

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592997

研究課題名(和文) 臨床応用を目指した羊膜を基質とした培養骨膜由来細胞シートに関する基礎的研究

研究課題名(英文) Development of cultured periosteal-derived cells sheet for clinical application using amniotic membrane substrate

研究代表者

金村 成智 (Kanamura, Narisato)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70204542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは羊膜の有用性に注目し、羊膜上培養ヒト骨膜由来細胞シートを作製し検討を加えた。骨膜由来細胞は羊膜上にて増殖、層状構造を示し、免疫染色像では細胞増殖マーカー、間葉系細胞マーカー、骨芽細胞マーカーの発現を認めた。また、デスモソーム構成タンパク、タイト結合構成タンパク、基底膜を構成する細胞接着タンパクならびにコラーゲンが発現し、1枚の細胞シートを形成していると考えられた。また、実験動物への移植後においても細胞シートとしての性質を保持していた。以上より、羊膜は骨膜由来細胞の培養に適当な基質であり、羊膜上培養骨膜由来細胞は、歯周組織を再生する能力を有する細胞シートである可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：A cultured human periosteal-derived cell sheet was prepared using an amniotic membrane. Periosteal-derived cells were grown on the membrane, forming a layered structure with the expressions of cell proliferation, mesenchymal cell, and osteoblast markers on immunostaining images. They formed a single cell sheet expressing desmosomal proteins, tight junction proteins, cell adhesion proteins constituting the basement membrane, and collagen. It retained cell sheet properties even when transplanted into an experimental animal. Thus, the amniotic membrane is a suitable substrate for culturing periosteal-derived cells, and periosteal-derived cells cultured on the membrane may generate a cell sheet with an ability to regenerate periodontal tissue.

研究分野：歯学・外科系歯学

キーワード：移植・再生医療 再生医学 細胞・組織 歯学 臨床

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに羊膜の有用性に注目し、この羊膜を細胞培養基質として用いた研究を行ってきた。すでに羊膜を基質とした培養口腔粘膜上皮細胞シートの作製方法を確立した。各種口腔粘膜上皮欠損患者に対しての臨床応用を行い、拒絶反応等の異常なく良好な結果を得た。また研究分担者らは、この羊膜上の細胞培養系を用い、羊膜上ヒト歯根膜由来細胞シートの作製に成功した。

これらの研究成果より、羊膜は各種細胞培養の基質として適し、また新たな再生医療的治療法として極めて有用かつ有効であることがわかった。そして今回、この細胞培養系を骨膜由来細胞の培養に応用することを立案した。歯周病は成人の8割が罹患しているといわれており、歯周病等で失われた歯周組織の再生は歯科医療にとって大きな目標である。歯科医学の進歩により歯周病の原因や機序が次第に明らかになりつつあり、近年、歯周組織の再生に骨膜由来細胞を臨床応用する研究が散見される。すなわち、骨膜組織を *in vitro* でシート状に培養し自家移植することで、歯周組織の再生をみたと報告されている。そこで、研究代表者は骨膜由来細胞の培養には適当な基質を用いることが重要と考え、生物学的材料として様々な医療領域分野で注目されている羊膜を用いることに着想した。

羊膜は、胎盤の最表層を覆う薄膜で、免疫学的に胎児を母体から隔離する特異な機序が存在する。また分娩後に胎盤よりほぼ無菌的に採取され、胎盤は分娩後に通常廃棄される組織で、倫理的、技術的に入手が容易である。また、各種細胞の培養基底膜として適し、抗炎症作用・感染抑制作用などを有し、他の組織にはない特徴を備えている。われわれはこれまでの羊膜を用いた細胞培養系を骨膜由来細胞に応用し、臨床応用可能な羊膜上培養骨膜由来細胞シート作製の最適化、また羊

膜独自の有用性を併せ持つ新たな培養シートとしての検討を加えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、羊膜上の細胞培養系にて骨膜由来細胞の培養を行い、羊膜上培養骨膜由来細胞シート作製のための最適化を行い、培養シートの組織学的・免疫組織学的検討を加えることである。さらに、移植後においても培養シートが正常組織の構造や性質を保持しているかを確認するためのデータ集積を行うことで、新たな臨床応用可能な培養シートの開発を行うことである。

歯科領域ではこれまでに *in vitro* にて骨膜由来細胞を培養・増殖させ、*in vivo* へ移植し戻す方法で、有意に歯周組織(歯槽骨)の再生が観察される報告を散見する。しかし、抗炎症作用や感染抑制等の諸効果において高い有効性および有用性をもつ羊膜に注目して骨膜由来細胞シートの作製を行う研究報告はない。本研究にて、研究代表者は羊膜上培養骨膜由来細胞シートが歯槽骨膜と同等の能力を持ち、これまでにない新たな培養シートとして機能させるべく検討を加えた。なお当該研究の実施は、本学医学倫理審査委員会ならびに本学動物実験委員会の許可を受けた。

### 3. 研究の方法

骨膜由来細胞の培養は、すでに確立している羊膜上の細胞培養系を応用し、羊膜上骨膜由来細胞シート作製のために最適な培養技術の改良および調整を行った。そして作製した羊膜上培養骨膜由来細胞シートの組織学的、免疫組織学的検討を加え、さらに同培養シートの *in vivo* における細胞動態についても検討を加えた。

(1) 羊膜を用いた培養骨膜由来細胞シート作製、および組織学的・免疫組織学的検討

#### 羊膜の採取および保存方法

当研究にて使用する羊膜については、本学附属病院産科の協力を得、帝王切開予定の妊婦から羊膜を採取する。羊膜提供者は、全身的に合併症のない帝王切開予定の妊婦で、3ヶ月以内の血清検査で感染症（B型・C型肝炎、梅毒、ヒト免疫不全ウイルス、クロイツフェルト・ヤコブ病、ウエストナイル熱など）が陰性であるものを対象とした。具体的には、当院産科分娩室にて帝王切開時に取り出された胎盤から無菌的に羊膜を採取し、抗菌薬を含む洗浄液で洗浄した後、保存液中に浸した状態で-80℃の冷凍庫で保存した。なお、安定した羊膜の供給が得られない際は、特定非営利活動法人・再生医療支援機構・近畿羊膜バンク（京都）からの研究用羊膜の譲渡・供給を受けた。

#### 骨膜の採取、培養および羊膜上での骨膜由来細胞の培養

本学附属病院歯科所属の歯科医師により、抜歯術予定患者、歯周外科手術予定患者から骨膜を採取した。具体的には、智歯の抜歯術や歯周病患者における歯周外科手術時の粘膜炎骨膜弁作製時に、歯槽骨上にある組織を骨膜組織として採取した。得られた骨膜片を抗菌薬添加PBS(-)にて洗浄後、初代培養細胞を得るために培養皿に静置した状態にて培養を行った。培養液として10%FBSおよび抗菌薬を添加した標準的な細胞培養液を用いた。3~4継代培養後、羊膜上にこれら骨膜由来細胞を播種し、骨分化誘導培地を用いて約3週間の培養を行った。

#### (2)羊膜上培養骨膜細胞シートの組織学的および免疫組織学的検討

作製された培養シートが、どの程度正常骨膜に近いかを以下の項目にて検討を加えた。

組織学的検討：マトキシリン-エオジン染色を行い、細胞形態等について組織学的に検討した。

免疫組織学的検討：骨膜由来細胞の羊膜上における細胞増殖能および細胞間接着装置、培養細胞-基質（羊膜）間の接着（基底膜）ならびに骨芽細胞が産生するタンパクの局在について検討を加えた。

#### (4)羊膜上培養骨膜由来細胞シートの実験動物への移植

作製した培養シートは、実験動物（BALB/cヌードマウス）腎皮膜下への移植を行い、4週間後に摘出、*in vivo*における細胞の遊走増殖について組織学的、免疫学的検討を行った。

#### 4. 研究成果

骨膜由来細胞は羊膜上にて増殖、層状構造を示し、免疫染色像では細胞増殖マーカー（Ki-67）、間葉系細胞マーカー（vimentin）、骨芽細胞マーカー（bone Gla protein）を認め、また、デスモソーム構成タンパク（desmoplakin）、タイト結合構成タンパク（ZO-1）、基底膜構成細胞接着タンパク（Laminin 5）、基底膜構成コラーゲン（collagen VII）が発現し、1枚の細胞シートを形成していると考えられた。また、移植後も vimentin, bone Gla protein の発現を認め、*in vivo* の環境下においても細胞シートとしての性質を保持していた。

歯周組織欠損の再生に重要な要素として、増殖因子・細胞・基質が必要とされるが、理想的な歯周組織の再生のための基質はまだ開発されていない。われわれが渉猟した限り、骨膜由来細胞の培養基質に羊膜を用いた研究報告はこれまでになく、また羊膜上骨膜由来細胞の *in vivo* の環境下での細胞動態については未知の部分が多い。よって今回われわれは、羊膜上培養骨膜由来細胞の実験動物への移植を行い、細胞の遊走増殖についての検討を行った。培養細胞の移植方法としては、実験動物の歯周欠損モデルへの移植が散見さ

れるが、生着組織の均一化や特定が困難であること、また極めて狭小な部位への細胞移植であり、安定した再現性が得られないことが予測されたため、培養細胞を一箇所に留めることが可能であり免疫寛容が高い腎被膜下への細胞移植を実施した。

結果として、骨膜由来細胞は羊膜上で1枚の細胞シートを形成しており、羊膜は培養に適切な基質であることが示唆された。骨膜には骨芽細胞や骨細胞へ分化する能力をもつ細胞が含まれているとされ、細胞シートにて骨芽細胞が産生するタンパク (bone Gla protein) の発現を認め、*in vivo* の環境下においてもその性質を保持していた。今後、長期間移植後の検討などの検討が必要と思われるが、羊膜上培養骨膜由来細胞は、歯周組織を再生する能力を有する細胞シートである可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

雨宮 傑、中村隆宏、本城賢一、熊本園子、足立圭司、山本俊郎、木下 茂、金村成智、ヒト羊膜を用いた新たな歯周組織再生法の開発、日本歯科医学会誌、査読無、32 巻、2013、44-48

Adachi K, Amemiya T, Nakamura T, Honjo K, Kumamoto S, Yamamoto T, Bentley A, Fullwood NJ, Kinoshita S, Kanamura N, Human periodontal ligament cell sheets cultured on amniotic membrane substrate, Oral Diseases, 査読有, 20 巻 6 号, 2014, 582-590, DOI: 10.1111/odi.12176.

Honjo K, Yamamoto T, Adachi T, Amemiya T, Mazda O, Kanamura N, Kita M, Evaluation of a dental pulp-derived cell sheet cultured on amniotic membrane substrate, Bio-Medical Materials and Engineering, 査読有, 25 巻 2 号, 2015, 203-212, DOI:

10.3233/BME-151270.

〔学会発表〕(計24件)

山本俊郎 他、羊膜上培養歯髓由来細胞シートの作成、日本歯周病学会 2012 春季学術大会 (第 55 回) 平成 24 年 5 月 17 日、札幌コンベンションセンター、北海道・札幌市  
Yamamoto T, et al, Cultured of pulp-derived cells on human amniotic membrane, The 90th General Session & Exhibition of the International Association of Dental Research (IADR), which will be held in conjunction with the IADR Latin American Region (LAR) Annual Meeting, 平成 24 年 6 月 21 日, Iguacu Falls, Brazil

本城賢一 他、歯周組織の再生を目指した羊膜上培養歯髓由来細胞シート作成、第 12 回日本抗加齢医学会総会、平成 24 年 6 月 23 日、パシフィコ横浜会議センター、神奈川県・横浜市

山本俊郎 他、羊膜上培養歯髓由来細胞シートの免疫組織化学的検討、日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会 (第 136 回) 平成 24 年 6 月 29 日、沖縄コンベンションセンター、沖縄県・宜野湾市

熊本園子 他、羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞による歯周組織再生に関する検討、日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会 (第 136 回) 平成 24 年 6 月 29 日、沖縄コンベンションセンター、沖縄県・宜野湾市

雨宮 傑 他、羊膜上培養歯根膜由来細胞を用いた骨再生に関する免疫組織学的検討、第 33 回日本炎症・再生医学会、平成 24 年 7 月 5 日、ホテル日航福岡、福岡県・福岡市

雨宮 傑 他、歯周組織再生をめざした羊膜上培養歯根膜由来細胞の骨形成能に関する免疫組織化学的検討、第 67 回日本口腔科学会学術集会、平成 25 年 5 月 23 日、栃木

県総合文化センター、栃木県・宇都宮市

山本俊郎 他、羊膜上培養歯髄由来細胞シートの骨分化能に関する検討、日本歯周病学会 2013 春季学術大会 (第 56 回)、平成 25 年 5 月 31 日、タワーホール船堀、東京都・江戸川区

足立圭司 他、羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞による骨再生に関する免疫組織学的検討、日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会 (第 138 回)、平成 25 年 6 月 27 日、福岡国際会議場、福岡県・福岡市

山本俊郎 他、羊膜上培養歯髄由来細胞シートの作成及び骨分化能に関する研究、第 34 回日本炎症・再生医学会、平成 25 年 7 月 2 日、国立京都国際会館、京都府・京都市

Amemiya T, et al, Cell sheet culture on amnion aiming at periodontal tissue regeneration, 2nd Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region (IADR-APR), 平成 25 年 8 月 21 日, Bangkok, Thailand

雨宮 傑 他、羊膜を用いた培養ヒト歯根膜由来細胞の骨形成能に関する検討、第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会、平成 25 年 10 月 11 日、福岡国際会議場、福岡県・福岡市

本城賢一 他、羊膜を基質とした培養歯髄由来細胞シートの作成および骨分化能に関する検討、第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会、平成 25 年 10 月 11 日、福岡国際会議場、福岡県・福岡市

雨宮 傑 他、羊膜を用いた培養骨膜由来細胞シートの作製、日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会 (第 139 回)、平成 25 年 10 月 18 日、秋田県総合生活文化会館 (アトリオン)、秋田県・秋田市

雨宮 傑 他、第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、平成 26 年 5 月 9 日、京王プラザホテル、東京都・新宿区

本城賢一 他、骨分化した羊膜上培養歯

髄由来細胞シートの免疫組織化学的検討、日本歯周病学会 2014 春季学術大会 (第 57 回)、平成 26 年 5 月 23 日、長良川国際会議場、岐阜県・岐阜市

本城賢一 他、骨分化を目指した羊膜上培養歯髄由来細胞シートの作成、第 14 回日本抗加齢医学会総会、平成 26 年 6 月 6 日、大阪国際会議場、大阪府・大阪市

Amemiya T, et al, Immunohistochemical study of periosteal-derived cell sheet cultured on amniotic membrane aiming at periodontal tissue regeneration, 96th The American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) Meeting, Scientific Sessions and Exhibition, 平成 26 年 9 月 12 日, Honolulu, Hawaii, USA

Honjo K, et al, Examination of bone differentiation for human dental pulp-derived cells cultured on amniotic membrane, 96th The American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) Meeting, Scientific Sessions and Exhibition, 平成 26 年 9 月 12 日, Honolulu, Hawaii, USA

雨宮 傑 他、ヒト羊膜を用いた新たな培養細胞シートの開発、第 27 回京都府歯科医学大会 (第 66 回近畿北陸地区歯科医学大会併催)、平成 26 年 9 月 28 日、シルクホール、京都府・京都市

②1 足立圭司 他、*In vivo* における羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞シートの骨分化能に関する検討、第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会、平成 26 年 10 月 18 日、幕張メッセ国際会議場、千葉県・千葉市

②2 雨宮 傑 他、羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞シートの *in vivo* 骨再生の検討、日本歯科保存学会 2014 年度秋季学術大会 (第 141 回)、第 16 回日韓歯科保存学会学術大会、平成 26 年 10 月 31 日、山形テルサ、山形県・山形市

⑳ 本城賢一 他、日本歯科保存学会 2014 年度秋季学術大会（第 141 回）第 16 回 日韓歯科保存学会学術大会、平成 26 年 10 月 31 日、山形テルサ、山形県・山形市

㉑ 足立圭司 他、羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞シートの骨分化に関する検討、第 26 回 NPO 法人日本口腔科学会近畿地方部会、平成 26 年 12 月 6 日、京都大学百周年時計台記念館 2 階国際交流ホール、京都府・京都市

中村 隆宏 (NAKAMURA, Takahiro)

足立 圭司 (ADACHI, Keiji)

本城 賢一 (HONJO, Ken-Ichi)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

金村 成智 (KANAMURA, Narisato)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：7 0 2 0 4 5 4 2

### (2) 研究分担者

雨宮 傑 (AMEMIYA, Takeshi)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：9 0 3 9 8 3 8 9

山本 俊郎 (YAMAMOTO, Toshiro)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：4 0 3 4 7 4 7 2

熊本 園子 (KUMAMOTO, Sonoko)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：9 0 6 1 3 5 6 3

追加：平成 25 年 7 月 1 日

辞退：平成 26 年 4 月 14 日

山本 健太 (YAMAMOTO, Kenta)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：0 0 6 3 6 1 6 0

足立 哲也 (ADACHI, Tetsuya)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：1 0 6 1 3 5 7 3

### (3) 研究協力者