

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18791484  
 研究課題名（和文） ティッシュエンジニアリングによる培養粘膜・骨膜・骨複合型バイオ人工顎骨の開発  
 研究課題名（英文） Development of complex bio-artificial jaw of cultured mucosa, periosteum and bone by tissue engineering method  
 研究代表者  
 丸川 恵理子（MARUKAWA ERIKO）  
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
 研究者番号：40419263

## 研究成果の概要：

ラットにおける培養粘膜細胞シート作成時、platelet-rich-plasma（PRP 多血小板血漿）を細胞培養を行う際に培養液に添加すると、培養増殖数、増殖期間ともに促進され、培養を行う際に PRP を使用することが非常に有用であることが示された。次に増殖した細胞を播種する際に platelet-poor-plasma（PPP 少血小板血漿）を応用した場合、シートがより強度を増し、操作性が向上した。しかし、ラット背部皮膚に応用した場合、その治癒過程で明らかな差が生じなかった。ビーグル犬における培養口腔粘膜細胞シートをラットと同様に作成し、口蓋粘膜における生着に対する違いを検討した。結果にばらつきが生じたが、PPP もしくは PRP を用いた方が用いなかった場合と比べて治癒が良好な傾向にあった。また、ビーグル犬での培養骨の作成条件が決定し、人工材料としては TCP を用いた。粘膜と同様培養する際に培養液に PRP を添加した場合に培養増殖数、増殖期間ともに促進されていた。細胞を播種する際に PRP、PPP を用いた場合、用いなかった場合では、PPP 使用群で有意に新生骨量が増加している結果となった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	700,000	0	700,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：口腔外科学、骨再生

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：培養口腔粘膜・培養骨膜・培養骨・自己サイトカイン・platelet-rich-plasma

## 1. 研究開始当初の背景

組織工学の発展により、口腔粘膜における培養粘膜に関する研究が進められ、培養粘膜細胞シートを臨床的に応

用するまでになっている。我々の過去の研究ではコラーゲン膜上に単層の上皮培養細胞を播種した単層シートとその単層シート上に線維芽細胞を播種す

る複合培養シートを作成し粘膜欠損創にそれぞれ移植を行い、瘢痕収縮の面から良好な結果を得ている。我々も、現在までに培養粘膜細胞シートの作製に成功しており、ヌードマウスの皮膚欠損部位にヒト粘膜上皮細胞由来の上皮シートを移植し、良好な結果が得られている。また、ビーグル犬の口腔内より粘膜片を採取し、ディスパーゼおよびトリプシンによる酵素処理を行い、単離した粘膜上皮細胞を上記の培地にて培養した。その結果、培養条件はヒト由来細胞と同様で良好であり、継代数はヒト由来細胞にやや劣るものの、初代培養や培養二代目では良好な形態を有する角化細胞の培養が可能であった。細胞の倍化時間も20時間前後でヒト由来細胞との大きな差異は認められなかった。さらに初代培養でコラーゲン膜上にビーグル由来の培養上皮シート作成を試みたが、粘膜片採取後1週間程度でヒト由来細胞とほぼ同様と考えられる単層の培養粘膜上皮シートの作成が可能であった。

また、我々は多血小板血漿の骨形成能に与える影響についての研究を行ってきたが、多血小板血漿に高濃度に含まれるTGF- $\beta$ 、PDGF、VEGFは細胞の増殖能を促進し、創傷治癒において有用であることから、粘膜組織の培養において、また移植の際のそれぞれにおいて多血小板血漿を応用するという着想に至ったのである。国内外でも、多血小板血漿の骨形成能、創傷治癒促進に関する研究は多数報告されているが、未だ口腔培養粘膜に応用したという報告は認められていない。また最近、骨膜細胞を培養して、シートを作製し、

それをいわゆるGTR、GBRメンブレンとして用いることにより、顎骨再生を行うという報告が出始めている。培養骨膜シートの単独使用、もしくは骨移植との併用でより速く、より確実な骨形成が得られる可能性があると考えられる。

## 2. 研究の目的

顎骨再生を行う際、多くの場合は口腔粘膜の不足を同時に伴い、そのことが大きな問題となり、顎骨再生を困難なものとしている。口腔粘膜の不足は骨の増生量を制限するばかりでなく、骨移植の失敗の主な要因となっている。自家骨であっても、人工骨であっても粘膜による被覆が十分に余裕を持って行われなければ、感染や血流の不足が生じて、移植材の欠落を招くことになる。そこで、口腔粘膜組織と骨組織が同時に再生可能であれば、応用範囲は拡大され、また、骨補填材のみの移植の場合においても、同時に粘膜、骨膜を合わせるにより、より確実な方法となりうる可能性もある。最近、三次元的に培養することが骨形成において重要であることが言われるようになり、培養粘膜・骨膜・骨の複合型組織を開発することにより、今まで骨再生困難であった症例においても骨形成が実現できることを目指したい。

本研究では、自家サイトカインとしての多血小板血漿(Platelet Rich Plasma)を応用し、創傷治癒、瘢痕収縮においてより効果的な培養粘膜細胞シートの開発を目的としている。

しかし、培養粘膜・骨膜・骨の複合型バイオ人工顎骨の実現は大きな目標

であると共に非常に難題であり、再生したい部位が大きくなるほど、血流の問題、細胞数の限界、移植材の生着、唾液による感染などの問題が生じる。そこでまず、欠損部位は小さな部位で、培養粘膜・骨膜・骨組織をそれぞれ単独で確実に再生可能な条件を揃えることを目標にする。その上で、それぞれを組み合わせで複合化できるかどうかの検討を行う。そして、複合化できた培養組織の応用部位を拡大し、どこまでの大きさの組織再生が可能かを検討することが目的となる。

### 3. 研究の方法

#### ・ 各培養粘膜・骨膜・骨組織の確立

#### 1. 培養口腔粘膜シートの作製 自己サイトカイン Platelet Rich Plasma を応用

ラット口腔粘膜から採取した細胞を単離培養する。細胞を上皮細胞は酵素処理により単離、採取しⅠ型コラーゲン膜に播種する(単層の培養粘膜上皮細胞シート)。また、この培養粘膜細胞シート上に線維芽細胞を播種し、複合培養シートを作製する。角化細胞は無血清培地を用いて培養し、線維芽細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% の自家血清または細胞増殖に有用であり、創傷治癒に有用な成長因子を多く含んでいる platelet-rich-plasma (多血小板血漿) を加えてその影響を検討する。添加する場合には、platelet-rich-plasma からフィブリンを除去し、リリースされる成長因子を含んだ液性成分を添加し培養を行い、platelet-rich-plasma の濃度を変え、線維芽細胞の増殖能を比較した。培養条件をいくつか絞り、作製された培養粘膜細胞シートをヌードマウス背部皮膚に作成した皮膚欠損部を移植し、そこに培養粘膜が生着するかどうか

かを検討した。この実験群にさらにフィブリンによる三次元的な組織構築の効果を期待し、platelet-rich-plasma を応用する。シート状に細胞を播種する際と、また、移植時コラーゲンなどの人工材料に含浸、ゲル化したものをシートに重ねて移植する方法を比較検討する。具体的には作製した培養粘膜細胞シートは、天地を逆さにし、ラット血液より調整した platelet-rich-plasma を浸透、ゲル化したコラーゲンスポンジの上に重ねて自己サイトカイン応用人工培養粘膜細胞シートとする。評価は移植後 1 週、4 週後に、記録写真によるマクロ形態学的観察と瘢痕収縮の計測、および組織切片の光学顕微鏡観察を行う。

#### 2. 培養骨膜シート作製法の確立

ラットの骨膜を採取し、骨膜細胞を単離培養、シート化し、それをラットの骨欠損部位(頭蓋骨に径 7mm の骨欠損)にメンブレンを使用するように封鎖し、骨形成が認められ、促進されるかについての検討を行う。

培養骨組織に関して、我々はすでに培養条件、人工材料への導入方法はある程度確立しているため、培養骨単独の検討は本研究では行わない。

#### 3. 複合型培養骨組織における検討

ラットの大腿骨より、骨髄間葉系幹細胞、骨髄細胞を培養、増殖させ、人工培養骨組織に培養骨膜組織、人工培養骨組織に培養粘膜シート、またはその 3 者すべてを複合させ、これらの組み合わせで、ラット口蓋部に骨、骨膜、粘膜欠損を作製し、その部位での有用性を検討する。

培養粘膜細胞シートの作製にはビーグル幼犬由来の細胞を用いる。ビーグル犬の口腔

内に作成した 20mm x 10mm 程度の口蓋粘膜、骨膜欠損、径 8mm の骨欠損部を形成し、それぞれの実験から得られた結果から最適な条件の培養・移植方法、また組み合わせを用いて移植を行い、移植材の生着、粘膜組織の癒痕収縮、骨形成能について、総合的な評価を行う。

#### 4. 研究成果

##### 1. 培養口腔粘膜シートの作製 自己サイトカイン Platelet Rich Plasma を応用

ラット線維芽細胞を Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% の自家血清または platelet-rich-plasma (PRP 多血小板血漿) からフィブリンを除去し、リリースされる成長因子を含んだ液性成分を添加した物を用いて培養を行い、増殖能を比較した。さらに血小板の濃度を 3 種類作成し、比較したところ濃度依存性に増殖能は有意に増加していた。次に作製された培養粘膜細胞シートをヌードマウス背部皮膚に作成した皮膚欠損部に移植し、そこに培養粘膜が生着するかどうかを検討し、移植後 1 週、4 週後で評価を行ったが、培養粘膜の生着が確認できた。この実験群にさらにフィブリンによる三次元的な組織構築の効果を期待し、増殖した細胞を播種する際に platelet-poor-plasma (PPP 少血小板血漿) を応用した場合、シートがより強度を増し、操作性が向上した。しかし、ラット背部皮膚に応用した場合、PPP、PRP、コントロールそれぞれで比較したところコントロールに比べ、PPP、PRP 共にその治癒は促進されていたが、PPP と PRP で明らかな差は生じなかった。おそらく、成長因子の効果時間が少なく、漏出してしまったことが原因として考えられる。

##### 2. 培養骨膜シート作製法の確立

ラットの骨膜を採取し、骨膜細胞を単離培養、シート化し、それをラットの骨欠損部位 (頭蓋骨に径 7mm の骨欠損) にメンブレンを使用するように封鎖し、骨形成が認められ、促進されるかについての検討する予定であったが、最適な培養条件が見つからず、移植できるだけの細胞数が獲得できなかった。現在も継続して検討中である。

##### 3. 複合型培養骨組織における検討

ラットにおける培養粘膜細胞シート作成時、細胞を播種する際 platelet-rich-plasma (PRP 多血小板血漿) を応用した場合、ラット背部皮膚においてはその治癒過程で明らかな差が生じなかった。よって、差が生じる可能性のある口腔粘膜部位での比較を行うべく、ビーグル犬での口腔内における培養粘膜細胞シートの条件を決め、その生着に対する違いを比較した。粘膜シートの作成条件は決定したが、そのシートの固定が困難であり、粘膜が壊死してしまい、生着も困難であり、実験モデルの確立ができなかった。併せてビーグル犬での培養骨の作成条件が決定し、人工材料としては TCP を用いており、異所性に移植した場合の新生骨の確認をした。粘膜と同様培養する際に培養液に PRP を添加した場合に培養増殖数、増殖期間ともに促進されていた。細胞を播種する際に PRP、PPP を用いた場合、用いなかった場合では、PPP 使用群で有意に新生骨量が増加している結果となった。ビーグル犬での顎骨欠損モデルにおいて培養骨単独移植・培養骨 + 粘膜シート (PPP と PRP それぞれ作製)・培養骨 + コラーゲンシートの 4 群において、差が生じるかどうか検討を行ったが、本研究期間内で結果が得られず、現在も実験を進行中である。

## 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)

Oshina H, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Sugata Y, Maehara H, Marukawa E, Omura K, Shinomiya K. Effects of continuous dexamethasone treatment on differentiation capabilities of bone marrow-derived mesenchymal cells. Bone. 41 2007 575-583

Yunoki S, Ikoma T, Monkawa A, Marukawa E, Sotome S, Shinomiya K, Tanaka J.

Three-dimensional porous hydroxyapatite/collagen composite with rubber-like elasticity.

J Biomater Sci Polym Ed. 18(4) 2007 393-409

Yunoki S, Marukawa E, Ikoma T, Sotome S, Fan H, Zhang X, Shinomiya K, Tanaka J. Effect of collagen fibril formation on bioresorbability of hydroxyapatite/collagen composites. J Mater Sci Mater Med. 18 2179-2183 2007

[学会発表](計2件)

Marukawa Eriko Bone regeneration with  $\beta$  TCP (Osferion) 第4回日韓合同歯科インプラント研究会 平成20年5月31日 韓国

丸川恵理子、早乙女進一、土谷明男、望月直美、平野昌弘、四宮謙一、小村健  
多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体の骨欠損部への移植方法の検討  
第6回日本再生医療学会総会 2007年3月 横浜

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

丸川 恵理子 (MARUKAWA ERIKO)

東京医科歯科大学・顎口腔外科・助教

研究者番号：40419263