

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659872

研究課題名(和文) 歯槽骨由来骨膜シートから組織工学的に軟骨をつくる

研究課題名(英文) Tissue-engineering of cartilage by the use of alveolar bone-derived periosteal sheets

研究代表者

川瀬 知之 (Kawase, Tomoyuki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90191999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：われわれが臨床応用しているヒト骨膜シートから軟骨を調製できれば、さらに汎用性が増すと考え、本研究を実施した。高度に重層化した骨膜シートを球状に成形し、軟骨細胞誘導培地により分化誘導をかけると、軟骨細胞様の表現形を示した。また骨芽細胞マーカーであるCol Iは細胞球の表面とその直下にわずかに残る程度まで発現が低下した。しかし、軟骨細胞マーカーのCol IIの発現が組織全体に広がらないこと、細胞球の直径が5mm以上の大きさに成長しないことから、 β -catenin阻害剤でWntシグナルを優位にする方法も試みたが、当初の目標を達成することが出来なかった。ドナーの年齢が影響しているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：We developed the method to prepare the periosteal sheet as an osteogenic grafting material from human alveolar periosteum and applied it in periodontal regenerative therapy. The purpose of this study is to develop a new technology of tissue-engineering cartilage from the periosteal sheet and to expand its clinical applicability. Highly cell-multilayered periosteal sheets were detached, molded to be spherical and differentiated within a chondrocyte-differentiation medium. This treatment up-regulated chondrocyte markers, such as collagen II, proteoglycans, aggrecan, and Sox9 within the periosteal sphere. In contrast, collagen I was down-regulated and expressed only at and beneath the surface of the sphere. To the osteo-differentiation pathway, Wnt signals, the periosteal sphere was treated with a β -catenin inhibitor. However, it substantially suppressed cell viability and did not facilitate chondrogenic differentiation. It may be due to the nature of samples obtained from adult donors.

研究分野：組織工学

キーワード：軟骨誘導 歯槽骨 骨膜細胞 培養 分化

1. 研究開始当初の背景

われわれはヒト培養骨膜シートの歯周再生治療への応用を積極的に進めている。すでに80症例を超える患者さんに実施してきた。歯槽骨の再生は期待以上の効果を上げることができたが、軟骨再生にも応用できると、顎顔面部の再生医療において大きな前進が見込まれ、培養骨膜シートの有用性も一段とアップする。

ヒト培養骨膜シートに含まれる細胞の表面抗原の解析から、そこには組織特異的幹細胞とよばれる未分化間葉系細胞(CD73+, CD90+, CD105+, CD11b-, HLA-DR-, CD45-)が多く含まれていること、CD19+, CD34+, CD146+, STRO-1+の細胞もわずかではあるが確実に存在しているというデータを得た。DNA array や組織学的検討から、骨膜シートは骨芽細胞分化誘導を目的とした dexamethasone 処理によって、軟骨細胞の転写因子である sox-9 の発現を低下する一方、collagen などとともに軟骨に多い細胞外基質(ECM)である proteoglycan を多量に産生することがわかった。また、この分化誘導で、意外なことに CD34 陽性細胞の比率が顕著に増加することもわかった。一方、動物への移植実験では、骨膜シートのままだったことから細胞密度が比較的強く抑えられていたためか、結果的に移植骨膜シートが軟骨様組織を形成することを認めなかった。

しかし、骨膜シートのまま脂肪細胞への分化誘導を行なった予備の実験では、数%の細胞に脂肪滴が形成された。これらの所見から総合的に判断すると、条件さえ整えば、軟骨細胞への分化も可能はずである。

2. 研究の目的

ヒト培養骨膜シートから分散させた細胞を高密度培養し、誘導試薬を加えることによって、軟骨細胞に分化させ、さらに適当なバイオリアクター内で培養して軟骨をつくる。

3. 研究の方法

培養 30 日くらいの骨膜シート(直径 3-4cm)から酵素的に細胞を分散させ、これをスフェロイド形成ができる容器で高密度培養する。軟骨誘導培地用の試薬は市販のキットを利用し、添加容量や添加のタイミングなどの条件をふって最適化を図る。最終的に、in vitro と in vivo で軟骨を形成する。

(1) 平成 24 年度

骨膜の採取

同意に基づいてボランティアから骨膜を採取させてもらい、培養に供する。

骨膜細胞の軟骨細胞への分化誘導

Explant culture により形成した骨膜シートは中心部付近で細胞が重層化しているので、そのまま分化誘導実験に供する。誘導剤としては TGF 1 などを含む市販のキットを利用する。ただ、骨膜シートの場合には、かつて脂

肪細胞への誘導を試した際に数%程度の誘導結果しか得られなかったこともあり、豊富な I 型コラーゲンなどが軟骨への分化をけん制している可能性もある。

この可能性を排除するために、培養の中期段階で骨膜シートから細胞を Liberase にて分散させたのちに、スフェロイド形成をさせて同様に実験に供することも計画している。分化誘導試薬の用量、添加するタイミングについて最適化する。

誘導方法のスクリーニングとしては、アルシアン青による ECM (proteoglycans) の染色とマツソントリクローム法によるコラーゲン(全タイプまとめて)の染色を採用する。ALP の活性染色もおこない骨芽細胞方向への分化も確認しておく。現有の培養設備を利用する。

DNA microarray と qRT-PCR による軟骨関連遺伝子の検出

軟骨細胞への誘導法が確立されたら、網羅的遺伝子解析法とピンポイントでの関連遺伝子(特に転写因子)発現の解析を通して、骨膜細胞の軟骨細胞への分化レベルを検討する。このデータをもとに、誘導法のさらなる最適化に取り組む。現有の real-time PCR 装置を利用する。

生化学的方法による軟骨マーカー蛋白の検出

同様に骨膜シート・細胞全体から蛋白を抽出して電気泳動と Westernblotting にて標的蛋白の検出を試みる。主な標的蛋白は軟骨細胞のマーカーである sox9, collagen type II, proteoglycans であるが、骨芽細胞のマーカーである Runx2, collagen type I, osteocalcin などについてもあわせて検証する。現有の電気泳動・プロットング・化学発光撮影装置を利用する。

パラフィンおよび凍結標本による軟骨マーカー蛋白の免疫組織学的検出

上記の実験はいずれも骨膜シート・細胞全体における発現を検証する目的であるが、骨膜シートにおける細胞起源を考えるうえで、標的蛋白の局在を調べておくことは意義がある。ここでは標的蛋白の局在を細胞の性質や動態と関連づけて評価する。主に骨膜シートのほうで実施することになるが、断面を薄切した組織標本パラフィン切片と凍結切片を用意し、標的とするのは(4)と同様に、軟骨細胞のマーカーである sox9, collagen type II, proteoglycans であるが、骨芽細胞のマーカーである Runx2, collagen type I, osteocalcin などである。ALP 活性染色もおこない、上記実験から得たデータと裏付けとする。

日本再生医療学会での研究成果発表
第 12 回日本再生医療学会で研究成果を発表

する。

(2) 平成 25 年度以降

前年度から引き続いて軟骨細胞の誘導
前年度に引き続いて、「骨膜細胞には軟骨細胞へ分化する能力がある」ことを証明する。

免疫染色による骨膜細胞の同定
軟骨細胞の同定は、とくに組織切片において継続的に実施する。

動物移植による軟骨形成の検証
In vitro で軟骨様細胞の誘導が確認されたのをうけて、その裏づけを得るために動物移植実験をおこなう。ヌードマウスの背部皮下に in vitro で誘導した骨膜細胞を埋植し、最長 3 ヶ月まで観察を継続する。移植細胞は周辺の結合組織とともに摘出して組織切片とする。μCT で軟骨の体積を測定したのち、組織標本を作製する。

日本再生医療学会・アメリカ歯周病学会での研究成果発表
第 13 回日本再生医療学会、第 99 回アメリカ歯周病学会で研究成果を発表する。

4. 研究成果

軟骨誘導の初期操作は以下に記述するプロトコールにしたがって実施した。

まず、同意のもとに提供いただいたヒト歯槽骨由来の骨膜片を 10% FBS を含む Medium 199 培地か幹細胞用培地 (MesenPRO) で組織片培養して、ある程度の大きさ (直径 30mm 以上) になるまで骨膜シートとして成長させた。その後、スクレーパーを用いて傷害が最小になるように丁寧に剥離し、サンプルチューブに移した。遠心することによって、骨膜シートを折りたたまれたような球状の形態に成形した。この操作によって、シート内で多層化している細胞はより高密度な状態になる。この状態で、TGF 等を含む軟骨誘導培地に交換し、旋回培養器で培養を続けた。

一定期間培養して得られた球状の骨膜細胞塊について、組織学的あるいは分子生物学的解析を行なった。組織学的には、Alucian blue や Toluidine blue で濃染する proteoglycans の豊富な産生と蓄積が認められた。さらに、免疫組織染色によって、軟骨細胞のマーカーである collagen type II, aggrecan, Sox9 などの発現を認めた。一方、骨芽細胞のマーカーである collagen type I は細胞塊の外表面に一層局在が確認された。また Runx2 は Sox9 陽性細胞と重なるように局在していることが判明した。同様の傾向が、発現している mRNA の網羅的解析によっても確認された。

以上の結果から、骨膜シートを球状にして分化誘導培地のなかで回転させながら培養するというコンセプトは十分実用に耐えるものと判断した。また、培地は Medium 199

の基本培地の方が誘導効率に優れていたが、自発的に骨芽細胞への分化や石灰化物形成が認められることもあった。また、直径が 5mm 以上の大きさにならないことも課題として残った。

そこで、培地を市販の軟骨細胞誘導培地に切り替えて、同様の実験を試みた。軟骨細胞マーカーの発現誘導に関しては、Medium 199 をベースとした自作の培地以上の効果が認められたものの、collagen II の発現がスポット状のまま全体に広がらず、ECM の大部分はプロテオグリカンなどが占めていた。

さらに、catenin 阻害剤で古典的 Wnt シグナルを有意な状況に誘導することで軟骨細胞への効率的な誘導も試みたが、細胞毒性が高く、適切な濃度設定が困難であったことから、当初の目標に到達することが出来なかった。

昨今の学会発表で、年齢の高いドナーからの体性幹細胞を使用した場合、軟骨細胞様の分化傾向を示すものの、特に col II の発現が亢進しないという発表があり、われわれの結果はそれと一致しているのかもしれない。

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 4 件)

- 1) Kawase T, Uematsu K, Kamiya M, Nagata M, Okuda K, Burns DM, Nakata K, Yoshie H. Real-time quantitative PCR and flow-cytometric analyses of cell adhesion molecules expressed in human cell-multilayered periosteal sheets in vitro. *Cytherapy* 16:653-661; 2014. 査読有
- 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* 4:2041731413509646; 2013. 査読有
- 3) 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* 10(1):1-19; 2013. 査読有
- 4) Horimizu M, Kawase T, Tanaka T, Okuda K, Nagata M, Burns DM, Yoshie H. Biomechanical evaluation by AFM of cultured human cell-multilayered periosteal sheets. *Micron* 48:1-10; 2013. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) Kawase T, Okuda K, Nagata M, Burns DM, Nakata K, Yoshie H. The unique structure-function relationship found in osteogenic periosteal sheets. Termis EU 2014, 2014.6.10-13, Genova (Italy).
- 2) 川瀬知之、上松晃也、永田昌毅、奥田一博、中田 光、吉江弘正. 細胞重層化したヒト培養骨膜シートと単層骨膜細胞シートの細胞接着様式の比較. 第 13 回日本再生医療学会, 2014.3.4-6, 国立京都国際会館 (京都府、京都市).
- 3) Kawase T, Uematsu K, Nagata M, Okuda K, Burns DM, Yoshie H. Biological and biomechanical characterization of highly self-multilayered human periosteal sheets as an osteogenic grafting material. The 19th Annual International Society of Cell Therapy (ISCT) Meeting, 2013.4.22-25, Auckland (New Zealand).
- 4) 上松晃也、永田昌毅、川瀬知之、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, 2013.3.21-23, パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)
- 5) Uematsu K, Kawase T, Nagata M, Okuda K, Yoshie H. Preparation of thicker, osteogenic periosteal sheets by xenofree stem-cell media. The 98th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology, 2012.9.29-10.2, Los Angeles (CA, USA).

〔図書〕(計 0 件)

〔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 :
出願年月日 :
取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

川瀬 知之 (KAWASE TOMOYUKI)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号 : 9 0 1 9 1 9 9 9

(2) 研究分担者

奥田 一博 (OKUDA KAZUHIRO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号 : 0 0 1 6 9 2 2 8

(3) 研究分担者

永田 昌毅 (NAGATA MASAKI)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号 : 1 0 2 4 2 4 3 9