

令和 3 年 8 月 14 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09592

研究課題名(和文) ヒトES細胞を用いた水平性骨欠損に対する新規3次元骨再生医療技術の開発

研究課題名(英文) Development of new 3D bone regenerative medicine technology for horizontal bone defects using human ES cells

研究代表者

半田 慶介 (Handa, Keisuke)

神奈川県立大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：40433429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究申請は、ヒトES細胞由来間葉系幹細胞を分化誘導することによって骨芽細胞を作成し、最終的には人工骨マトリックスを作成し、骨補填材に用いることを最終目標にしている。そのため、マウス骨芽細胞由来細胞株を用いて *in vitro* における分化誘導実験を行い分化条件の整備を行った。また人工骨マトリックス作成のための、免疫不全症マウスへの移植実験による分化誘導実験のため、マウス骨芽細胞由来細胞株を免疫不全症マウスの背部皮下に移植し、最終的な人工骨マトリックスのサイズを規定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はヒトES細胞由来骨芽細胞により骨再生に最適化したECMとサイトカインを含む足場を *in vitro* で作製し、また脱細胞化処理を実施することで迅速に骨再生が可能な臨床応用を視野に入れた安全性の高い骨再生医療製品の開発を目指す。すなわち本申請ではヒトES細胞を間葉系幹細胞に分化させ、さらに骨芽細胞へ分化誘導することで腫瘍形成のリスクを軽減させるとともに脱細胞化技術によりECMのみを使用する。そのため高い安全性と安定的な供給が担保された全く新しい学術的独自性を有する再生療法製品を提供することができる。

研究成果の概要(英文)：The ultimate goal of this research application is to generate osteoblasts by inducing differentiation of human ES cell-derived mesenchymal stem cells, and finally to create an artificial bone matrix for use as a bone filling material. Therefore, *in vitro* differentiation induction experiments were conducted using mouse osteoblast-derived cell lines to improve differentiation conditions. In addition, for the differentiation induction experiment by transplantation experiment to immunodeficient mouse for artificial bone matrix preparation, mouse osteoblast-derived cell line was transplanted subcutaneously to the back of immunodeficient mouse, and the final artificial bone matrix was prepared. I specified the size.

研究分野：再生医療

キーワード：水平性骨欠損 細胞移植 間葉系幹細胞 ES細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周組織の炎症性崩壊により歯の喪失を引き起こす感染症であり、歯を失う原因の43%を占め、その割合は加齢によって増加する歯周病によって歯の土台となる歯槽骨が完全に失われる(水平性骨欠損)と元の形態に自然回復することは不可能である。失われた咀嚼能力を再獲得するためのインプラント治療や義歯による補綴治療は、その支持母体となる十分量の歯槽骨がなければ奏功しない。これまで歯槽骨の再建治療として自家骨移植あるいは異種動物由来の移植製剤が使用されてきたが、脆弱で不均一な骨再生で咀嚼機能回復を示した治療実績の臨床報告はない。現在は水平性骨欠損に対しては、歯槽骨再建を行わなければ入れ歯もインプラント治療も実施不可能であり、咀嚼機能の改善は見込めない。現在歯周炎に対する治療は感染源を徹底的に取り除く対症療法が行われている。初期治療としてバイオフィilmを取り除く清掃指導、歯石除去に加え、歯周病原菌により汚染したセメント質や象牙質を機械的に除去する外科的切除法が標準治療として行われている。これらの処置で炎症状態が改善し、歯周組織に内在する組織幹細胞により歯周組織の治癒は期待されるが、歯周組織が高度に破壊した重篤な症例では、術後炎症の軽減や歯周ポケットの減少が認められるもの、機能的な歯周組織の再生はほとんど期待できない。このことから口を介したQOLの維持を目的とした歯の保存治療を確立するためには、高度に崩壊された歯周組織に対する再生医療の開発が必要不可欠となる。現在、大型の骨欠損を回復するには間葉系幹細胞移植による再生療法が行われてきた。しかし問題点として、間葉系幹細胞は高齢者から採取困難であることと、骨芽細胞への分化誘導を必要とするため、自家移植療法による骨再生能力に限界のあること、患者自身の幹細胞の増殖・分化能力が低い場合の対策が課題として挙げられてきた。本研究では3次元的に骨再生を誘導するために大量に必要とするヒト骨芽細胞をヒトES細胞から供給し、3次元培養にて作製したヒト人工顎骨を、歯周病で失われた顎骨組織再生材料として開発する計画を立案した。このように本研究は、これまで問題とされていた再生医療における3次元培養技術に革新的な進歩をもたらす。さらに歯周病のみならず整形外科領域の骨再生医療、人工臓器作製、各臓器にカスタマイズされた新たな組織工学技術開発へ発展可能であることから、再生医療の適応拡大に大きく貢献することが期待される。

### 2. 研究の目的

アンメットメディカルニーズである水平性骨欠損に対する新規の骨再生療法の開発を目標に設定した。本研究計画ではヒト胚性幹細胞(ES)細胞由来の骨芽細胞から人工骨マトリックスを作製し、これをプラットフォームとした新規の骨再生医療等製品の開発を行う。ロット管理や安全性試験が完了し、かつ大量培養が可能なヒトES細胞から骨芽細胞を誘導することで、これまで問題となっていた3次元的な骨再生を可能にする足場製剤の開発を目指す。そのため本課題ではヒトES細胞から誘導した骨芽細胞の3次元培養を行い、人工骨マトリックス作製技術を開発したのちに、マイクロミニプタを用いて水平性骨欠損モデルを用いて実現可能性を検証する。すなわち水平性骨欠損に対して、ヒトES細胞を用いた骨再生医療製品による新規治療法の開発を目的としている。

### 3. 研究の方法

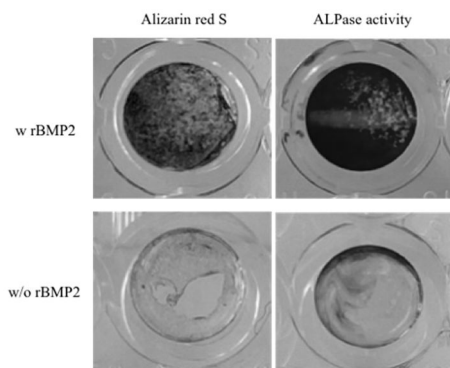
(1)ヒトES細胞由来間葉系幹細胞を分化誘導することによって骨芽細胞を作成し、最終的には人工骨マトリックスを作成し、骨補填材に用いることを最終目標にしている。そのため、マウス骨芽細胞由来細胞株を用いてin vitroにおける分化誘導実験を行い分化条件の整備を行った。

(2)人工骨マトリックス作成のための、免疫不全症マウスへの移植実験による分化誘導実験のため、マウス骨芽細胞由来細胞株を免疫不全症マウスの背部皮下に移植し、最終的な人工骨マトリックスのサイズを規定した。

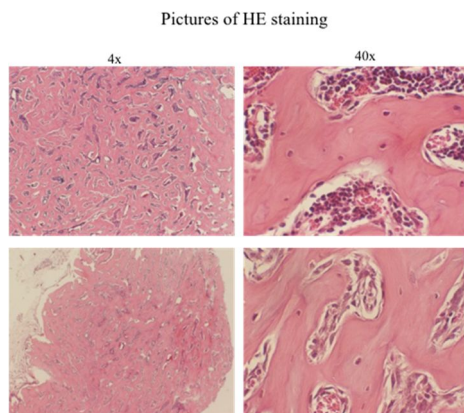
### 4. 研究成果

( 1 ) マウス由来骨芽細胞用細胞の分化誘導

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞を採取し、rBMP2 添加によってアリザリンレッド染色陽性、アルカリフォスファターゼ陽性の条件が確定できた。



( 2 ) 免疫不全症マウス背部皮下にマウス骨芽細胞用細胞を移植したところ、下図に示すようにコツ用石灰化物の形成が確認された。本研究成果を基に ES 由来間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞の移植を検討する。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sato N, Handa K, Venkataiah VS, Hasegawa T, Njuguna MM, Yahata Y, Saito M.	4. 巻 39(2)
2. 論文標題 Comparison of the vertical bone defect healing abilities of carbonate apatite, $\beta$ -tricalcium phosphate, hydroxyapatite and bovine-derived heterogeneous bone.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dent Mater J.	6. 最初と最後の頁 309-328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2019-084	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 長谷川 達也, 中野 将人, 鈴木 重人, 半田 慶介, 八幡 祥生, 佐藤 暢也, 齋藤 正寛	4. 巻 41(1)
2. 論文標題 根尖性歯周炎の免疫学と治療抵抗性に対する新規歯内療法開発への課題	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯内療法学会雑誌	6. 最初と最後の頁 8-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20817/jeajournal.41.1_8	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 V. VENKATA Suresh, Keisuke HANDA, Mary M. NJUGUNA, Tatsuya HASEGAWA, Kentaro MARUYAMA, Eiji NEMOTO, Satoru YAMADA, Shunji SUGAWARA, Lu LU, Masahide TAKEDACHI, Shinya MURAKAMI, Hanayuki OKURA, Akifumi MATSUYAMA and Masahiro SAITO	4. 巻 29;9(1)
2. 論文標題 Periodontal Regeneration by Allogeneic Transplantation of Adipose Tissue Derived Multi-Lineage Progenitor Stem Cells in vivo,	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 921
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-37528-0.	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 高見澤 哲矢, 半田 慶介, 鈴木 重人, 長谷川 達也, 中野 将人, 八幡 祥生, 齋藤 正寛	4. 巻 63
2. 論文標題 歯根尖切除術の教育用顎模型システムの開発とその評価	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 188 ~ 198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11471/shikahozon.63.188	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 Sudo Susumu, Handa Keisuke, Kanehira Masafumi, Yahata Yoshio and Saito Masahiro.	4. 巻 28(2)
2. 論文標題 Effect of Antiseptic Agents on the Surface Microhardness of Calcium Silicate-Based Materials.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Journal of Scientific & Technical Reserch	6. 最初と最後の頁 21350-21356
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 有
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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 八幡 祥生, 鈴木 重人, Njuguna Mary M., Venkataiah Suresh V., 半田 慶介, 齋藤 正寛
2. 発表標題 未分化骨芽細胞と3次元ポリ乳酸複合体を用いた歯槽骨再生医療の開発
3. 学会等名 151回日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 重人, Njuguna Mary M., Venkataiah Suresh V., 中野 将人, 八幡 祥生, 半田 慶介, 齋藤 正寛
2. 発表標題 臨床応用を目指した歯槽骨由来未分化前骨芽細胞の分離培養システム構築
3. 学会等名 151回日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高見澤 哲矢, 鈴木 重人, 長谷川 達也, 佐藤 暢也, 八幡 祥生, 半田 慶介, 齋藤 正寛
2. 発表標題 歯根端切除術の教育を目的とした顎模型システムの開発とその評価
3. 学会等名 150回日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤 享, 半田 慶介, 兼平 正史, 八幡 祥生, 齋藤 正寛
2. 発表標題 消毒剤がケイ酸カルシウム系セメント表面硬度に与える影響
3. 学会等名 150回日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 利典, 半田 慶介, 兼平 正史, 長谷川 達也, 野杵 由一郎, 齋藤 正寛
2. 発表標題 フタ感染根管における各種根管洗浄法の評価
3. 学会等名 日本歯内療法学会学術大会39回
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 半田 慶介, 丸山 顕太郎, 根本 英二, 竹立 匡秀, 村上 伸也, 山田 聡, 齋藤 正寛
2. 発表標題 他家脂肪組織由来多系統前駆細胞による前臨床研究について
3. 学会等名 日本歯周病学会学術大会秋季
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川 達也, 半田 慶介, 田中 利典, 矢島 健大, 野杵 由一郎, 齋藤 正寛
2. 発表標題 マウスモデルを用いた根尖性歯周炎発症過程の解析
3. 学会等名 日本歯科保存学会学術大会149回
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 利典, 半田 慶介, 兼平 正史, 長谷川 達也, 野杵 由一郎, 齋藤 正寛
2. 発表標題 ブタを用いた根管内バイオフィルムモデルの確立
3. 学会等名 日本歯科保存学会学術大会149回
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 千田彰 編集代表 / 宮崎真至・林美加子・向井義晴・齋藤隆史	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 280
3. 書名 保存修復学 第7版	

1. 著者名 半田慶介、齋藤正寛	4. 発行年 2018年
2. 出版社 デンタルダイヤモンド	5. 総ページ数 147
3. 書名 マストオブイニシャルトリートメント(第2章作業長決定の重要性)	

〔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	齋藤 正寛  (SAITO Masahiro)  (40215562)	東北大学・歯学研究科・教授   (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山田 聡  (YAMADA Satoru)  (40359849)	東北大学・歯学研究科・教授    (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関