

平成 23 年 5 月 18 日現在

所属機関：33602
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：21792038
 研究課題名（和文） 自己骨髄間葉系幹細胞を用いた顎骨再生療法の確立
 研究課題名（英文） Establishment of jaw bone regeneration technique using mesenchymal stem cells.
 研究代表者
 丹羽 崇 (NIWA TAKASHI)
 松本歯科大学・歯学部・助手
 研究者番号：60507680

研究成果の概要（和文）：GMP 基準化で培養した骨髄間葉系幹細胞を歯槽骨再生療法に応用し、骨欠損に対する再生医療の標準システムを確立することを目的とする。骨髄液は後上腸骨棘部より採取し、培養 3 週間で 1×10^7 個の MSC を得ることができた。MSC は施設間の搬送により細胞増殖と細胞形質への影響はみられず、マイコプラズマや細菌汚染は認められなかった。このシステムは安全であり、頭頸部領域における再生医療に有効であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Establishment of jaw bone regeneration technique using mesenchymal stem cells in accordance with the culture of the good manufacturing practices(GMP). Bone marrow samples were aspirated from the posterior iliac crest and Human MSC grew to approximately 1×10^7 cells within 3 weeks. Mycoplasmal and bacterial infection was not observed during overall autologous MSC cultivation or transportation between facilities. 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
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：口腔外科学一般

1. 研究開始当初の背景

クローン羊の誕生（1997 年）や胚性幹細胞（ES 細胞）の樹立により、再生医学は 21 世紀の医療として注目されている。ES 細胞による再生医療は、自己複製能が高いものの、1) 催奇形性の危険

性がある、2) 非自己の胚性幹細胞を移植する、3) 幹細胞の増殖を制御する技術が確立されていないなど、生命倫理や再現性に問題があり、臨床応用には多くの問題を解決しなければならない。近年ヒトの皮膚細胞から ES 細胞と遜色のな

い能力を持った人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) の開発に成功し、再生医学 (細胞移植療法) におけるドナー細胞の資源として期待を集めている。しかし、iPS 細胞では 4 因子 (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) の強制発現が必要であることなど、幹細胞の腫瘍化を否定することはできない。したがって、iPS 細胞の安全性を高め、ES 細胞と同じ能力を持った幹細胞を樹立がすることが求められており、臨床応用までには更なる研究が必要とされている。一方、骨髄移植などの組織体性幹細胞を利用した自家移植医療は、ここ 20 年近くの実績と安全性が確立されている。歯科領域においてもその安全性から歯槽骨再生に応用されている。しかし、自家骨移植は、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) 移植部位の他、採取部位での合併症がみられ、外科的侵襲が大きいなどの欠点があり、低侵襲性で造骨能が高い再生医療技術の確立が望まれている再生医療には、細胞、足場、シグナル因子の 3 要素が必要で、幹細胞数が不十分であるのに限界があった。すなわち、骨再生を促進させるためには、細胞数を増加させることが必要である。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。

2. 研究の目的

Howard Green(1970 年)による培養表皮や軟骨から端を発し、再生医療の試みは現在多くの分野で行われている。しかし、口腔領域の基礎的研究を臨床に応用するトランスレーショナルリサーチは少なく CPC が設置されている限られた施設のみで行われているのが実情である。細胞移植による再生医療を実践するためには GMP 基準に準じる必要がある、「汚染防止」、「人為的ミス防止」、「品質保証」の三原則を遵守した施設・設備の導入が必要となる。

本研究は、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応し、再生医療を地域医療の標準治療にすることを目的とする。

3. 研究の方法

幹細胞を臨床に用いる規定 (厚生労働省) に準じて行う。松本歯科大学倫理委員会および信州大学医学部倫理委員会の規定に準じ、

患者に対してインフォームドコンセントを行い承諾を得た患者を対象とした臨床応用を行う。

骨髄液は後上腸骨棘部より採取し、信州大学医学部附属病院 CPC に搬送し、初代培養を実施する。

細胞の品質管理は①生細胞数および細胞生存率をトリパンブルー染色で算定し、培養生存率が 90%以上であることを確認する。②細胞増殖速度 (細胞回収率) による培養条件が適正か検討する。③細胞表面抗原の解析をフローサイトメトリー (FCM) で検討する。特に、骨髄由来間葉系幹細胞の同定には、CD14, 34, 45, 31 陰性、CD29, 44, 73, 90, 105, 166 陽性であることを FCM で検討する。アルカリフォスファターゼ活性を p-nitrophenyl phosphate を基質として比色定量を行なう。④細菌・真菌検査を自動無菌試験装置 (日本ビオメリュー社) を用いて行なう。⑤エンドトキシン試験を日本薬局方に準じて行う。⑥マイコプラズマ否定試験は Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いて行なう。

症例は評価が客観的に可能な、①歯槽骨再生療法、②サイナスリフト、③ソケットリフト、④外傷性骨欠損を対象とする。適応症は①閉鎖腔が形成されること、②感染源がみられないこと、③残存骨が少ないが、骨造成が設計できる解剖学的条件を満たしていること、④良好なプラークコントロールであること、⑤文書による同意が得られること、⑥通院の意思と能力を有することなどを基準とした。

治療計画として、問診、口腔内検査、補綴学的検査、エックス線検査、臨床検査を行った後、診断、適用判定、インフォームド・コンセント、治療計画の確認、治療、経過観察の順に行う。有効性の判定は CT エックス線写真、MRI IDEAL による水画像評価にて行う。

4. 研究成果

骨髄液の採取および搬送条件に準拠し、高度顎堤吸収異常の 3 名の患者より骨髄液の採取し臨床応用を行った。採取施設にて後上腸骨棘部から骨髄液を採取し信州大学医学部附属病院 CPC へ搬送を行った。搬送には専用搬送容器を使用し、20~25℃で CPC へ搬送を行った。CPC では同日、患者より採取した末梢血より血清を調製し初代培養を開始するとともに PRP の調製を行った。PRP は 1600 ± 10rpm, 22 ± 2℃室温 10 分の遠心条件にて分離した。その後、1 回の継代と 3 回の培地交換を行い、培養 3 週後に細胞を回収した後、採取施設に搬送し患者に対して上顎洞底挙上術、自己培養細胞移植術を施行した。3 週間の細胞培養を行い MSC は約 1×10^7 個に増加

した。採取した骨髓液と回収時の骨髓間葉系幹細胞の含有量をフローサイトメトリーで解析を行った。マーカーには骨髓間葉系幹細胞のマーカーである CD271, CD105, CD44 を用いた。その結果、骨髓液中には約 0.2% の CD271 陽性細胞が存在し、この中で CD105・CD44double-positive 細胞は約 2% であった。一方、細胞回収時には CD271 陽性細胞は約 4% に増加し、この中 CD105・CD44double-positive 細胞は 100% となった。ヒト骨髓液中には、CD271 陽性の MSC が 0.2%, CD44/CD105 陽性の MSC は約 2% 存在した。(図 1) 上顎洞底挙上術に自己培養細胞移植術を用いた場合では、MRI IDEAL による水画像評価では、骨形成の促進が観察され、術後にみられる上顎洞底部骨容積の減少率は細胞移植側で低い傾向がみられた。(図 2) MSC は施設間の搬送により、細胞増殖と細胞形質への影響はみられず、マイコプラズマや細菌汚染は認められなかった。これらの結果は、CPC と細胞採取施設が連携し MSC を用いた骨再生療法を適用し、さらに GMP 基準下の骨造成治療の有用性が示唆された。

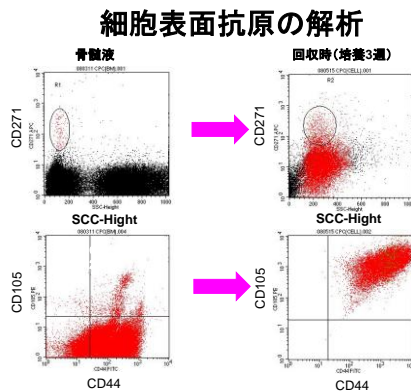


図 1

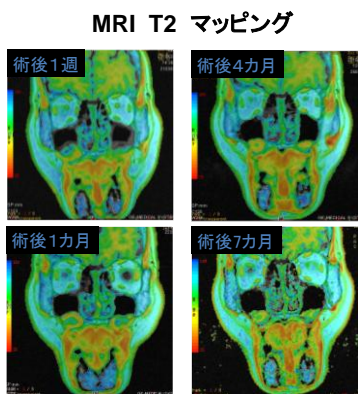


図 2

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 6 件)

① 日本口腔インプラント学会関東・甲信越地方会 神奈川
2011年2月13日
培養骨髓間葉系細胞移植による骨再生療法の確立
丹羽崇, 中澤高志, 寺本祐二, 高橋美穂, 上松隆司

② 日本口腔インプラント学会中部地方会 岐阜
2010年11月13日
多血小板血漿を併用した培養骨髓間葉系細胞移植による骨再生療法の確立
丹羽崇, 中澤高志, 寺本祐二, 高橋美穂, 上松隆司

③ The IADR 84th General Session & Exhibition
Barcelona
2010年7月15日
Cell processing system for bone regeneration
Y. Teramoto, T. Uematsu, T. Niwa, M. Takahashi, R. Doto, S. Shimodaira, T. Uemura, M. sato, H. Tahara, S. Wakitani, N. Udagawa and K. Furusawa

④ 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

⑤ 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
培養自己骨髓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

⑥ 第13回日本顎顔面インプラント学会 佐賀
2009年12月12日
培養骨髓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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 崇 (NIWA TAKASHI)
松本歯科大学・歯学部・助手
研究者番号：60507680

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：