

平成 22 年 6 月 13 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791558

研究課題名（和文）GMP 基準口腔組織再生療法の確立

研究課題名（英文）The establishment of the GMP standard oral tissue regeneration system

研究代表者

寺本 祐二 (TERAMOTO YUJI)

松本歯科大学・歯学部・助手

研究者番号：80460442

研究成果の概要（和文）：目的：ヒト骨髄液(hMSC)からの間葉系幹細胞(MSC)を利用した移植での骨再生療法が可能になってきている。しかし hMSC を使用する細胞培養は、Cell Processing center(CPC)で行う必要がある。本研究の目的は CPC を利用し顎骨再生療法のための細胞培養スケジュールと標準業務手順書を作成し、移植方法を確立することである。

結論：GMP (Good Manufacturing Practice) に準拠して調製された骨髄間葉系幹細胞を口腔顎顔面領域に応用するとともに、外部施設と CPC が協力して骨再生療法を地域医療に適用することが可能であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Objectives: Transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) from human bone marrow (hMSC) is a possible approach for bone tissue engineering. According to Japanese law, cell culture using autologous hMSC should be performed at a Cell Processing Center (CPC). The aim of present study was to establish a method for utilization of a CPC, including a practical work schedule and standard operating procedure.

Conclusion: Autologous hMSC culture at a CPC in collaboration with a blood collection facility is useful for tissue engineering. This system is safe and could be applied to regeneration medicine for the head and neck region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：再生医療， 骨髄幹細胞， 歯周組織， インプラント

### 1. 研究開始当初の背景

歯科領域では、歯槽骨再生を目的に、自家骨移植が行なわれているが、(1)口腔からの自家骨採取によって感染や骨吸収を生じる、(2)自家骨は、骨の欠損量以上に移植組織骨が必要である、(3)移植部位より採取部位の合併症がみられ、外科的侵襲が大きいなどの欠点があり、低侵襲的で造骨能が高い再生医療技術の確立が望まれる。

### 2. 研究の目的

ヒト組織体性幹細胞の培養には、品質の優れた医薬品を製造するための要件である Good Manufacturing Practice (GMP)基準を柱とした「ヒト幹細胞の臨床研究に関する指針(厚生労働省)」に準拠し、cell processing center (CPC)における品質管理が必要と考えられる。そこで本研究ではCPCを利用したGMP基準の品質管理を保障した骨再生医療を口腔領域に適用することを目的とする。

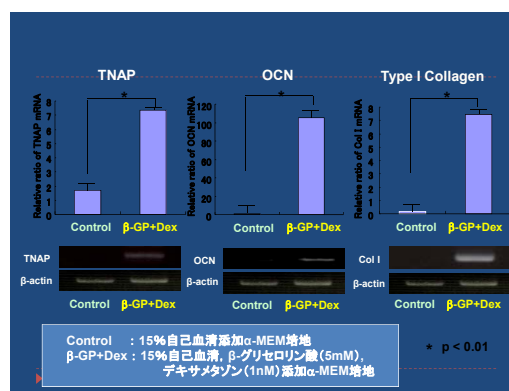
### 3. 研究の方法

当院倫理委員会で臨床研究の承認を受け、採取施設においてボランティアの腸骨から骨髄液を採取し、同日CPCに搬送して、3週間の細胞培養を行った(図1)。付着したMSCの表面抗原をフローサイトメトリーで解析するとともに、細胞形質、骨関連遺伝子の発現、遺伝子産物の発現、基質の石灰化についてRT-PCRおよびReal-time PCR, Western blot法、アリザリンレッド染色で検討した。また、トリリン酸カルシウム、チタンインプラント体、吸収性メンブレンによる生細胞への影響について検討した。

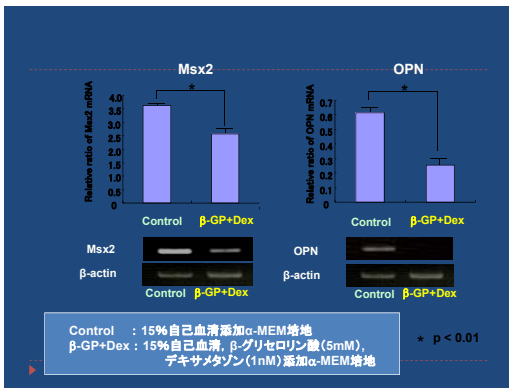
### 4. 研究成果

ヒト骨髄液中には、CD271陽性のMSCが0.2%、

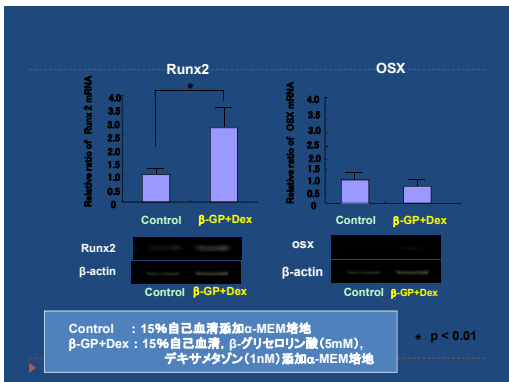
CD44/CD105陽性のMSCは約2%存在した。3週間の初代培養によってMSCは約 $2 \times 10^7$ 個に増加した。施設間の搬送による細胞増殖と細胞形質への影響はみられず、トリリン酸カルシウムの添加培養で生細胞数に変化はみられなかった。デキサメタゾンと $\beta$ -グリセロリン酸を添加して培養すると骨芽細胞様細胞の形質を獲得した。骨芽細胞分化培地で培養したMSCでは、TNAP、OCN、COLL-Iの発現がみられ(図1)、Msx2とOPNの発現が減少し(図2)、Runx2は分化培養2週で約3倍の発現量がみられたが、OSXは分化培養2週では著明な発現を認めなかった(図3)。Western blot法をおこなったところ、TNAP、OCN、COLL-Iの発現の亢進が見られた(図4)。アリザリンレッド陽性の石灰化結節が観察された(図5)。臨床で細胞移植とともに用いる吸収性メンブレン、トリリン酸カルシウム、チタンインプラント体を培地に浸漬して細胞増殖曲線を作成したところ、培養5日まで生細胞数に優位な差はなく、細胞毒性はみられなかった(図6)。



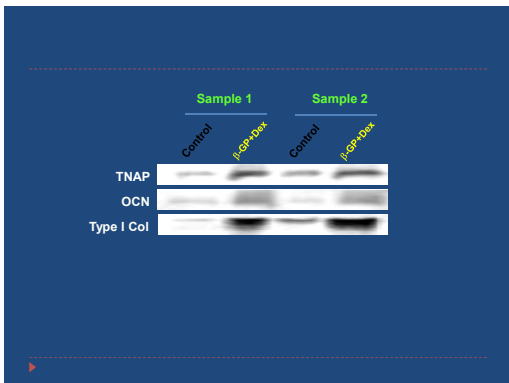
(図1) RT-PCR および Real-time PCR



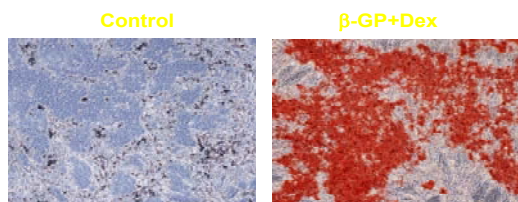
(図 2) RT-PCR および Real-time PCR



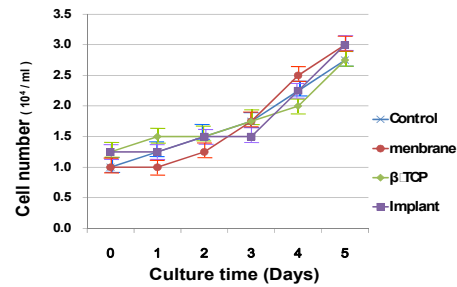
(図 3) RT-PCR および Real-time PCR



(図 4) Western blot 法



(図 5) アリザリンレッド染色



(図 6) 細胞増殖曲線

細胞培養を伴う再生医療では、改正薬事法により、(1)人為的間違いを最小限にする、(2)医薬品(細胞)の汚染や品質低下を防ぐ、(3)高い品質を保つなどGMP(Good Manufacturing Practice)基準下の管理が必須である。今回我々は施設間で骨髄液とMSCを採取・搬送・培養し、約 $2 \times 10^7$ 個を超えるMSCが3週間の培養で得ることができた。また、骨芽細胞に分化可能なMSCを得ることができた。CPCと幹細胞採取施設が連携して、培養自己骨髄間葉系細胞を用いた骨再生療法を口腔顎顔面外科領域に応用し、地域医療に適用できること、さらにGMP基準下の骨造成治療が可能であると考えられた。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計8件)

- ① 第9回日本再生医療学会総会 広島  
2010年3月19日  
Cell Processing Centerを利用した骨再生療法の確立  
寺本祐二, 上松隆司, 堂東亮輔, 高橋美穂, 丹羽崇, 高田匡基, 丸川和也, 下平滋隆, 脇谷滋之, 中村美どり, 八上公利, 宇田川信之, 古澤清文
- ② 第13回日本顎顔面インプラント学会 佐賀  
2009年12月12日  
培養骨髄間葉系細胞を骨再生療法に適用するための基礎的研究  
寺本祐二, 上松隆司, 堂東亮輔, 高橋美穂, 高田匡基, 丹羽崇, 丸川和也, 古澤清文
- ③ 第46回日本口腔組織培養学会学術大会 東京  
2009年12月5日  
培養自己骨髄間葉系細胞を用いた骨再生療法の基礎的研究

寺本祐二，上松隆司，堂東亮輔，高橋美穂，高田匡基，丹羽崇，丸川和也，古澤清文

④ 第10回信州口腔外科談話会 松本

2009年11月14日

培養自己骨髄間葉系細胞を用いた骨再生療法の確立

寺本祐二，上松隆司，堂東亮輔，高橋美穂，高田匡基，丹羽崇，丸川和也，古澤清文

⑤ 第63回日本口腔科学会学術集会 浜松

2009年4月17日

培養自己骨髄間葉系細胞を用いた骨再生療法の確立

寺本祐二，上松隆司，堂東亮輔，内橋隆行，高橋美穂，古澤清文

⑥ 第8回日本再生医療学会総会 東京

2009年3月5日

Cell Processing Center を利用した骨再生医療の確立

寺本祐二，上松隆司，堂東亮輔，内橋隆行，高橋美穂，下平滋隆，脇谷滋之，中村みどり，宇田川信之，古澤清文

⑦ 第12回日本顎顔面インプラント学会 東京

2008年12月6日

培養自己骨髄間葉系細胞を骨再生療法に適用するための基礎的研究

寺本祐二，上松隆司，堂東亮輔，高橋美穂，内橋隆行，高田匡基，丹羽崇，古澤清文

⑧ 第53回日本口腔外科学会総会 徳島

2008年10月20日

Cell Processing Center を利用した培養自己骨髄間葉系細胞移植による骨再生療法の確立

寺本祐二，上松隆司，堂東亮輔，内橋隆行，高橋美穂，下平滋隆，宇田川信之，古澤清文

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺本 祐二 (TERAMOTO YUJI)

松本歯科大学・歯学部・助手

研究者番号：80460442

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：