

機関番号：34408
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20592246
 研究課題名（和文） 歯髄・象牙質複合体再生のためのスポンジ状担体の開発と担体内骨形成促進因子
 研究課題名（英文） Development of sponge scaffold and osteogenic promoting factors in the scaffold for dentine-pulp complex regeneration
 研究代表者
 好川 正孝（YOSHIKAWA MASATAKA）
 大阪歯科大学・歯学部・講師
 研究者番号：70148451

研究成果の概要（和文）：セラミックス多孔体を未分化間葉系細胞培養の担体として細胞の増殖と硬組織形成細胞への分化促進を図り、そのために、細胞の分化に効果的な促進因子を検索した結果、ヒアルロン酸、ラミニンをはじめ、ロイシンに有効な促進作用がある可能性が認められたが、デキストランにも未分化間葉系細胞の分化に効果のあることが認められた。さらに、ポリビニルホルマールスポンジをはじめとして、スポンジ状担体は線維構造のためにセラミックス担体とは異なって骨髄幹細胞を受け止め得ず、骨髄幹細胞の付着が不可能であることが明らかになった。しかし、スポンジにデキストランをコーティングすることによって骨髄幹細胞が付着できる幅のある構造を呈し、その結果として *in vitro* および *in vivo* での骨髄幹細胞によるスポンジ内骨形成が誘導されることが確認できた。

研究成果の概要（英文）：The use of porous ceramics is desirable as a scaffold for osteogenesis by undifferentiated mesenchymal stem cells. In the scaffold, an active proliferation and differentiation to hard tissue formation cells was expected for the cells. Therefore an effective factor to differentiate the cells was examined. As a result, it was recognized in hyaluronic acid, laminin and leucine to promote the cell proliferation and differentiation effectively. And it was recognized that the dextran was effective for the differentiation of the undifferentiated mesenchymal cells. The ceramics scaffold received the bone marrow stem cells in the pores. However, it was found that the attachment of the bone marrow stem cells in the sponge with fibrous structure was impossible because of the fibrous structure. Coating of the dextran to the sponge gave width to the fiber, and attachment of bone marrow stem cells would be possible. Osteogenesis in the sponge by bone marrow stem cells was induced *in vitro* and *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：歯内療法学

1. 研究開始当初の背景

臨床応用への途が開けていない理由として、中胚葉組織であるセメント質と象牙質、そして、外胚葉組織であるエナメル質から歯は構成されており、その構造が複雑なことから歯の大きさの制御が困難であることが挙げられる。近年、歯の再生に向けて、*in vitro*で歯胚から歯に成長させる研究が行われるようになり、とくに生後4日のラットの鐘状期臼歯歯胚から単離した上皮細胞と間葉細胞を混合してヌードラットに移植して歯を再生させた報告は注目されるが、上皮細胞と間葉細胞を個々に培養した後に組み合わせて歯を再生した報告はない。また、骨と同様のオステオカルシンが象牙芽細胞でも発現すること、そして、骨と象牙質とに遺伝子学的な類似性のあることが明らかにされており、*in vivo*での骨髄幹細胞から象牙芽細胞への分化の可能性が示唆されているが、その手段は確立されていない。さらに、歯髄細胞が象牙芽細胞に分化して象牙質様硬組織が形成されたことが報告されるなど、歯髄細胞による歯の硬組織の再生を試みた文献が多く見られ、また、歯胚から歯を再生する多くの研究も行われているが、いずれも臨床で実用できるレベルには達していない。

2. 研究の目的

歯髄・象牙質複合体を再生するために硬組織形成の促進とその複合体の高度の向上を目指した。一般に担体として活用されているハイドロキシアパタイト担体とともに、スポンジ状で形状を自由に改変できる担体としてアルギン酸、ゼラチン、ポリビニルアルコール、あるいは、セルロースを素材とするスポンジ状担体を作製し、また、幹細胞による骨形成を促進する新たな培養補助添加因子を発見して、担体の気孔中に*in vitro*および*in vivo*で緻密な骨形成を誘導して歯髄・象牙質複合体の再生を図ることが目的である。

3. 研究の方法

多孔質担体にラット大腿骨から採取した骨髄細胞を播種し、*in vitro*での気孔内石灰沈着、そして、*in vivo*での気孔内骨形成から各担体の気孔表面の細胞接着性の優劣を比較、検討する。各担体について、組織切片の観察、オステオカルシンの免疫化学的定量、そして、素材がポリビニルアルコールの担体では生化学的にカルシウム定量を行って骨形成を評価する。さらに、ヒアルロン酸、ラミニン、ロイシンあるいはリシンを骨髄細胞に作用させて硬組織または骨の形成への効果を組織学的、生化学的、あるいは、免疫化学的に検討する。

4. 研究成果

直径8mm、高さ10mm、内径4mmあるいは2mmの中空部を有する円筒状の多孔質ハイドロキシアパタイトで気孔内への骨形成を検討した結果、4mmの中空部は栄養を気孔内に供給して気孔での骨形成に積極的に関与することが確認された。

アルギン酸、ゼラチン、ポリビニルアルコール、あるいは、セルロースを素材とするスポンジを担体として*in vitro*および*in vivo*で骨髄幹細胞による骨形成促進の可能性を検討した結果、*in vitro*でアルギン酸、あるいは、セルローススポンジでは多量の石灰化物の形成を認めた。また、*in vivo*の実験でアルギン酸、あるいは、セルロースを素材とするスポンジには組織学的に多数の気孔内骨形成が観察され、オステオカルシン量を免疫化学的に測定した結果からも骨形成が確認された。

4mmの中空部を有する多孔質ハイドロキシアパタイト、アルギン酸、あるいは、セルローススポンジ骨形成を効果的に促進する機能を持つ担体素材であることが確認できた。骨あるいは硬組織の速やかな形成が求められる臨床への応用に近づく足掛かりになるものである。

また、骨髄幹細胞の分化と骨形成促進のための培養補助化学物質として、ヒアルロン酸、ラミニン、デキストランそしてリシンについて、*in vitro*および*in vivo*で骨髄幹細胞による骨形成促進を検討した。その結果、ヒアルロン酸、ラミニンおよびデキストランはデキサメタゾンとの併用によって有意に培養器に多くの量の石灰化物が形成された。

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8件)

(1) Yoshikawa M, Tsuji N, Kakigi H, Yabuuchi T, Shimomura Y, Hayashi H, Ohgushi H, *Journal of Biomedical Science and Engineering* 査読有、3, 751-757, 2010.

(2) Tsuji N, Yoshikawa M, Hayashi H, Ohgushi H, "Diameter of a hollow center in cylindrical hydroxyapatite scaffold for hard tissue formation" *Bioceramics Development and Applications* 査読有、1, 59-61, 2010.

(3) Yoshikawa M, Yabuuchi T, Tsuji N, Hayashi H, Ohgushi H, "Bone regeneration in porous hydroxyapatite scaffolds with Leucine coating" *Bioceramics* 査読無、22,

769-772, 2009.

(4) Tsuji N, Yoshikawa M, Hayashi H, Ohgushi H, "Diameter of a hollow center in cylindrical hydroxyapatite scaffold for hard tissue formation" *Bioceramics* 査読無、22, 229-232, 2009.

(5) 下村容規, 好川正孝, 林 宏行, "スポンジ状担体へのDextranコートが骨髄幹細胞の硬組織形成に及ぼす影響" 日本再生歯科医学会雑誌, 査読有、6, 99-113, 2009.

(6) Yoshikawa M, Tsuji N, Hayashi H, Ohgushi H, "In vivo osteogenesis in porous hydroxyapatite scaffold processed in hyaluronic acid solution" *Key Engineering Materials*, 査読有 361-363, 1185-1188, 2008.

(7) Tsuji N, Yoshikawa M, Shimomura Y, Yabuuchi T, Hayashi H, Ohgushi H, "Osteogenic Influence of Lysine in Porous Hydroxyapatite Scaffold" *Key Engineering Materials*, 査読有 361-363, 1189-1192, 2008.

(8) Yoshikawa M, Tsuji N, Shimomura Y, Hayashi H, Ohgushi H, "Osteogenesis depending on geometry of porous hydroxyapatite scaffolds" *Calcified Tissue International* 査読有、83, 139-145, 2008.

[学会発表] (計 16 件)

(1) Kakigi H, Yoshikawa M, Tsuji N, Hayashi H, Ohgushi H, "Nutrition supply for hard tissue formation in hydroxyapatite scaffold *in vivo*" *The 6th Asian Science Seminar in Taiwan*, 2010 年 11 月 20 日、Taichung Taiwan.

(2) Yoshikawa M, Kakigi H, Tsuji N, Hayashi H, Ohgushi H, "Alginate acid gel for bone marrow cell seeding to form bone in porous hydroxyapatite scaffolds" *International Bone-Tissue-Engineering Congress: Bone-Tec 2010*, 2010 年 10 月 9 日、Hannover Germany.

(3) Yoshikawa M, Tsuji N, Kakigi H, Hayashi H, Ohgushi H, "Effect of leucine coating for bone formation in porous hydroxyapatite Scaffold" *Tissue engineering & regenerative medicine international*

society 2010: Asia pacific meeting, 2010 年 9 月 15 日、Sydney Australia.

(4) Yoshikawa M, Tsuji N, Kakigi H, Hayashi H, "Effect of laminin for osteogenesis by bone marrow stem cells in subcutaneously implanted porous hydroxyapatite scaffold *in vivo*" *3rd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation*, 2010 年 7 月 11 日、Dresden Germany.

(5) Tsuji N, Yoshikawa M, Hayashi H, Ohgushi H, "Hard tissue formation by rat bone marrow stem cells in porous hydroxyapatite scaffolds with a hollow center different in the diameter" *3rd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation*, 2010 年 7 月 11 日、Dresden Germany.

(6) 辻 則正, 好川正孝, 下村容規, 柿木栄幸, 藪内崇督, 林 宏行, "硬組織形成量に対する円筒状ハイドロキシアパタイト担体の内径の影響" 日本歯科保存学会 2009 年度秋季学術大会. 2009 年 10 月 29 日、仙台.

(7) Tsuji N, Yoshikawa M, Hayashi H, Ohgushi H, "Diameter of a hollow center in cylindrical hydroxyapatite scaffold for hard tissue formation" *22nd International Symposium on Ceramics in Medicine*, 2009 年 10 月 27 日、Daegu South Korea.

(8) Yoshikawa M, Yabuuchi T, Tsuji N, Hayashi H, Ohgushi H, "Bone regeneration in porous hydroxyapatite scaffolds with leucine coating" *22nd International Symposium on Ceramics in Medicine*, 2009 年 10 月 27 日、Daegu South Korea.

(9) Yoshikawa M, Shimomura Y, Tsuji N, Kakigi H, Hayashi H, Ohgushi H, "Osteogenesis by bone marrow cells in polyvinyl formal sponge with dextran coating *in vitro*" *International Bone-Tissue-Engineering Congress: Bone-Tec 2009*, 2009 年 10 月 9 日、Hannover Germany.

(10) Yoshikawa M, Tsuji N, Yabuuchi T, Shimomura Y, Kakigi H, Hayashi H, Ohgushi H, "Osteogenesis by dextran coating on and among fibers of a polyvinyl formal sponge" *World Congress on Science, Engineering and Technology*, 2009 年 6 月 25 日、Paris France.

(11) Yoshikawa M, Shimomura Y, Tsuji N, Hayashi H, Ohgushi H, " Hard tissue formation by bone marrow stem cells in sponge scaffold with dextran coating" *The 13th International Conference on Biomedical Engineering*, 2008年12月4日、Singapore.

(12) 下村容規, 好川正孝, 辻 則正, 藪内崇督, 林 宏行, " デキストランコーティングスポンジ状担体における骨髄幹細胞による硬組織形成" 日本歯科保存学会2008年度秋季学術大会. 2008年11月6日、富山.

(13) 下村容規, 好川正孝, 林 宏行, " スポンジ状担体へのDextranコートが骨髄幹細胞の硬組織形成に及ぼす影響" 日本再生歯科医学会、2008年9月13日、東京.

(14) Shimomura Y, Yoshikawa M, Tsuji N, Yabuuchi T, Hayashi H, Ohgushi H, " Effects of two amino acids in porous hydroxyapatite scaffolds" *The 86th General Session & Exhibition of the International Association of Dental Research*. 2008年7月4日、Toronto Canada

(15) Yoshikawa M, Shimomura Y, Tsuji N, Ohgushi H, Hayashi H. " Effect of a hollow center in porous hydroxyapatite scaffold for bone formation with bone marrow cells" *2nd International Congress on Ceramics*. 2008年7月1日、Verona, Italy.

(16) 下村容規, 好川正孝, 辻 則正, 藪内崇督, 林 宏行. " 骨髄細胞の増殖と石灰化物形成促進におよぼすデキストランの影響" 日本歯科保存学会 2008 年春季学術大会、2008 年 6 月 5 日、新潟.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

好川 正孝 (YOSHIKAWA MASATAKA)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号 : 70148451