

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19791625
 研究課題名（和文）ヒトさい帯由来幹細胞を用いた歯周組織再生療法に関する集約的研究
 研究課題名（英文）Consolidated research on periodontal regeneration
 using human umbilical cord derived cells

研究代表者

金指 幹元 (KANAZASHI MIKIMOTO)
 鶴見大学・歯学部・助教
 研究者番号：80339811

研究成果の概要（和文）：

新たな間葉系細胞ソースとしてヒト臍帯動・静脈周囲に存在する臍帯由来間葉系細胞（以下細胞と略す）が報告された。本研究では細胞を分離・培養し、その基本特性の解析、さらに石灰化誘導を確認することで、新たな再生療法開発への可能性を検討した。

細胞表面抗原解析の結果、骨髄由来細胞と同様の性質を示した。石灰化誘導した細胞は硬組織関連遺伝子の発現を確認した。よってこの細胞は骨髄由来細胞と同様な特性を有し、新たな再生療法開発への可能性を有する細胞であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We studied the possibility of tissue regeneration using human umbilical cord derived cells. Flow cytometry revealed the prospective evaluation that is most of the cells were CD44 positive, CD34 negative, whereas most cells were STRO-1 negative.

Following AA, β -GP and Dex treatment, cells failed to fuse and transdifferentiated along an osteogenic pathway expressing OC, BSP and COL I. These results show that human umbilical cord derived cells pluripotent stem cells capable of differentiation along osteogenic lineages.

Human umbilical cord derived cells may have a possibility for the development of new tissue regeneration therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：歯周組織再生

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯学、臍帯、再生医学、移植・再生医療、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

すでに臨床研究が行われているヒト骨髄由来間葉系幹細胞を利用した歯周組織再生療法はその有用性が確立されつつあり、わが国の細胞再生医療研究は世界最先端といっても過言ではない。しかしながら自己細胞を用いた再生療法ははまだ臨床研究の段階で、歯周組織再生細胞製剤は存在しない。

研究代表者は、2005年3月より1年間 Institute of Biomedical & Biomedical Engineering (Bone Interface Group), Faculty of Dentistry, University of Toronto (Chief & Chair Professor John E Davies) にて研修する機会を得て、ヒト臍帯動・静脈周囲に存在する間葉系細胞 Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) cells (Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors.: Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D *et al.*, Stem Cells, 23:220-229, 2005) について、その分離、培養および凍結保存に関する研究を行った。

臍帯由来間葉系細胞は、その採取に際してドナーへの侵襲がなく、ウイルス感染の危険性や抗原性が少ない可能性が示唆され、新たな細胞ソースとして注目されている。

本研究は、日本での分離・培養、さらには利用の報告がなく、研究代表者がトロント大学留学時に自ら分離・培養して、凍結保存した臍帯由来間葉系細胞の特性を解析することで、新たな歯周組織再生療法を開発する基礎データを得る。その結果、臍帯由来間葉系細胞を利用した歯周組織再生過程のメカニズムが明らかにされ、さらに長期間に及ぶ凍結保存の方法に検討を加えることができれば、自己細胞を用いた予知性の高いまったく

新しい歯周組織再生療法が開発され、臨床応用へ展開できる可能性がある。

2. 研究の目的

歯周組織再生療法として現在 GTR 法、EmdogainGel などが臨床応用されているが、多様な歯周組織病変にはそれらの適応症が限られており、さらに完全な歯周組織の再生は望めないのが現状である。

2007年第49回日本歯周病学会秋季学術大会ワークショップⅡ「幹細胞生物学と歯周病学の接点を探る」において、広島大学の川口浩之助教授が「自家骨髄間葉系幹細胞移植法を用いた歯周組織再生療法」(川口浩之、日歯周誌 48:69)について、さらに大阪大学の橋川智子助手が「脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生療法確立の展望」(橋川智子、日歯周誌 48:73)について講演し、細胞移植による新しい歯周組織再生療法の可能性を報告した。

研究代表者は、2005年3月より1年間、組織工学的歯周組織再生療法を開発するため、トロント大学に留学し、ヒト臍帯動・静脈周囲に存在する間葉系幹細胞である Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells について、その分離・培養方法を取得、また骨芽細胞へと分化誘導させる研究に従事し、ある条件で培養を行なうとノジュール形成(石灰化結節)を引き起こすことを確認した。

この臍帯由来間葉系細胞の特性を解析し歯周組織再生療法へ応用する基礎的データを集約することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

2007年度は、トロント大学留学時に自ら分離、培養ならびに凍結保存した臍帯由来間葉系細胞2検体を用い、以下の研究を行った。

細胞の詳細は、生理活性物質で未刺激の細胞（未継代で凍結保存したもの：以下P0-Non）1検体、ならびに骨分化誘導培地で分化誘導した細胞（継代数3：以下P3-Osteo）1検体であった。

(1) 免疫不全動物への移植実験

P3-Osteo を増殖培地（15%FBS、167units penicillin G、50 μ g/ml gentamicin、0.3 μ g/ml amphotericin Bを含有する α -MEM）に分化誘導試薬（50 μ g/ml ascorbic acid、10M/l β -glycerophosphate、 10^{-8} M/l dexamethazone）を添加した Full supplement α -MEMにて培養して5継代（P5）時の細胞を用いた。

担体として直径5x高さ5mmのCaP-PLGA高分子（カルシウム強化型ポリ乳酸）を用いた。細胞を 1.0×10^7 /CaP-PLGAに調整し、細胞-担体からなる複合体を作製した（下図）。



1) PLGA CaP+ CaP coated Scaffolds
2) Polyurethane Scaffolds
(density 2×10^5 cells/scaffolds)
in vitro period for 2 weeks

複合体は2週間培養後に免疫不全動物（nude mice）背部皮下に移植した。対照には分化誘導をかけない細胞（P0-Nonの5継代め）を用いた。移植期間は5週、10週とし、通法に従い組織学的に観察した。本動物実験に際し、実験動物用麻酔器（株式会社メディケアー24）を用いた。



Composites implanted into nude mice



Specimens harvested after 5, 8 and 12 weeks

(2) フローサイトメトリーを用いた表面抗原の解析

P0-Non、P3-Osteoをそれぞれフローサイトメトリーにより間葉系幹細胞のマーカーで

あるといわれるCD44、CD117の表面抗原の確認を行った。

(3) 本邦における臍帯由来間葉系細胞の分離、培養システム構築

初年度は臍帯由来間葉系細胞がトロント大学の2検体しか解析することができなかったため、鶴見大学歯学部倫理委員会の審査と承認のもと協力医療機関より臍帯の提供を受け入れる体系を構築した。

2008年度は、鶴見大学歯学部倫理委員会の審査と承認のもと協力医療機関より3検体の臍帯を受け入れ、以下の研究を行った。

(1) 本邦初となる臍帯由来間葉系細胞の分離、培養と細胞の基本特性解析

臍帯由来間葉系細胞はSarugaserらの方法に従い、まず得られた臍帯を5~6cmに細切し、外膜を取り除いた。続いてWharton's jelly層より臍帯動脈および静脈を摘出しCollagenase Type I（1mg/ml, Sigma, USA）を用いて37°Cで18~24時間酵素消化することで細胞成分を分離することで初代臍帯由来間葉系細胞を回収した。

初代臍帯由来間葉系細胞は15% FBS含有 α -MEM中に懸濁し、T-75フラスコに播種し37°C、5% CO₂条件下で培養を開始した。

1週間ごとに継代操作を繰り返し、増殖率、蓄積分裂回数を10継代まで求めた。

(2) 骨芽細胞への分化誘導（分化能検証）

3継代目の臍帯由来間葉系細胞を骨分化誘導試薬（50 μ g/ml ascorbic acid、10M/l β -glycerophosphate、 10^{-8} M/l dexamethazone）を添加したFull supplement α -MEMにて培養した。対照は増殖培地を用いた。

各培地は2日ごとに交換を行い、分化誘導後7日目にRNAqueous®（Ambion Inc., USA）を用いてトータルRNAを抽出分離した。そのトータルRNAを元にReady to go You-primed

First-Strand Beads (Amersham - Pharmacia Biotech, USA) を用いて 1st ストランドテンプレートを作製調整した。グリセルアルデヒド-3 リン酸-デヒドロゲナーゼ (以下 GAPDH と略す) (Clontech, USA) を基準とし、の硬組織 Osteocalcin、Bone sialoprotein、Type I collagen 関連遺伝子発現を確認するため RT-PCR を行い各遺伝子を増幅した。

RT-PCR 反応終了後、4.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにて染色、紫外線下で PCR プロダクトを確認した。

なお、Osteocalcin、Bone sialoprotein、Type I collagen 各 PCR テンプレートの遺伝子発現量は GAPDH で標準化した後、各遺伝子の PCR プロダクトの発現量に対する比率を Lane & Spot Analyzer (ATTO) を用いて比較した。

またアリザリン染色も行った。

2009 年度は、協力医療機関より 3 検体の臍帯を受け入れ、以下の研究を行った。

(1) フローサイトメトリーを用いた表面抗原の解析

前述と同様に臍帯より細胞を分離、培養し、2 継代の臍帯由来間葉系細胞を通法に従い剥離、回収した。

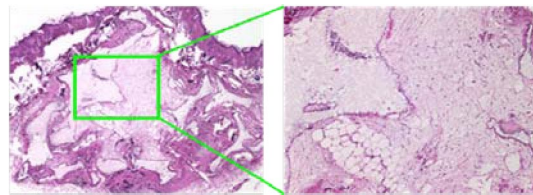
間葉系幹細胞のマーカーについては研究者により様々な報告があるが、本研究では得られた細胞について CD44、CD34、CD90、CD105 および STRO-1 の発現解析を行うため、CD44、CD34、CD90 および STRO-1 に対する FITC 標識モノクローナル抗体、CD105 に対する PE 標識モノクローナル抗体を用いたシングルカラー染色を行いフローサイトメーター Cytomics FC500M (ベックマン・コールター) を用いて各抗体の発現解析を行った。

4. 研究成果

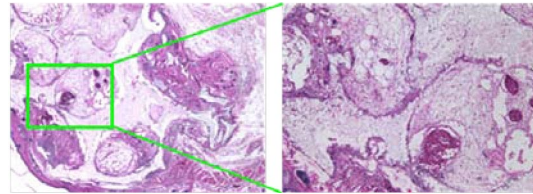
2007 年度

(1) 免疫不全動物への移植実験

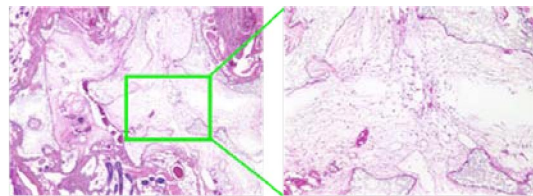
移植 5 週の病理組織化学像



移植 8 週の病理組織化学像



移植 12 週の病理組織化学像

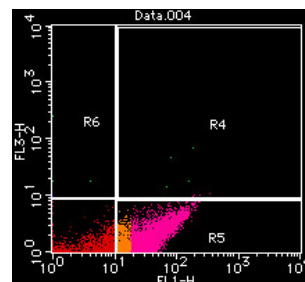


組織学的観察においても移植期間 5 週群、8 週群ならびに 12 週群を比較したところ明らかな違いは認められなかった (上図)。

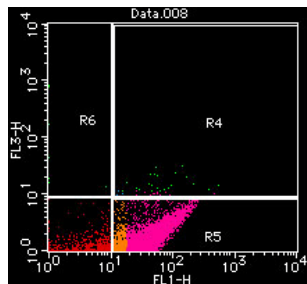
石灰化群ではわずかに骨様組織が観察されたものの、対照群と比較したところ明らかな違いは観察されなかった (対照群の写真は未掲載)。今後足場と細胞の組み合わせに検討を加える可能性が必要である。

(2) フローサイトメトリーを用いた表面抗原の解析

生理活性物質で未刺激の細胞 (P0-Non) について、CD44 抗原は約 50% の細胞に発現 (R5 の領域) しているものの、CD117 抗原はほぼ発現が認められなかった (R6 領域: 0.04%)。



骨分化誘導培地で分化誘導した細胞 (P3-Osteo) について、CD44 抗原は約 75% の細胞に発現 (R5 の領域) しているものの、CD117 抗原はやはりその発現が認められなかった (R6 領域: 0.07%)。



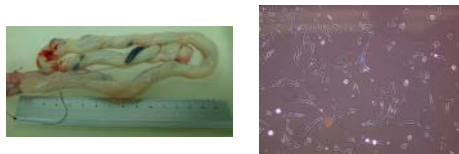
(3) 本邦における臍帯由来間葉系細胞の分離、培養システム構築

鶴見大学歯学部倫理委員会の審査と承認のもと 2 施設の協力医療機関より臍帯の提供を受け入れる体系を構築した。

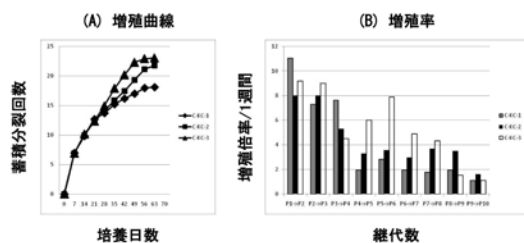
2008 年度

(1) 臍帯由来間葉系細胞の分離、培養と細胞の基本特性解析

本実験で受け入れた臍帯について、臍帯全長は平均 40~50 cm で、その直径は平均 1.0~1.5 cm であった。血管壁を傷つける事なく分離できた臍帯動脈数は 12~13 本、臍帯静脈数は 3~4 本であり、それらから得られた初代細胞数は 3.4~4.6x10⁶ 個で、いずれの細胞も線維芽細胞様の形態を示した。



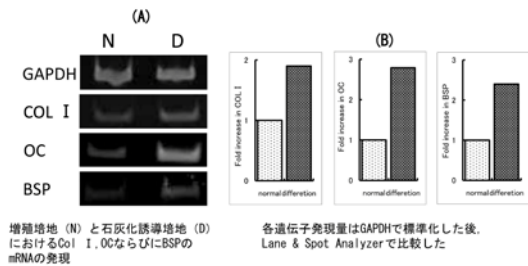
増殖速度は 2~4 継代で高く、最大で 11 倍であった。3 ヶ月以上の長期培養を実施した結果、全ての検体で細胞老化を認め、異常増殖は認められなかった。



(2) 骨芽細胞への分化誘導 (分化能検証)

硬組織関連遺伝子発現を RT-PCR 法にて確認したところ、増殖培地に比べ osteocalcin では約 2.8 倍、bone sialoprotein は約 2.4 倍、Type I collagen は約 1.9 倍強く遺伝子

を発現していることが確認されたことから、臍帯由来間葉系細胞は骨芽細胞へ分化することが示唆された。



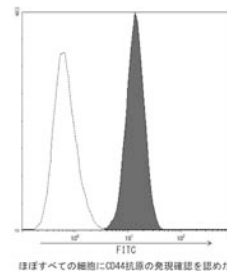
増殖培地 (N) と石灰化誘導培地 (D) における Col 1, OC ならびに BSP の mRNA の発現
各遺伝子発現量は GAPDH で標準化した後、Lane & Spot Analyzer で比較した

さらにアリザリン染色により濃染を認めた事から、本研究で用いた細胞は骨形成能を有することが明らかになった。

2009 年度

(1) フローサイトメトリーを用いた表面抗原の解析

CD44, CD90 および CD105 抗原は 98% 以上の細胞に発現していることがわかった。



ほぼすべての細胞に CD44 抗原の発現確認を認めた

これに対し造血系幹細胞マーカーである CD34 抗原の発現細胞は確認できなかった。また STRO-1 の発現細胞の確認もできなかった。今後マーカー遺伝子の数、並びに臍帯の検体数を増やし細胞特性を解析する必要があると思われる。

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)

- ① 金指幹元、井上剛臣、白川 哲、高森 靖、五味一博、新井 高: ヒト臍帯由来間葉系細胞を用いた再生療法開発に関する基礎的研究: 日保存誌 53(1):25~32, 2010 査読あり

〔学会発表〕（計4件）

- ①金指幹元、井上剛臣、松本 浩、島津光伸、
白川 哲、齊藤まり、五味一博、新井 高：
再生医療に用いる間葉系細胞の安全性確保：
2010年5月14-15日・第53回春季日本
歯周病学会学術大会（盛岡）
- ②金指幹元、白川 哲、矢作亜美、井上剛臣、
島 伸行、五味一博、新井 高：再生医療に
用いる間葉系細胞の安全性の確立：2009年5
月15-16日・第52回春季日本歯周病学会学
術大会（岡山）
- ③金指幹元、井上剛臣、島 伸行、五味一博、
新井 高：臍帯由来間葉系細胞の培養試験：
2009年3月5-6日・第8回日本再生医療学
会（東京）
- ④金指幹元、白川 哲、井上剛臣、島 伸行、
五味一博、新井 高：臍帯由来間葉系細胞の
培養試験：2008年11月6-7日・第129回日
本歯科保存学会秋季学術大会（富山）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金指 幹元 (KANAZASHI MIKIMOTO)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：80339811

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし