

平成 21 年 3 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007年度～2008年度

課題番号：19592140

研究課題名（和文）多孔体 HAp ブロック体を足場とする歯根膜細胞の 3 次元高密度培養と石灰化誘導

研究課題名（英文）Three-dimensional high density culture of periodontal ligament cells on porous HAp blocks and their osteogenic induction

研究代表者 川瀬 知之 (KAWASE TOMOYUKI)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90191999

## 研究成果の概要：

歯科臨床で採取できる細胞を生物材料として、多孔質 HAp ブロック体内で 3 次元高密度培養を可能とすること、またこれらの過程を経て作製された「培養人工骨」の骨形成能を検証することが本研究の目的であった。当初細胞ソースとして表題にも掲げていたヒト歯根膜(PDL)細胞は定期的な入手が困難になってきたことから、ヒト骨膜細胞に変更して研究を遂行した。

並行する研究において、ヒト骨膜細胞シートの顕著な類骨形成能を示したが、HAp 多孔体で培養した分散骨膜細胞にも類骨形成能があることを証明できた。すなわち、近い将来の臨床応用を視野に置いた培養骨作製が、われわれの培養プロトコールによって確立された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：組織工学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：ハイドロキシアパタイト、3次元高密度培養、異所性骨形成、骨誘導能、培養骨膜

## 1. 研究開始当初の背景

ハイドロキシアパタイト(HAp)ブロックを用いて、培養人工骨を組織工学的に作る試みは決して新しいものではない。しかし、中～大規模骨欠損を対象とする整形外科領域で求められる要件を、そのまま小規模な歯周病による歯槽骨欠損に当てはめるのは無理がある。たとえば、歯周組織再生において、細胞の足場に求

めるのは、物理的強度よりも細胞浸透を容易とする気孔構造と自家新生骨による置換を誘導しうる性質である。また、生物材料的には、患者への様々な負担が大きく、歯科医師の日常治療活動にはなじまない骨髄穿刺によって得る骨髄幹細胞を使うよりは、口腔内から容易に採取できる細胞を使うことのほうが道理にかなっている。そこで、本研究は、歯

周再生医療の普及を究極の目標として、日常の歯科臨床の場で幹細胞となる材料を採取し、歯槽骨の小規模欠損に適した HAp 多孔体を用いて培養人工骨を作るべきものと考えた。具体的には、歯根膜細胞(PDL)と85%気孔率 HAp ブロック体の組合せを中心として研究を進める。

一方、その高い生体親和性から、足場としての HAp の歴史は古いにもかかわらず、最近ではポリ乳酸などの高分子化合物に研究対象としての主役の座を奪われている。その理由は、物理的強度を保ったまま十分な気孔や連通孔を確保できないため、細胞の高密度長期間培養が出来ないという点にあったと思う。われわれの共同研究企業であるペンタックス社は、HAp 多孔体にハニカムに近い構造を実現することによって、この欠点を克服した<sup>3)</sup>。ただし、この試料の主目的は直接の(細胞を含むとしても、事前培養をしない)移植であり、in vitro での組織工学的な目的への応用という観点からは、まだ解決すべき課題が残されている。現在、その欠点を特殊な表面処理技術(特許出願準備中)によって克服しているが、同時にメーカーとの共同で、本研究の主眼でもある「試料の中心部へ細胞を送り込み、そこで増殖・分化させる」ことを可能とする構造に進化・発展させるプロジェクトに取り組んでいる。

## 2. 研究の目的

高多孔質 HAp ブロック体を足場とした 3 次元高密度培養技術を確立し、それによって培養人工骨の作製を可能とし、歯周組織再生に関して新しい治療法開発の糸口とすることを目的にする。これらの技術は、将来的な一般開業歯科医への普及を前提としているので、PDL など口腔内から採取できる細胞を生物材料とし、培養法は極力簡便で低コストでなければならない。

これまで、HAp 多孔体中心部にまで細胞を浸透させ、そこで骨新生を誘導した事例(骨髄細胞を含めて)は報告されていない。そのために解決すべき課題を設定し、これまで工夫してきた HAp の表面処理法を実用化レベルまで引き上げて技術的に確立することと、様々な条件検討を通して簡便な 3 次元細胞培養技術の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

- 1) 細胞採取法: 本学病院口腔外科にて、患者同意のもとに、無菌的に骨膜を採取する(本学倫理委員会にて承認済み)。遊走細胞が重層シート状になる

まで培養を継続し、その後、トリプシン/EDTAにより分散し、サブカルチャーに移す。

- 2) 細胞播種: 細胞は通常の培養液に懸濁した状態で、自然吸収、減圧充填、圧力充填では不十分であることを経験上学んできた。しかし、細胞接着を促進するコラーゲンやポリリジンを塗布することでは解決しない。温度感受性でゲル状にもなる液体やたんぱく質、あるいはコラーゲンゲルを有効に使う手段を検討する。
- 3) HAp 多孔体の酸処理: これまで研究を重ねてきた酸処理技術は HAp の気孔率に応じて経験的に至適な濃度と時間を選択した。しかし、本研究では、エンドユーザー(歯科医師)でも処理レベルを容易に制御できる方法を確立するために、ペンタックス製気孔率 85% の HAp ブロック体を対象として処理方法をマニュアル化する。
- 4) 回転培養: 自作の回転培養器にて 1 週間以上培養する。その過程で dexamethasone などによる分化誘導を行なう。
- 5) 組織学的評価: HAp 多孔体の破断面における細胞局在を評価する。
- 6) 動物移植実験: ヌードマウス背部皮下に埋植し、類骨形成能を組織学的に評価する。

## 4. 研究成果

- 1) 本研究で使用した骨膜細胞の供給源である骨膜シートについて、その移植の適応拡大の一環として、その基本技術である歯周組織再生療法の完成度を高め、その臨床研究データを蓄積する必要がある。完成した骨膜シートを多血漿板血漿(PRP)や HAp 顆粒とともに用いて歯周骨欠損の顕著な骨再生に成功した。
- 2) PRP の組織工学的応用に関して、PRP 等を用いた骨膜の促成培養技術を開発した。これによって、45 日間を必要とした培養日数を 30 日程度まで短縮できるようになった。
- 3) ラットおよびヌードマウス背部皮下に酸処理 HAp 多孔体を移植し、組織・血管・細胞の浸入と炎症反応について検討した。その結果、酸処理は in vivo においても組織・細胞の侵入を容易とし、異物として排除される危険性を低減させることがわかった。
- 4) 移植した多孔体における骨誘導能を  $\mu$ CT あるいは骨シンチグラフィによって非侵襲的観察することが重要であると考えている。骨シンチグラフィについては、これまでに 12 例の検査をおこな

った。粉碎骨移植を採用した初期段階では、骨形成と思われる集積像の位置や組織像との照合に疑問点があったが、骨肉種細胞移植法の採用により、明確に一致した検出が可能となった。

- 5) 本格的な $\mu$ CT導入の前段階の条件検討という位置づけで、同時にX線撮影により変化を定量的に追跡する試みを行なった。IP(イメージングプレート)および携帯用デンタル撮影装置を導入し試験撮影を重ねた結果、骨シンチほどの鋭敏さはないものの、ポジティブな所見を得ている。
- 6) 酸処理したHApブロック体の物性を評価した。この状態のHApブロック体は、細胞のないブロック単体に比較して、脆弱さが改善された。圧縮強度は酸処理によって1/5-1/10程度に低下するが、ECMの豊富な細胞を含むHApブロック体ではそれが2-3倍程度上昇し、再処理以前のブロック体単体より若干劣る程度まで回復した。
- 7) in vitro研究において、ヒト骨膜細胞およびラット骨髄細胞(MSC)による3次元高密度培養を行ない、ヒトPDL細胞の性状と比較した。分化誘導したヒト骨膜細胞はHApブロック体内部の気孔にて、比較的少量の細胞外マトリックス(ECM)を産生し、細胞がその中に埋め込まれる状態を形成した。
- 8) ヒトPDL細胞は入手が不定期で、かつ量的な供給が期待できないこともあって、ストック中の継代数の比較的高い細胞を使用したためか、in vitroにおいてはある程度の石灰化を誘導できたものの、動物実験では気孔内に典型的な類骨形成を認めなかった。
- 9) in vivo動物実験において、これらの細胞を培養した人工骨をヌードマウス皮下に埋植し、それらの異所性骨形成活性を比較検証した。
- 10) ラットMSCはin vitroでの増殖活性が低いものの、動物に埋植後は、事前の分化誘導の有無にかかわらず、気孔内に典型的な類骨を形成した。しかも、そこにはカルシウムの沈着を確認され、成熟度の高い類骨と評価できた。
- 11) ヒト骨膜細胞は、ラットMSCに比較するとその活性は劣るものの、気孔内に未熟な類骨形成を誘導することができた。

以上の所見より、PDL細胞よりもPOs細胞のほうが口腔内で採取が容易とい

うこともあり、今後はこの細胞を材料として、培養法に若干の改良を加えれば、歯周組織再生のための「培養骨」として実用化できる方向性が見出せた。

#### 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 5 件)

- 1) Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, Nakata K, Yoshie H. Characterization of human cultured periosteal sheets expressing bone-forming potential: in vitro and in vivo animal studies. *J Tissue Eng Reg Med* DOI: 10.1002/term.156, 2009. 査読有
- 2) Yamamiya K, Okuda K, Kawase T, Wolff LF, Yoshie H. Tissue-engineered human cultured periosteum sheets combined with platelet-rich plasma and porous hydroxyapatite graft in treating human periodontal infrabony osseous defects: A comparative controlled clinical study. *J Periodontol* 79: 811-818, 2008. 査読有
- 3) Kawase T, Okuda K, Yoshie H. Extracellular ATP and ATP $\gamma$ S suppress the proliferation of human periodontal ligament cells by different mechanisms. *J Periodontol* 78(4):748-756, 2007. 査読有
- 4) 川瀬知之. ヒト培養骨膜のポテンシャル. *ザ・クインテッセンス* 27(9): 48-50, 2008. 査読無
- 5) 奥田一博, 山宮かの子, 川瀬知之, 吉江弘正. 培養骨膜シート移植を応用した歯周組織再生法. *ザ・クインテッセンス* 27(9):54-57, 2008. 査読無

[学会発表](計 7 件)

- 1) 中山 均, 川瀬知之, 奥田一博, 小神浩幸, 井上 晃, 織田隆昭, 羽山和秀, 土持 眞, Larry F. Wolff. 骨シンチグラフィを用いた骨再生用基材の骨誘導活性評価: 骨肉腫細胞と beta-TCP 顆粒を用いたパイロット研究. 第 8 回日本再生医療学会総会 (2009.3.5-6, 東京).
- 2) Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nagata M, Nakata K, Yoshie H. Evidence to support the clinical application of cultured human periodontal sheets: Evaluation of its bone-forming potential. The 94th Annual Meeting of the Amer Assoc Periodontol (2008.9.6-9, Seattle, WA, USA)
- 3) 中山 均, 小神浩幸, 竹内由一, 永田昌毅, 川瀬 知之. 骨シンチグラフィに

よる培養骨の骨誘導活性評価の試み  
- I. ポジティブコントロールの確立 -  
第 41 回新潟歯学会総会 (2008.4. 26, 新潟)

- 4) Okuda K, Yamamiya K, Kawase T, Hata K, Wolff LF, Yoshie H. Tissue Engineered Cultured Periosteum Sheets Combined with Platelet-Rich Plasma and Porous Hydroxyapatite in Regenerating Human Periodontal Infrabony Osseous Defects. Asia-Pacific Chapter - Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society International (2007.12.3-5, Tokyo, Japan).
- 5) Yamamiya K, Okuda K, Kawase T, Hata K, Wolff LF, Yoshie H. Tissue Engineered Human Cultured Periosteum Sheets Combined with Platelet-Rich Plasma and Porous Hydroxyapatite in Treating Human Periodontal Infrabony Osseous Defects. The 93rd Annual Meeting of the AAP (2007.10.27-30, Washington, D.C., USA).
- 6) 川瀬知之、奥田一博、吉江弘正、中田光. 医歯学総合病院生命科学医療センター再生・移植医療部門における歯周再生医療. 第 50 回日本歯周病学会春季学術大会 (2007.5.17-19, 横須賀).
- 7) 山宮かの子、奥田一博、川瀬知之、畠賢一郎、吉江弘正. 培養骨膜シート+多血小板血漿+多孔性ハイドロキシアパタイト顆粒の歯周骨内欠損に及ぼす効果 - 症例比較研究 : 6 ヶ月予後. 第 50 回日本歯周病学会春季学術大会 (2007.5.17-19, 横須賀).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 5 件)

- 1) 名称: 培養細胞が産生する石灰化物による骨形成・再生  
発明者: 川瀬知之  
権利者: 新潟大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2009-54261  
出願年月日: H21.3.6  
国内外の別: 国内
- 2) 名称: リン酸カルシウム系顆粒上での効率的 3 次元高密度培養による培養人工骨およびその作成方法  
発明者: 川瀬知之  
権利者: 新潟大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2008-152978  
出願年月日: H20.6. 11  
国内外の別: 国内
- 3) 名称: ヒト骨膜培養方法

発明者: 川瀬知之、奥田一博

権利者: 新潟大学

種類: 特許

番号: 特願 2007- 217340, PCT/JP2008/65050

出願年月日: H20.6. 11, H20.8.22

国内外の別: 国内, 国外

- 4) 名称: コンパクト回転培養システム及び培養容器

発明者: 川瀬知之、羽根邦夫

権利者: 新潟大学

種類: 特許

番号: 特願 2007-298869

出願年月日: H19.11. 19

国内外の別: 国内

- 5) 名称: ヒト歯根膜細胞株、この細胞株から分化した造骨細胞およびこの造骨細胞から作製した人工骨

発明者: 川瀬知之

権利者: 新潟大学

種類: 特許

番号: 特願 2007-147906

出願年月日: H19.11. 19

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川瀬 知之 (KAWASE TOMOYUKI)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 90191999

(2)研究分担者

奥田 一博 (OKUDA KAZUHIRO)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 00169228

(3)連携研究者

なし