

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592985

研究課題名(和文) 培養骨膜細胞による歯槽骨再生 Phase II 臨床試験と将来の無血清化への基礎的検討

研究課題名(英文) Phase II clinical study and basic analysis for serum free procedure in alveolar bone regeneration by cultured periosteal cells

研究代表者

星名 秀行 (hoshina, hideyuki)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：30173587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：【培養自家骨膜による歯槽骨増生の臨床試験】 研究期間中に23症例に培養自家骨膜施用による歯槽骨増生を行った。移植材の生着は良好であり、全例でインプラント埋入に十分な骨再生がえられた。3D-CT精密画像解析では骨形成と骨吸収の協調的な促進が確認され、細胞投与の効果の機序が提示された。

【無血清培地を用いた培養法による骨形成能の向上、製造の簡素化】幹細胞無血清培地を用いた4週間の培養により、高い骨形成能を有する均質な培養骨膜細胞が製造できた。この培養法による培養骨膜細胞は骨芽細胞マーカーを強く発現し、高い骨形成能を示した。これらの結果は本研究課題の目的を達成している。

研究成果の概要(英文)：<Clinical study of alveolar bone augmentation by the cultured autogenous periosteal cell (CAPC)> Alveolar bone augmentation by administration of CAPCs were performed for 23 patients. Grafted materials were successfully engrafted, and all patient achieved bone regeneration sufficient for dental implant placement. Coordinated activation of bone formation and resorption was demonstrated as the mechanism in bone tissue engineering with the CAPC.

<Improvement in bone inductive ability and simplification of cultivation by application serum free media> Four weeks of cultivation by serum free culture medium based procedure enabled production of homogenous CAPC with osteoblastic characteristics. Those CAPC expressed osteoblastic markers and demonstrated improved bone induction by subcutaneous implant in nude mice. These result showed achievement of the goal of this research task.

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：骨膜細胞 歯槽骨再生 再生療法 無血清培地

1. 研究開始当初の背景

私たちは、培養自家骨膜による歯槽骨再生の臨床試験を開始していた。しかしながら、これまでの Phase 臨床試験でその骨再生における有用性が示唆されたものの、厳密な証明には比較対照試験のデータが必要だった。同時に、無血清培養化による患者の負担の軽減や臨床試験で示された培養骨膜の骨組織形成促進作用のメカニズムを解明する必要があった。

2. 研究の目的

【目的】

- (1)比較対照試験による培養自家骨膜の有効性の検証
- (2)骨膜細胞の無血清培養法の樹立 = 安全性の向上と患者の負担を軽減
- (3)再生骨を構成する細胞群の起源、分化のしくみ、骨形成と吸収の機構解明

【明らかにすること】

- A. 培養骨膜細胞による歯槽骨再生の有効性を比較対照試験で検証する。
- B. 骨膜細胞の無血清培養条件の確立 (培養の迅速化・骨形成能の向上、安全性の検証)
- C. 培養骨膜が移植床において骨組織再生に果たす役割

3. 研究の方法

- A. 培養骨膜細胞 + beta-TCP + PRP と自家骨 + PRP のランダム化比較対照試験を上顎洞底挙上症例で行う 増生骨の生着の臨床経過、骨形成・骨吸収の様相を 3D-CT 画像解析で分析する。= 細胞投与がもたらす効果を骨代謝の観点から解明する。骨形態計測とともに組織学的な解析を行う。
- B. [培養系]: 各種無血清培地の比較 (血清使用の減量、あるいは完全な無血清化) = 効率的な培養条件の検討 骨分化度と安全性の検証
- C. [動物実験系]: B で得られた細胞の骨誘導能を検証する。培養骨膜細胞をマウス皮下に移植し、骨形成の様相を観察する。

4. 研究成果

【培養自家骨膜併用による歯槽骨造成の臨床試験】平成 25 年度中では 6 名、研究期間全体で 23 症例に培養自家骨膜による歯槽骨および上顎洞底に培養骨膜と自家骨 40-25%と PRP を混合した移植材を移植した。移植材の生着は良好であり、現在までに移植後の骨造成の状態を CT 画像解析で確認をすすめた。全例でインプラント埋入に十分な骨再生がえられた。異常経過、有害事象は観察されなかった。

3D-CT 精密画像解析では 1 年経過後に骨形成と骨吸収の協調的な促進が確認され、細胞投与の効果が提示された。Bone 2012 に端緒的な報告を行い、さらに詳細の内容について現在投稿の準備を進めている。目的とする培養骨膜施用の効果の証明とメカニズムの提示

が達成された。

【無血清培地を用いた新たな培養プロトコルによる安全性と培養操作の簡素化と低侵襲化】ヒト顎骨骨膜を用いて、無血清培地 (STK1 と 3) にヒト血清を 0.5% 加えた条件下で 4 週間の培養期間で直径 3cm の培養骨膜シートが安定して得られることを見出した。従来培養法に比べ、無血清培地培養法 (STK1+STK3) は、アルカリフォスファターゼ染色、オステオポンチンなどの骨芽細胞マーカーの発現が顕著で、アリザリンレッド染色でも広範囲に染色が観察された。マウス皮下への移植実験では、無血清培地培養法では骨形成の活性が従来法に比べて高いことが示唆された。これは、骨膜細胞を効率よく増幅し増殖し、かつ均一な分化を誘導して、骨形成能の優れた細胞を短期間で製造できる方法を確立できる可能性が示された。この結果は J Tissue Eng 2013 に報告済みである。目的とする培養の効率化と安全性の確保に多くの前進が得られた。

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 7 件 : すべて査読有)

1. Kawase T, Uematsu K, Kamiya M, Nagata M, Okuda K, Burns DM, Nakata K, Yoshie H. Real-time quantitative polymerase chain reaction and flow cytometric analyses of cell adhesion molecules expressed in human cell-multilayered periosteal sheets in vitro. *Cytherapy*. 2014 May;16(5):653-61. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.11.003. PMID: 24418404
2. Uematsu K, Nagata M, Kawase T, Suzuki K, Takagi R. Application of stem-cell media to explant culture of human periosteum: An optimal approach for preparing osteogenic cell material. *J Tissue Eng*. 2013 Oct 23;4:2041731413509646. doi: 10.1177/2041731413509646. eCollection 2013.
3. Okuda K, Kawase T, Nagata M, Yamamiya K, Nakata K, Wolff LF, Yoshie H. Tissue-engineered cultured periosteum sheet application to treat infrabony defects: case series and 5-year results. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2013 May-Jun;33(3):281-7. doi: 10.11607/prd.1545. PMID: 23593621

4. Uematsu K, Kawase T, Nagata M, Suzuki K, Okuda K, Yoshie H, Burns DM, Takagi R. Tissue culture of human alveolar periosteal sheets using a stem-cell culture medium (MesenPRO-RS™): In vitro expansion of CD146-positive cells and concomitant upregulation of osteogenic potential in vivo. *Stem Cell Res.* 2013 Jan;10(1):1-19. (doi: 10.1016/j.scr.2012.08.006.) PMID:23041617
5. Nagata M, Hoshina H, Li M, Arasawa M, Uematsu K, Ogawa S, Yamada K, Kawase T, Suzuki K, Ogose A, Fuse I, Okuda K, Uoshima K, Nakata K, Yoshie H, Takagi R. A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: Coordinated activation of bone formation and resorption. *Bone.* 2012 May;50(5):1123-9. PMID:22406494
6. Kawase T, Tanaka T, Nishimoto T, Okuda K, Nagata M, Burns DM, Yoshie H. Improved adhesion of human cultured periosteal sheets to a porous poly(L-lactic acid) membrane scaffold without the aid of exogenous adhesion biomolecules. *J Biomed Mater Res A.* 2011 Jul;98(1):100-13. PMID:21544931
7. Kawase T, Kogami H, Nagata M, Uematsu K, Okuda K, Burns DM, Yoshie H. Manual cryopreservation of human alveolar periosteal tissue segments: Effects of pre-culture on recovery rate. *Cryobiology.* 2011 Jun;62(3):202-9. PMID: 21466797

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 永田昌毅 培養自家骨膜細胞がもたらす骨代謝活性化と骨組織再生. 第 13 回日本再生医療学会総会 シンポジウム 28 「口腔領域細胞を応用した再生医療」, 2014 年 3 月 4-6 日 京都市
2. 永田昌毅. 第 693 回新潟医学会 シンポジウム「再生医療による難治性疾患治療の幕開け」 培養骨膜シート移植による顎骨再生治療. 第 693 回新潟医学会 2013 年 10 月 19 日, 新潟市
3. 上松晃也, 川瀬知之, 永田昌毅, 奥田一博, 吉江弘正, 高木律男. 幹細胞用培地 (MesenPRO) は骨膜シート中の CD146+細胞の増加と骨形成ポテンシャルの向上に貢献する. 第 12 回日本再生医療学会総会. 横浜市. 2013 年 3 月 21 日-23 日. 第

12 回日本再生医療学会総会プログラム・抄録 182 頁 . 0-31-3.

4. 吉江弘正, 奥田一博, 川瀬知之, 永田昌毅, 高木律男, 中田 光. S-05-2 培養骨膜シートによる歯周組織・顎骨の再生療法. シンポジウム S-05 歯科における再生医療の将来 第 12 回日本再生医療学会総会・横浜市, 2013 年 3 月 22 日 (21 日-23 日)
5. 上松晃也, 永田昌毅, 川瀬知之, 星名秀行, 小川信, 池田順行, 高木律男 歯槽骨再生療法に用いる培養骨膜シートの質的向上を目的とした培地の最適化. 新潟歯学会第 2 回例会, 新潟市, 2012 年 11 月 10 日.
6. Kohya Uematsu, Tomoyuki Kawase, Masaki Nagata, Kazuhiro Okuda, Hiromasa Yoshie. Preparation of thicker, osteogenic periosteal sheets by xenofree stem-cell media 98th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology Los Angeles, California, USA, September 29-October 2, 2012.
7. 永田昌毅 「骨再生アップデート」口腔インプラント学会 2012 年 9 月 大阪 第 42 回日本口腔インプラント学会・学術大会 イブニングセッション .大阪市, 2012 年 9 月 22 日
8. Kohya Uematsu, Tomoyuki Kawase, Masaki Nagata, Kazuhiro Okuda, Hiromasa Yoshie, Ritsuo Takagi. Explant culture of human periosteum using a stem cell culture medium (STK1 TM, STK3 TM) contributes to advancement of osteogenic potential. The 2012 International Symposium of Materials on Regenerative Medicine (2012 ISOMRM), Taipei, Taiwan, August 29-31, 2012. Scientific program-2012 ISOMRM p.27
9. 永田昌毅, 星名秀行, 上松晃也, 小川 信, 川瀬知之, 奥田一博, 魚島勝美, 中田 光, 吉江弘正, 高木律男. 培養自家骨膜細胞シートを用いた歯槽骨再生臨床試験-骨形成と骨吸収の協調的な活性化- 第 11 回日本再生医療学会総会. 横浜市, 2012 年 6 月 12-14 日
10. 神谷真菜, 川瀬知之, 関根優, 小林美登, 奥田一博, 永田昌毅, 布施一郎, 中田 光, 吉江弘正. Epigallocatechin-3-gallate によるヒト骨膜シートの冷蔵保存効果の検証. 第 11 回日本再生医療学会総会.

横浜市、2012年6月12-14日

11. 奥田一博、川瀬知之、山宮かの子、永田昌毅、関根 優、白山早起、藤本陽子、布施一郎、中田 光、吉江 弘正。培養骨膜シートを用いた歯周組織再生療法の5年予後。第11回日本再生医療学会総会。横浜市、2012年6月12-14日
12. 上松晃也、川瀬知之、永田昌毅、奥田一博、吉江弘正、高木律男。生体骨膜により近似した培養骨膜シートの作成を目指した幹細胞用培地でのアプローチ。第11回日本再生医療学会総会。横浜市。2012年6月12日-14日。第11回日本再生医療学会総会プログラム・抄録 179頁
13. 上松晃也、永田昌毅、星名秀行、池田順行、高木律男。歯槽骨再生療法に用いる培養骨膜シートの質向上を目的とした新たな培養法の探索。第66回NPO法人日本口腔科学会学術集会。広島市、2012年5月17-18日第66回日本口腔科学会学術集会プログラム抄録集 63頁。
14. 小川 信、永田昌毅、星名秀行、上松晃也、勝見祐二、山田一穂、魚島勝美、吉江弘正、高木律男。培養骨膜シートを用いた歯槽骨再生療法の臨床試験。平成23年度新潟歯学会第2回例会，新潟市，2011年11月12日。
15. 上松晃也、川瀬知之、永田昌毅、奥田一博、吉江弘正、高木律男。幹細胞用培地は骨膜シートのポテンシャル向上に貢献するか？。第54回秋季歯周病学会学術大会，山口市，2011年9月24-25日。日本歯周病学会会誌第53巻秋季特別号 38頁，2011年
16. 吉江 弘正、奥田一博、川瀬知之、永田昌毅。骨膜シートによる歯周組織・顎骨の再生療法。シンポジウム「顎骨の再生の基礎と臨床」日本医学会 2011年4月9日 東京国際フォーラム

〔図書〕(計 0 件)印刷中

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
医療関係者向け：
<http://bmrctr.jp/saisei/project/project4>
患者向け：
<http://bmrctr.jp/saisei/public/public4>

6. 研究組織

(1)研究代表者

星名 秀行 (Hideyuki Hoshina)
新潟大学 歯学総合病院 講師
研究者番号：30173587

(2)研究分担者

永田 昌毅 (Masaki Nagata)
新潟大学 歯学総合病院 講師
研究者番号：10242439

(3)研究分担者

川瀬 知之 (Tomoyuki Kawase)
新潟大学大学院 歯学系 准教授
研究者番号：90191999

(4)研究分担者

奥田 一博 (Kazuhiro Okuda)
新潟大学大学院 歯学系 准教授
研究者番号：00169228

(4)研究分担者

魚島 勝美 (Katsumi Uoshima)
新潟大学大学院 歯学系 教授
研究者番号：50213400