造血幹細胞) の発現は認められなかった (図2)。hPdLF は骨分化誘導培地で培養することで、石灰化基質を形成することを確認した (図3)。マイクロアレイによる遺伝子解析を行った結果、対照群と比較して羊膜上培養 hPdLF シートでは、IGF-1、VEGF-A の各遺伝子が高発現していた。一方、Dkk-1 は遺伝子レベルでの発

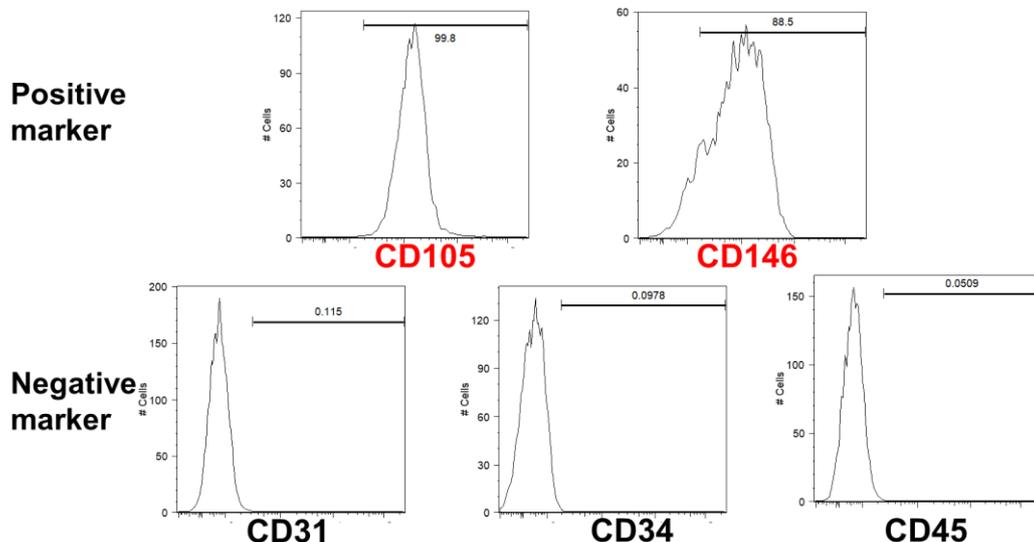


図2. hPdLFにおける間葉系幹細胞マーカーの発現。

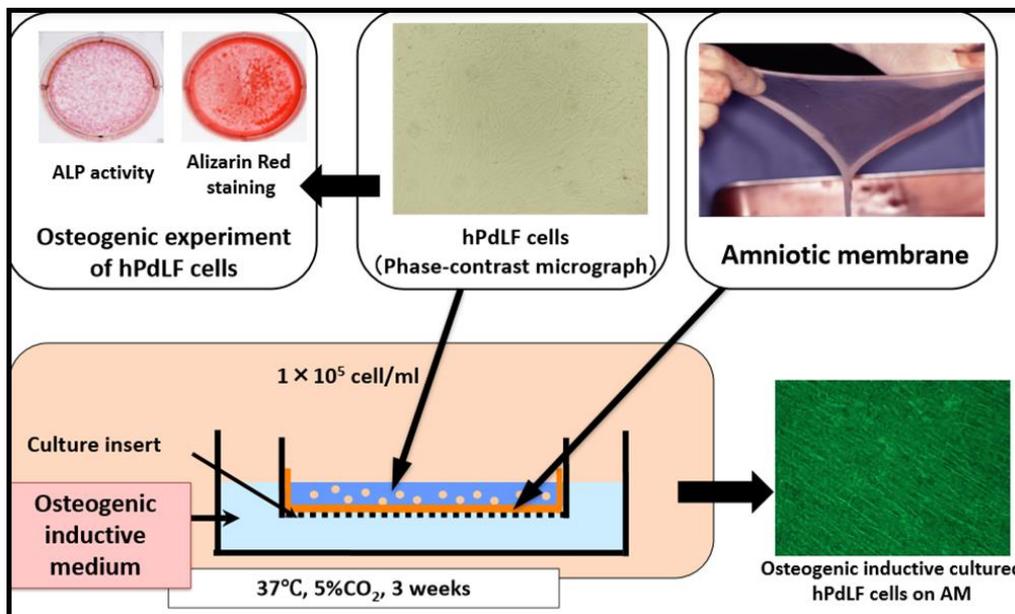


図3. 実験の概略図。

現の低下を認めた。また、培養上清中の IGF-1, VEGF-A, BDNF, NGF は有意に増加し、Dkk-1 は有意に減少していた。この結果より、羊膜上培養 hPDLF シートは、自身が骨組織へ分化するだけでなく、成長因子 (IGF-1, VEGF-A, BDNF, NGF) やケモカインの産生を促すことが示され、さらには、培養細胞シートは間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を阻害する Dkk-1 の産生を抑制していたことで、効率的に骨芽細胞へ分化誘導するものと推測された。

次にこの培養シートを歯周炎モデルラットに移植を行った。Wistar 系ラットの上顎第 1 臼歯間に矯正用ワイヤー結紮し、4 週間飼育することで歯周炎を誘導した。4 週間後ワイヤーを除去し、羊膜上培養 hPDLF シートを移植した。シート移植 4 週間後、屠殺しマイクロ CT 撮影を行った。マイクロ CT の結果、羊膜上培養 hPDLF シート移植群は、歯周炎群と比較し、骨吸収量が有意に減少した (図 4)。

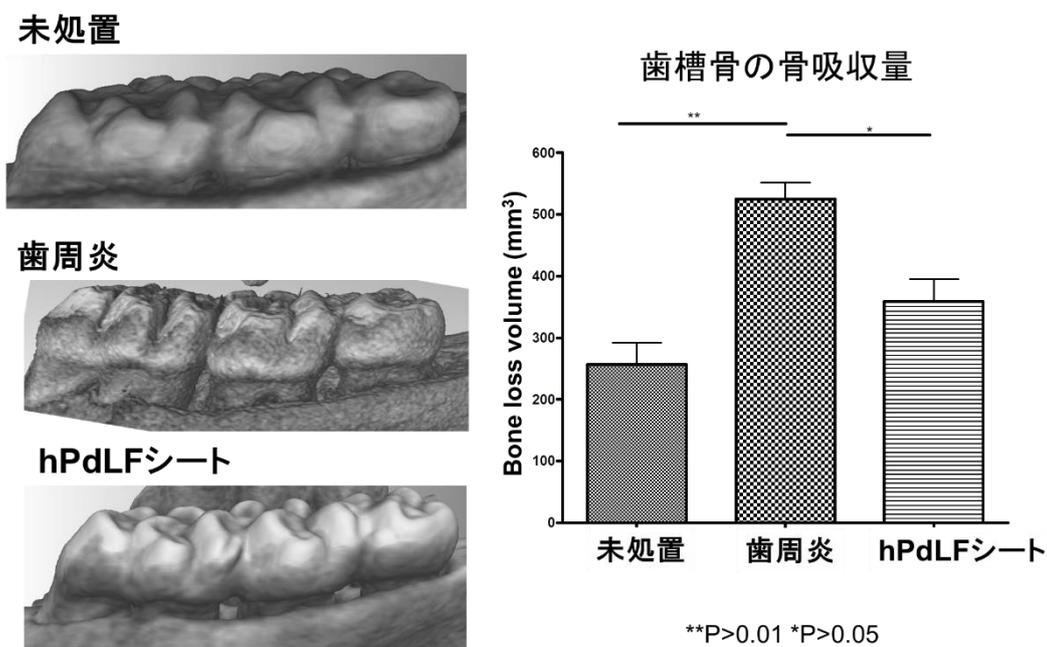


図4. マイクロCTの3次元象と骨吸収量.

上記研究結果より、羊膜上培養 hPDLF シートは、ケモカインや各種成長因子の産生を促すことが示され、細胞の局所への遊走や分化誘導することで、周囲組織の再生に寄与できるものと期待される。羊膜は細胞培養の足場となるだけでなく、hPDLF を刺激することで成長因子やケモカインの産生を促す優れた基質であると考えられた。

参考文献

1. Adachi K, Amemiya T, Nakamura T, Honjyo K, Kumamoto S, Yamamoto T, Bentley AJ, Fullwood NJ, Kinoshita S, Kanamura N. Human periodontal ligament cell sheets cultured on amniotic membrane substrate. *Oral Dis.* 2014;20: 582-590. doi: 10.1111/odi.12176.
2. Amemiya T, Adachi K, Nishigaki M, Yamamoto T, Kanamura N. Experiences of preclinical use of periodontal ligament-derived cell sheet cultured on human amniotic membrane. *J Oral Tissue Engin.* 2008;6: 106-112.
3. Yashiro Y, Nomura Y, Kanazashi M, Noda K, Hanada N, Nakamura Y. Function of chemokine (CXC motif) ligand 12 in periodontal ligament fibroblasts. *PLoS One.* 2014;7;9(5):e95676. doi: 10.1371/journal.pone.0095676. eCollection 2014.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 雨宮 傑, 山本俊郎, 金村成智	4. 巻 78(7)
2. 論文標題 羊膜上培養自己口腔粘膜上皮細胞シートによる口腔粘膜の再建	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本歯科評論	6. 最初と最後の頁 155-158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 雨宮 傑, 山本俊郎, 金村成智	4. 巻 78(8)
2. 論文標題 羊膜を用いた培養歯根膜細胞シートによる歯周組織の再生	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本歯科評論	6. 最初と最後の頁 159-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 雨宮 傑, 山本俊郎, 金村成智	4. 巻 78(9)
2. 論文標題 培養細胞シートを用いた新規骨再生医療の開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本歯科評論	6. 最初と最後の頁 155-158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 雨宮 傑	4. 巻 60
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 270 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11471/shi kahozon.60.270	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Amemiya T, Endo Y, Asai T, Adachi T, Adachi K, Nishigaki M, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N	4. 巻 59
2. 論文標題 Development of human periosteal-derived cell sheets cultured on an amniotic membrane substrate.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日歯保存誌	6. 最初と最後の頁 394-401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11471/shikahozon.59.394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takizawa Shigeta, Yamamoto Toshiro, Honjo Ken Ichi, Sato Yoshiki, Nakamura Koya, Yamamoto Kenta, Adachi Tetsuya, Uenishi Toshihiro, Oseko Fumishige, Amemiya Takeshi, Yamamoto Yoshiaki, Kumagai Wataru, Kita Masakazu, Kanamura Narisato	4. 巻 25
2. 論文標題 Transplantation of dental pulp derived cell sheets cultured on human amniotic membrane induced to differentiate into bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 1352 ~ 1362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13096	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Amemiya T, Adachi T, Adachi K, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N.
2. 発表標題 Effect of amniotic membrane for periodontal ligament fibroblast cell sheet.
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Amemiya T, Adachi T, Adachi K, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N.
2. 発表標題 Effects of amniotic membrane as a substrate for human periodontal ligament fibroblast cell sheet on growth factor production
3. 学会等名 The 5th World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - 2018 Kyoto, Japan (TERMIS-WC 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山野辺広中、山本俊郎、堀口智史、中井 敬、山本健太、大迫文重、雨宮 傑、坂下敦宏、中村 亨、金村成智
2. 発表標題 ヒト羊膜上培養歯髓由来細胞シートを用いた歯槽骨再生の評価
3. 学会等名 日本歯科保存学会2018年度秋季学術大会（第149回）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 雨宮 傑，足立哲也，足立圭司，大迫文重，山本俊郎，金村成智
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第70回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Adachi K, Amemiya T, Adachi T, Nishigaki M, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N.
2. 発表標題 Search for genes involved in periodontal tissue regeneration expressed by periodontal ligament cell sheets cultured on amniotic membrane substrate.
3. 学会等名 39th Asia Pacific Dental Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Amemiya T, Adachi T, Adachi K, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N.
2. 発表標題 Cultivate of periosteal-derived cell sheets on an amniotic membrane substrate.
3. 学会等名 39th Asia Pacific Dental Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamamoto T, Honjo K, Amemiya T, Asai T, Kita M, Kanamura N.
2. 発表標題 Bone differentiation induction of dental pulp-derived cell sheet cultured on human amniotic membrane and its application to alveolar bone regeneration.
3. 学会等名 39th Asia Pacific Dental Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本歯科保存学会2017年度春季学術大会 (第146回)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 雨宮 傑, 足立哲也, 市岡宏顕, 足立圭司, 西垣 勝, 大迫文重, 山本俊郎, 金村成智
2. 発表標題 膜上培養歯根膜由来細胞シートの組織修復ならびに骨再生に関与する遺伝子の検索
3. 学会等名 第70回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本歯科保存学会2016年度春季学術大会 (第144回)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Amemiya T, Adachi T, Adachi K, Nishigaki M, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N.
2. 発表標題 Immunohistochemical investigation of periosteal-derived cell sheet cultured on amnion.
3. 学会等名 38th Asia Pacific Dental Congress (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Adachi K, Amemiya T, Adachi T, Nishigaki M, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N.
2. 発表標題 Examination of osteogenic potential in nude mice transplantation of the periodontal ligament-derived cell sheet cultured on amnion.
3. 学会等名 38th Asia Pacific Dental Congress (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yamamoto T, Honjo K, Nishigaki M, Amemiya T, Kita M, Kanamura N.
2. 発表標題 Examination of implanted dental pulp-derived cell sheets cultured on amnion.
3. 学会等名 94th General Session and Exhibition of the International Association of Dental Research (IADR) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Amemiya T, Adachi T, Asai T, Adachi K, Oseko F, Yamamoto T, Kanamura N.
2. 発表標題 Human Periosteal-derived Cell Sheets Cultured on Amniotic Membrane Substrate.
3. 学会等名 95th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	足立 哲也  (Adachi Tetsuya)  (10613573)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教   (24303)	
研究分担者	山本 俊郎  (Yamamoto Toshiro)  (40347472)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師   (24303)	
研究分担者	金村 成智  (Kanamura Narisato)  (70204542)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授   (24303)	