

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592207
 研究課題名（和文）自家骨髄及び自家歯髄由来幹細胞の迅速大量培養による硬組織再生促進療法の臨床実用化
 研究課題名（英文）Clinical application of the hard tissue regeneration by rapid cell proliferation therapy with autologous bone marrow stromal cells transplantation
 研究代表者
 池田 毅（IKEDA TAKESHI）
 長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師
 研究者番号：90244079

研究成果の概要：事故や病気が原因で失った身体の一部や、細胞・器官を再生し機能回復させる再生医療には大きな期待が寄せられている。そこで細胞培養における高度な無菌環境や、細胞の品質確保、さらには細胞の迅速・大量な培養といったニーズがますます高まってきている。本研究では間葉系幹細胞に成長因子増殖法を応用したところ、従来法と比較して5～10倍の速度で増殖した。細胞の多孔性担体への侵入効率を上げるために減圧下（100mg）で細胞播種し、還流培養装置を用いて細胞が常に新鮮な培養液と接するような培養システムを構築し良好な結果が得られた。Scaffold に関してはアンモニアガスを用い、凍結乾燥処理をして得られたハニカム状凹型構造スポンジ体を作成し、細胞の担体への細胞接着が良好となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：迅速大量培養、減圧播種、還流培養、キトサン、ハニカム状多孔体、細胞移植療法

1. 研究開始当初の背景

本研究は今後3～4年後の臨床実用化を目標に、天然有機多糖体であるキトサンを自家細胞移植システムの Scaffold（担体）として用い、21世紀前半の医療として期待が多い再生医療の内、硬組織再生、特に歯槽骨および象牙質再生医療技術の開発・確立を目指すものである。再生医療における細胞移植療法とは、患者の組織から体外に取出した細胞（主に幹細胞）を、組

織工学の技術を用いて生体外で3次元細胞培養し、それを生体内に移植し組織を再生することであり、現在まで様々な方面から国内外問わず検討させているが、この技術を実用化するためには乗り越えなければならない幾つかの問題がある。

(1) 第一に、例えば生体から採取した骨髓液中の体性（間葉系）幹細胞を用い硬組織再生を目指す場合、幹細胞を効率的に増

殖させ、骨芽細胞、象牙芽細胞へ迅速に分化させる方法・手技を確立することが重要である。しかしながら骨髄より得られる間葉系幹細胞数には限りがあり、特に老人では十分な量の採取は困難となる。また、採取できても骨芽細胞への分化・増殖が遅ければ臨床的には実質的でない。したがって、いかに効率的に必要とする細胞を増幅させられるかが鍵となる。そこでこの点を解決するために、株化骨芽細胞様細胞 (NOS 1 細胞) で継代培養操作を行った結果、天然有機生理活性素材であるキトサンを極低濃度 (0.005mM) を添加することによって約 14 日後にコンフルエントとなり細胞増殖促進効果が確認できた。次いで骨芽細胞への分化に関して、mRNA 発現増強を定量的 PCR にて検討したところ、ALP,Osteocalcin および BMP-2 において有為に遺伝子発現の増強がみられた。また形態学的にも ALP 免疫染色、von kossa 染色およびアリザリンレッド染色にて石灰化様分泌物が確認できた。また同様にラット切歯より採取した歯髄組織を、極低濃度 (0.001mM) のキトサンを添加し継代培養操作を行ったところ、ALP,Osteocalcin および DSP において有為に遺伝子発現の増強がみられ、形態学的にもカルセインおよびアリザリンレッドにてラベリングした生細胞に対し共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところ、硬組織様細胞外基質形成促進作用が確認できた。これらの結果より骨および歯髄組織における硬組織再生に対しキトサンの有用性が実証できた。これらの知見を今後の臨床応用へ展開するにあたり、現実的には細胞移植療法手技の簡便さや確実性が求められるため、さらに精度の高い幹細胞の分化誘導および坦体内におけるより迅速な細胞増殖法の開発

が必要であると考え、減圧細胞播種・還流培養システムを利用した実験系を検討する。

(2) 次に問題となるのは将来人体に用いる医療を前提とした場合、坦体として用いるマテリアルの安全性の確保は当然のことながら、その形状物性や化学的特性、さらには様々な細胞増殖因子を徐放させるなどの付加機能性、適切なタイミングでの生分解性、加工性などを考慮したマテリアルエンジニアリングとしての研究、開発が急務である。これには細胞培養のための最適な Scaffold を創製することであり、その求められる条件は

①細胞活動に適した物理学的 3 次元環境であること。

②生体内に近似した生化学的環境を与えること。

③細胞機能を活性化する材料基盤であること、が挙げられる。

①には効率的に細胞や血管が侵入しやすいことが必要なことから多孔性材料、特に多孔体の気孔どうしがつながった連通構造を持つことが重要である。従来より骨形成の最適な気孔径はハーバース・システム系の直径に近い 300~400 μ m されており、さらにハニカム状トンネル型気孔、すなわち多孔性材料における内部の孔が直線またはカーブしたトンネル状の場合は、不規則な貫通孔よりも生物学的な幾何学効果があるとされ、ハニカム状凹型構造の機能は細胞同士を密集させ成長因子などの一時貯留を可能にし、代謝産物、特に I 型コラーゲンをはじめとする ECM の蓄積を容易にする。

②には坦体と細胞の複合体へ骨形成能を上昇させるような活性因子 (BMP など) を導入し、さらにその薬剤徐放能を有するマテリアルを応用することが挙げられる。この点に関して我々は、現在多孔性アパタイト/キトサ

ン複合坦体を試作し移植材料としての適用性を検討中である。これにはカルシウム溶液とリン酸溶液を用いた交互浸漬法にてキトサンスポンジ表面にアパタイト微結晶を沈着させることにより、有効表面積が膨大となり増殖因子や分化誘導因子の徐放能が向上することが期待される。予備実験段階ではあるが、rhBMP および bFGF を複合坦体へ減圧状態で吸着させ、培養液内に放出される有効成分の経時変化を測定したところ、キトサン単一坦体の場合より徐放効果が長期継続するという知見を得ている。

③には生体適合性および生分解性の高い材料であることが要求される。天然有機生理活性素材であるキトサンの歯科領域、特に歯内療法分野への応用について約 10 年前より基礎的臨床的な両側面から検討を継続している。根管内からの排膿や持続的浸出液のみられる難治性感染根管治療時にキチン綿を貼薬綿栓として応用し、生化学的臨床データ解析の結果、根管貼薬剤として根尖周囲病変の改善効果のあることが明らかとなった。また同時に歯髄保存療法である直接覆髄法へのキトサン応用に関して病理組織学的に検討した結果、好中球の走化性誘導能が弱く、生体適合性が良好であり臨床応用への可能性が高いことが証明できた。これら成果によって現在特許（第 3721400 号組織再生剤・第 3728513 号キトサンオリゴ糖含有抗菌剤）取得することができている。またキトサンの生体内分解性についても、動物実験において下顎骨内に移植し組織反応について免疫病理組織化学的および電子顕微鏡的観察を行った結果、まず Mφ などの貪食系細胞から分泌されるリゾチームによるキトサン表層部の溶解（液性免疫）が起こり、次いで表層溶解した部分を直接貪食するという体性免疫が発揮される現象が確認できた。

多孔性坦体を用いて間葉系幹細胞を培養するにあたり、上記のような要件を満たすキトサンは良好な細胞接着能を有することにより、細胞支持層となって未分化な細胞が良好に増殖可能となる。またスポンジ状あるいはゲル状への加工が容易であることから、細胞複合坦体ごと組織内へ移植するという比較的簡便な手技で実施できる。また生体親和性があり低細胞障害性や抗菌性を示すことにより移植細胞の生存効率を飛躍的に向上させ、さらにキトサン自身が硬組織形成賦活効果を有し、生体内分解を受けることにより活性因子の徐放能を保持しながら、適度な時期に坦体のみ溶解・分解され速やかに周囲硬組織に置換されるという機能的な組織再生療法となりうる。

2. 研究の目的

(1) 間葉系幹細胞増殖の効率化と骨芽細胞および象牙芽細胞への分化誘導促進化技術の開発；キトサン投与の有無による Gene Fishing 法とリアルタイム PCR による増幅産物の厳密な定量分析によって、硬組織形成関連遺伝子 (ALP, Osteocalcin, BMP-2, BSP, DSP, DMP-1 等) の同定を行い、坦体としてのキトサン自身の幹細胞に対する硬組織形成賦活効果を証明する。また細胞の多孔性坦体への侵入効率を上げるために減圧下 (100mg) で細胞播種し、還流培養装置を用いて細胞が常に新鮮な培養液と接するような培養システムを構築することによって、骨芽細胞および象牙芽細胞への分化・増殖をより促進化できることを実証する。

(2) Scaffold の幾何学的三次元構造と細胞分化・増殖の検討；キトサン溶液をアンモニアガスで中和させ、凍結乾燥させることによって得られたハニカム状凹型構造を有するスポンジ状坦体を作成し、この構造により培養細胞の接着や栄養供給・老廃物の排出がス

ムーズに行われ、孔内面全体に確実な細胞増殖および基質産生が起こることを分子生物学的および形態学的に証明する。

(3) 前臨床試験としての動物実験におけるセルデリバリーシステム（細胞移植療法）の確立；骨欠損部や歯髄露出部へキトサン scaffold 上で3次元培養した骨芽細胞および象牙芽細胞を移植し、骨様組織および象牙質様組織新生促進効果について各々の細胞の組織内局在性、分化成熟度および硬組織基質形成度について、免疫組織化学的に証明する。

3. 研究の方法

(1) 間葉系幹細胞増殖の迅速化

臨床応用を想定しヒト成人に相当する6週齢雄性ラット下顎骨から骨髓液を採取し、比重遠心法により骨髓間質細胞を抽出後、間葉系幹細胞(BMSCs)を分離する。分離した細胞に10%ラット血清を添加したDMEM培地で初代培養を行い、その後5%CO₂、37℃下で無菌的に継代培養操作に移行し、コロニーが形成された時点で、従来法よりも数万倍～100万倍に増殖するといわれる成長因子増殖法（線維芽細胞成長因子（bFGF）を1ng/ml培養液に添加を応用し幹細胞の大量培養の迅速化を図る。目標としては100mmの培養皿1×10⁶cells播種し約10日後のコンフルエントをめざす。また培養細胞の一部に対し、BMSCsとしての性質を保持していることをフローサイトメーターにて表面抗原が未分化状態の指標であるCD34、C-kit、Sca-1の発現によって評価する。

また、ラット切歯から採取した歯髄細胞より当教室に既設の細胞粉碎装置および超遠心機等を使用し分離・分画した歯髄幹細胞(DMSCs)に対しても同様の継代迅速培養操作を行い、STRO-1、CD146による評価を行う。

(2) キトサンによる骨芽細胞および象牙芽細胞への分化誘導促進化

(1) で迅速培養された BMSCs の骨芽細胞への分化誘導を促進する目的で、硬組織誘導培地（アスコルビン酸、β-グリセロリン酸お

よびデキサメサゾン含有 DMEM）へ生理活性物質としてキトサン溶液を添加する。当教室での従来の研究成果より、モノマータイプが最も好中球の化学走性が低いことが判明しているため、将来的な生体応用を目標とする観点から分子量約 200Da、脱アセチル化度 90% のものを 0.1%酢酸溶液に溶解させ、pH7.4 に調整し使用する。また、キトサン添加の有無による培養細胞の骨芽細胞の初期分化マーカーである ALP 活性への影響を当教室既設の分光光度計で計測し比較検討の上、細胞活性に対する評価を行う。分化誘導状況については、培養細胞の形態変化（大型化）を倒立培養顕微鏡下で確認後 RNA を回収し、キトサン刺激により発現量に変化する遺伝子（Differentially Expresed Genes）を偽陽性なしに真の検出が可能となるよう開発された Gene Fishing 法を用いスクリーニングを行う。その結果をもとに生物学的石灰化現象と深い関連があるとされている ALP, Type I collagen, osteocalcin, BMP-2 および BSP のターゲット遺伝子に特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR 法による cDNA の厳密な定量分析を実施し分化レベルを確認する。形態学的にも ALP 免疫染色、von kossa 染色およびアリザリンレッド染色にて確認することでキトサンの生物学的石灰化促進能を証明する。

DMSCsから象牙芽細胞への分化誘導に対しても同様に上記ターゲット遺伝子およびDentin sialoproteinのmRNA発現状況を比較検討しキトサンによる象牙芽細胞への分化誘導効果を確認する。

従来よりキトサンによる分化誘導促進能は細胞膜上の何らかの受容体等を介しての核内シグナル伝達が発動すると示唆されているが詳細は不明であり、この点が可視化できればキトサンの有用性の重要な裏付けとなる。そこで最近のナノテクノロジーの大き

な発展の一つである蛍光性量子ドットを利用しバイオイメージングすることによって細胞レベルでの特定分子の動的かつ詳細な解析を行う。

(3) キトサンScaffold (坦体) の作成

坦体として使用する分子量約1万、脱アセチル化度90%のキトサンモノマーを90%イソプロパノールと反応させたのち、真空定温乾燥器にて完全乾燥させることにより、カルボキシメチル化キトサン(CM-C)の誘導体を作成する。この理由は分子鎖上のカルボキシメチル基がCaと強固なキレート結合する性質を有することより、後の生体内坦体移植の際に周囲脈管系組織由来のCa²⁺の取り込みを促進させるためである。作成したCM-Cの物性評価のために共同研究施設のFTIRによる1735cm⁻¹の吸光スペクトルおよびNMR測定による3.25ppmのスペクトル発現にて確認する。このCM-Cを1%酢酸溶液にて溶解させpH7.4に調整後、2%CM-C溶液を作成し、5%トリポリリン酸ナトリウムをcross-linkerとして用いて物理的強度を向上させる。調整したCM-C溶液と5%アンモニア溶液を密閉槽内で20h反応させることにより発生する気体の均一な揮発効果により連通状気孔、すなわちハニカム状トンネル型多孔体が作成される。この方法をさらに応用し回転型低温トラップにて-20℃にて予備重合した凍結乾燥装置により-80℃にてThermally Induced Phase Separation法によりスポンジ状とする。その際、骨芽細胞および象牙芽細胞の坦体への細胞接着が良好となり、移植部位からの細胞拡散を防止するためpore sizeが200~400μm、気孔率が70~80%になるよう溶液の濃度調整を行い、走査型電子顕微鏡にて確認する。しかしながら歯科治療を想定する場合、術野が狭く象牙質欠損部と同サイズの移植体を作製し、露髄部へ固定することは非常に困難であることが予想されるため、スポンジ形態

よりも直接注入移植可能なゲル状Scaffoldを作製し移植細胞を包埋する方法を検討する。この場合にはキトサンゲル表面にアパタイト微結晶を沈着させる目的でカルシウム溶液とリン酸溶液を用いた交互浸漬法を応用する。

(4) CM-Cへの細胞播種および二次培養

硬組織再生促進化のための培養技術では、細胞の坦体への侵入効率と坦体内での増殖、分化の促進化が重要になってくる。細胞の坦体への侵入効率を上げるために減圧下(100mg)で播種すると多孔質体の中心部まで侵入し、その結果侵入効率の亢進が骨形成能を上昇させる。また通常1mlあたり100万個の濃度で多孔体に播種するので通常の静置培養ではいかに頻繁に細胞培養液を交換しても、十分な酸素と栄養分を供給されているか、細胞の排泄物の残存によって細胞の成長、分化の阻害がおこらないかが疑問であるため、還流培養システムを用いて細胞へ常に新鮮な培養液と接するような実験系を作ることによって細胞増殖・分化が更に亢進することを目指す。これにより従来法よりも短期間での生体内への培養細胞移植療法を実現することが可能となる。具体的には幹細胞採取から2~3週間後の生体内移植を目標とする。

(5) 前臨床試験としての細胞移植

6週令ラットを用い下顎骨両側のオトガイ孔後方の骨隆起部前方に円筒形窩洞を、また切歯歯根相当部から歯根表面に露髄面を形成する。窩洞内に上記スポンジ状坦体内で三次元培養した骨芽細胞を留置し、露髄面には上記ゲル状坦体内で培養した象牙芽細胞を注入移植する。経時的な(細胞移植後1週~24週を目安)下顎骨内骨欠損部の新生骨形成度および切歯露髄面での有細胞性新生象牙質形成度について50kv、0.75mAの条件下でmicro-CT images(3DX™)を使用し、Scion Image Softwareにて画像解析を行うと共に、組織

切片作製しALP, Type I collagen, osteocalcin, BMP-2 およびBSPやDSPの特異的プライマーを作成後、in situ hybridization法にて組織内の骨芽細胞および象牙芽細胞の局在性、分化、成熟度および新生骨基質を検討する。また形態学的にCa親和性のある蛍光色素であるカルセインを腹腔内に投与し、共焦点レーザー走査型顕微鏡にて経時的な硬組織形成度を定量評価し、実際の臨床応用におけるタイミングの良い移植時期を検討する。

4. 研究成果

ラット下顎骨から分離した間葉系幹細胞(BMSCs)に成長因子増殖法を応用したところ、100mmの培養皿 1×10^6 cells播種し約14日後のコンフルエントとなった。キトサン投与の有無によるGene Fishing法とリアルタイムPCRによる定量分析によって、硬組織形成関連遺伝子の発現を検討したところ、0.005%添加した状態が最も上記遺伝子群の発現増強が確認できた。細胞の多孔性担体への侵入効率を上げるために減圧下(100mg)で細胞播種し、還流培養装置を用いて細胞が常に新鮮な培養液と接するような培養システムを構築し良好な結果が得られた。Scaffoldに関してはアンモニアガスを用い、凍結乾燥処理をして得られたハニカム状凹型構造スポンジ体を作成し、細胞の担体への細胞接着が良好となり、担体移植部位からの細胞拡散を防止するためpore sizeが200~400 μ m、気孔率が70~80%になるよう調整可能となった。現在はこれら細胞-担体複合体を生体内へ移植し、硬組織再生に関して病理組織ならびに免疫組織学的検討を加え、また形態学的にCa親和性のある蛍光色素であるカルセインを腹腔内に投与し、共焦点レーザー走査型顕微鏡にて経時的な硬組織形成度を定量評価し、実際の臨床応用におけるタイミングの良い移植

時期を検討中である。

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 1件)

Yamada S, Ikeda T, Ganno T, Ohara N, Hayashi Y Chitosan monomer accelerates alkaline phosphatase activity on human osteoblastic cells under hypofunctional conditions. J Biomed Mater Res A83 (2) 290-295 2007 査読あり

[学会発表] (計 3件)

① Yamada S, Ikeda T, Yanagiguchi K and Hayashi Y: The effects of fish collagen peptides on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. The 4th International Symposium on Apatites and Correlative Biomaterials. 11th September, 2008. Manila, Philippines

② 山田志津香, 池田 毅, 柳口嘉治郎, 林善彦: フィッシュコラーゲンペプチドのヒト骨芽細胞増殖・分化に及ぼす影響 第128回日本歯科保存学会春季学術大会2008年6月5日 新潟

③ 柳口嘉治郎, 池田 毅, 松永常典, 山田志津香, 林 善彦: キトサン, フィッシュコラーゲンを硬組織創傷へ応用時の初期炎症反応 第21回キチンキトサンシンポジウム2007年7月26日 神戸

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: 骨再生剤及び骨を再生する方法

発明者: 林 善彦, 山田志津香, 池田 毅, 柳口嘉治郎

権利者: 同上

種類・番号: 特願2007-273714

出願年月日: 2007年10月22日

国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 毅 (IKEDA TAKESHI)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 90244079

(2) 研究分担者

柳口 嘉治郎 (YANAGIGUCHI KAJIROU)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 50264255

山田 志津香 (YAMADA SHIDUKA)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 00363458