

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592820

研究課題名(和文)アルギン酸ハイブリッド担体と口腔粘膜および血液由来幹細胞による歯髄・象牙質再生

研究課題名(英文)Regeneration of pulp-dentine complex using stem cells derived from oral mucosa or peripheral blood cell in alginate hybrid scaffold

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：採取直後のラット口腔粘膜由来細胞に成長因子を添加した培養で粘膜由来細胞の増殖率は小さかったが、noduleの形成は確認された。

骨髄細胞を懸濁したアルギン酸ゲルを気孔に満たした多孔質ハイドロキシアパタイト(HA)をラットの皮下に埋入したin vivoの検索で、ゲル内に多量の骨形成は得られなかった。架橋によるアルギン酸スポンジにラット骨髄細胞を播種し、これを多孔質HA中空に挿入して皮下埋入した結果、スポンジ内にオステオカルシン量が増加した。さらに、ロイシン、あるいは、リシンでコートしたホルマリン処理ポリビニルアルコールスポンジとHAとのハイブリッド担体で骨髄細胞による骨形成量が有意に増加した。

研究成果の概要(英文)：Oral mucosa-derived cells showed low rate of proliferation in the culture containing growth factors in the medium. However, nodule was formed.

In vivo study, bone marrow cells were suspended in alginate gel. The gel was filled in pores of HA scaffolds. The scaffolds were implanted in the subcutis of syngeneic rats. However, osteogenesis in the gel was not promoted. Therefore rat bone marrow cells were seeded in alginate sponge obtained by heat crosslinking. The sponge with the cells was inserted in the hollow center of cylindrical porous HA scaffold and implanted in rat subcutis for assessment of osteogenesis. As the result, quantity of osteocalcin significantly increased. Moreover, osteogenesis significantly increased quantitatively.

In hybrid scaffold composed of HA and formalin treated polyvinyl alcohol sponge coated with laminin, leucine, tryptophan or lysine, the in vivo examination revealed the significant quantitative increase of bone formation by bone marrow cells.

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：口腔粘膜由来細胞 nodule形成 アルギン酸 担体 骨形成 オステオカルシン ハイドロキシアパタイト

## 1. 研究開始当初の背景

整形外科領域での骨の再生のために幹細胞が穿刺によって腸骨から採取されているのに対して、歯髄・象牙質複合体再生のために生体に対して大きな侵襲を加える腸骨からの骨髄幹細胞の採取が受け入れられるとは考えにくく、歯髄・象牙質複合体再生のための幹細胞の採取源を得る必要性は大であり、歯髄から幹細胞を得る試みが主として行われている状況であった。また、整形外科の臨床では多孔質担体に自己の骨髄幹細胞から誘導した骨を形成して患部に置換、補填する手法が確立されている一方、歯科領域においては歯の再生を臨床に応用するには至っていないのは現在も同様である。

骨形成性タンパク質による修復象牙質の形成、また、Transforming growth factor- $\beta$ が歯髄・象牙質構造の修復に関与し、さらに、歯の外形と大きさを調節している可能性を示唆する基礎的な研究結果が報告され、歯の再生に向けて意欲的に基礎的な研究が行われていた。すなわち、*in vitro*で歯胚から歯に成長させる研究が相次ぎ、とくに、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た。しかしながら、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見られず、歯の再生能力を有する歯胚上皮細胞の培養も容易ではなかった。

歯の再生の臨床での応用としては、抜去歯を将来に移植するためのTooth bankが設立されているにすぎなかった。

以上が研究開始当初の背景である。

## 2. 研究の目的

象牙質の再生には一般に象牙芽細胞に分化する幹細胞が必要であるが、象牙芽細胞に分化する幹細胞は言うまでもなく、骨芽細胞を得るための幹細胞を得る手段さえ、歯科領域では非常に少ない。また、極めて多数の幹細胞が骨を再生するために必要である。

幹細胞の採取源を末梢血中あるいは口腔粘膜に求めて、歯科領域でも容易に幹細胞を分離し、*in vitro*で速やかに骨芽細胞あるいは象牙芽細胞の増殖を実現させて効果的な骨あるいは象牙質の再生を誘導し、最終的には歯の再生を目的とした。

さらに、3次元構造をもつ歯の再生のためには、担体が必要である。効果的に骨あるいは象牙質を *in vivo* で形成させるために、アルギン酸とハイドロキシアパタイトとを組み合わせたハイブリッド担体を新規に開発し、また、調整したアルギン酸スポンジまたは市販のスポンジとハイドロキシアパタイトを組み合わせたハイブリッド担体を作製して、新規の担体の開発が本研究の目的であった。

末梢血あるいは口腔粘膜に由来する幹細胞

の増殖法を確立し、これらの細胞をアルギン酸/ハイドロキシアパタイト・ハイブリッド担体内で骨芽細胞や象牙芽細胞に分化させ、緻密な骨あるいは象牙質の形成を誘導し、歯髄・象牙質複合体の再生を実現させることが本研究の目的であった。

## 3. 研究の方法

### (1)ハイブリッド担体の作製

多孔質ハイドロキシアパタイトの気孔中にアルギン酸ゲルを浸潤させてのハイブリッド担体、アルギン酸スポンジあるいはポリビニルホルマールスポンジと円筒状ハイドロキシアパタイトとのハイブリッド担体を作製し、歯髄・象牙質複合体の核とする。アルギン酸スポンジはアルギン酸ゲルの真空凍結乾燥によってスポンジ状とし、これを円筒形多孔質ハイドロキシアパタイトの中空部に挿入してハイブリッド担体とする。また、市販のシート状ポリビニルホルマールスポンジを円筒形に切り抜いて同様に多孔質ハイドロキシアパタイト中空部に挿入してハイブリッド担体とする。

### (2)ハイブリッド担体気孔内骨形成効果

Fischer 344 ラット後肢骨髄から得る骨髄細胞をこれらのハイブリッド担体のスポンジ部に播種して同系ラット背部皮下に埋入する。そして、気孔内に形成される骨の量を組織学的に顕微鏡下で観察し、またオステオカルシン量を免疫化学的に定量してハイブリッド担体を用いる効果を確認する。

### (3)幹細胞の採取

象牙質形成を試み、また、骨形成のためにFischer 344 ラットの骨髄細胞を *in vivo* および *in vitro* の試験に使用する。

歯科領域で幹細胞を容易に得る細胞採取源を確立するために、ラット尾静脈から採取した末梢血中、あるいは、口腔粘膜から附着細胞を分離、培養して幹細胞の採取を試みる。幹細胞を得て、その増殖と分化を促進させるために多糖類、必須アミノ酸あるいは細胞増殖因子を添加、培養する。

### (4) *In vitro*での硬組織形成

末梢血、口腔粘膜、あるいは、骨髄から得た細胞を *in vitro* で培養して幹細胞に分化・増殖させる。デキサメタゾンの他にアミノ酸やサイトカインを添加して培養し、効果的な促進因子を求めるためのスクリーニングを行う。評価は *in vitro*での nodule 形成と培養後の培養液中カルシウム定量で行った。

### (5) *In vivo*でのハイブリッド担体内骨形成

末梢血、口腔粘膜、あるいは、骨髄から得た細胞を培養して、その細胞を含むアルギン酸ゲルを気孔内に入れたハイドロキシアパタイト、また、スポンジと多孔質ハイドロキシアパタイトとのハイブリッド担体のスポンジ内あるいはハイドロキシアパタイトに

細胞を播種する。また、スポンジ内には末梢血細胞を播種し、ハイドロキシアパタイトには骨髄細胞を播種する。これらの担体を同系ラット背部皮下に埋入して、*in vivo*での骨形成を検討し、さらに、円筒状担体の中空内に血管あるいは神経組織の再生を図って歯髄・象牙質複合体を完成させる。骨形成は組織学的に顕微鏡下で、また、担体内のオステオカルシンを免疫化学的に定量して評価する。

#### 4. 研究成果

ハイブリッド担体の作製では、いくつかのアルギン酸スポンジの作製法のいずれも均一かつ連通した気孔の調整が困難であったが、最終的にアルギン酸ゲルの熱架橋後に真空凍結乾燥を行う手法を試み、作製した。

アルギン酸スポンジ内にオステオカルシンが測定されたが、ポリビニルホルマールスポンジを用いたハイブリッド担体での気孔内で顕著な骨形成を示すオステオカルシン検出された。アルギン酸ゲルとハイドロキシアパタイトとのハイブリッド担体では骨形成はほとんど認められなかった。過去の研究成果と組織学的所見とを合わせ考えて、3種類のハイブリッド担体において生じたオステオカルシン量の差は、担体内細胞への十分な栄養供給の有無によって生じたものと確信される。さらに、ロイシン、あるいは、リシンでコートしたホルマリン処理ポリビニルアルコールスポンジとハイドロキシアパタイトとのハイブリッド担体で骨髄細胞による骨形成量が有意に増加した。

採取直後のラット口腔粘膜由来細胞に成長因子を添加した培養で、粘膜由来細胞による nodule の形成が確認された。しかしながら、細胞増殖に長時間を必要とし、スクリーニングを行った添加物の中でデキサメタゾンの他に顕著な効果を示す化学物質は得られず、培養液中に検出されたカルシウム量は骨髄細胞に比較して 0.27%程度であった。また、*in vivo*ではホルマリン処理ポリビニルアルコールスポンジとハイドロキシアパタイトとのハイブリッド担体のロイシン、あるいは、リシンによるコーティングが骨髄細胞による骨形成量の有意な増加を示したが、*in vitro*ではそれらの化学物質による顕著な nodule 形成の増加は認められなかった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yabuuchi T, Yoshikawa M, Kakigi H, Hayashi H, Hybrid scaffolds composed of amino-acid coated sponge and hydroxyapatite for hard tissue formation by bone marrow cells, Journal of Biomedical Science and Engineering, 査読有、Vol.7, No.6, 2014, pp. 316-329.

<http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2014.76034>

Yoshikawa M, Kakigi H, Yabuuchi T, Hayashi H, Effects of laminin on hard tissue formation by bone marrow cells *in vivo* and *in vitro*, Journal of Biomedical Science and Engineering, 査読有、Vol.7, No.1, 2014, pp. 15-23.

<http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2014.71003>

Yoshikawa M, Shimomura Y, Kakigi H, Tsuji N, Yabuuchi T, Hayashi H, Effect of L-lysine in culture medium on nodule formation by bone marrow cells, Journal of Biomedical Science and Engineering, 査読有、Vol.5, No.10, 2012, pp. 587-592. <http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2012.510072>

Kakigi H, Yoshikawa M, Hayashi H, Osteogenesis by bone marrow cells in a novel hybrid alginate/calcium phosphate sponge scaffold, Journal of Oral Tissue Engineering, 査読有、Vol.9, No.3, 2012, pp. 113-125.

〔学会発表〕(計 18 件)

Yoshikawa M, Kakigi H, Yabuuchi T, Tsuji N, Hayashi H, Hard tissue formation by bone marrow cells in hybrid scaffold with tryptophan or lysine coating sponge / hydroxyapatite, International Bone -Tissue -Engineering Congress 2013, 2013年12月16~21日、Singapore

Kakigi H, Yoshikawa M, Tsuji N, Hayashi H, Effects of two amino acids for hard tissue formation by bone marrow stem cells *in vitro*, International Bone -Tissue -Engineering Congress 2013, 2013年12月16~21日、Singapore

Yoshikawa M, Kakigi H, Tsuji N, Yabuuchi T, Hayashi H, Hard tissue formation by bone marrow cells in tryptophan-coated sponge scaffolds, World Conference on Regenerative Medicine, 2013年10月23~25日、Leipzig, Germany

Kakigi H, Yoshikawa M, Hayashi H, Effect of leucine for bone generation in porous hydroxyapatite scaffolds, World Conference on Regenerative Medicine, 2013年10月23~25日、Leipzig, Germany  
Yabuuchi T, Yoshikawa M, Hayashi H, Amino acid coating on a porous scaffold for osteogenesis in the pores by bone marrow cells, World Conference on Regenerative Medicine, 2013年10月23~25日、Leipzig, Germany

柿木栄幸、好川正孝、辻 則正、林 宏行、骨髄幹細胞による硬組織形成に及ぼすアミノ酸の効果、日本歯科保存学会2013年度秋季学術大会(139回)、2013年10月18日、

秋田市

Yabuuchi T, Yoshikawa M, Hayashi H, Effects of amino acids for osteogenesis by bone marrow cells, 13th International Conference of the European Ceramic Society, 2013年6月23~27日、Limoges, France

Yoshikawa M, Kakigi H, Tsuji N, Yabuuchi T, Hayashi H, Porous hydroxyapatite scaffold with a hollow center for bone formation in vivo, 13th International Conference of the European Ceramic Society, 2013年6月23~27日、Limoges, France

藪内 崇督、柿木 栄幸、辻 則正、好川正孝、林 宏行、アルギン酸ナトリウム/リン酸カルシウム複合スポンジ状担体での骨髄幹細胞による硬組織形成、日本歯科保存学会2012年度春季学術大会(136回)、2012年6月29日、宜野湾市

Yoshikawa M, Shimomura Y, Tsuji N, Yabuuchi T, Kakigi H, Hayashi H, Osteogenesis by dextran coating on and among fibers of poly-vinyl formal sponge, 2012 Sino-Japan Dental Conference 日中歯科医学大会2012、2012年4月27日、成都、中華人民共和国

Yoshikawa M, Kakigi H, Shimomura Y, Tsuji N, Hayashi H, Osteogenesis in porous hydroxyapatite scaffolds with bone marrow cells in alginate gel, International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, 2012年7月18~20日、Dresden, Germany

Kakigi H, Yoshikawa M, Hayashi H, Hard tissue formation in a hybrid alginate/tri-calcium phosphate sponge *in vitro*, International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, 2012年7月18~20日、Dresden, Germany

Kakigi H, Yoshikawa M, Hayashi H, Hard tissue formation in a novel hybrid alginate/calcium phosphate sponge *in vitro*, 15th European conference on composite materials, 2012年6月24-28日、Venice, Italy

Yoshikawa M, Kakigi H, Tsuji N, Hayashi H, Hard tissue formation in sponges by bone marrow cells suspended in an alginate gel, 15th European conference on composite materials, 2012年6月24-28日、Venice, Italy

Yoshikawa M, Tsuji N, Kakigi H, Hayashi H, Effect of laminin for osteogenesis using bone marrow cells *in vivo* and *in vitro*, International Bone -Tissue -Engineering Congress 2011, 2011年10月12~15日、Hannover, Germany

Yoshikawa M, Kakigi H, Hayashi H, Property for hard tissue formation in

sponge scaffolds by bone marrow cells with alginate, World Conference on Regenerative Medicine, 2011年11月1~7日、Leipzig, Germany

Kakigi H, Yoshikawa M, Hayashi H, Osteogenesis by bone marrow cells in novel hybrid alginate/calcium phosphate sponge scaffold, World Conference on Regenerative Medicine, 2011年11月1~7日、Leipzig, Germany  
柿木栄幸、好川正孝、林 宏行、新規ハイブリッドアルギン酸ナトリウム/リン酸三カルシウムスポンジ状担体の骨髄幹細胞による骨形成能、日本歯科保存学会 2011年度秋季学術大会(第135回)、2011年10月21日、大阪市

## 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