

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861879

研究課題名(和文) FGF徐放性超気孔性 -TCPと培養細胞シートを用いた歯周組織再生療法の開発

研究課題名(英文) periodontal tissue engineering by cultured cell sheet, fibroblast growth factor 2 and beta-tricalcium phosphate collagen composite scaffold

研究代表者

竹生 寛恵 (TAKEFU, Hiroe)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：40609103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、(1)培養細胞シートの作製方法の確立、(2)培養細胞シート、-TCPコラーゲン複合体スキャフォールドおよび成長因子FGF-2併用による骨増生の有効性について検討を行った。その結果、(1) F344/Jclラット大腿骨から採取した骨髄細胞を用いて骨髄細胞シートを作成できた。また培養期間を延長することでシートの強度が増加した。(2)ラット頭蓋骨に -TCPコラーゲン複合体スキャフォールドおよびFGF-2を併用することで大量の新生骨が認められた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was determine: (1)the novel method of cultured cell sheet using bone marrow cell from F344/Jcl rats' femur; (2)the effectiveness of the cultured bone marrow cell sheet, -TCP collagen composite scaffold and FGF-2 on bone regeneration of rats' calvariae. The results were as follows: (1)the multilayered osteoblast-like cell sheet was produced by this novel method. The proper culture term made this cell sheet more rigid; (2)the complex of -TCP collagen composite scaffold and FGF-2 made large amount of new bone on rats' calvariae.

研究分野：再生歯学

キーワード：歯周組織再生 -TCPコラーゲンスキャホールド FGF2 培養細胞シート

1. 研究開始当初の背景

現在、歯周組織再生療法は臨床応用されているが、細胞の足場に乏しい水平性や一壁性骨欠損には効果が少ない。歯槽骨のみの増生は可能になっているが、歯周組織全体の再生は未だ困難であり、新しいコンセプトを持った再生療法の開発が求められている。そこで申請者はセメント質、歯根膜、歯槽骨再生に必要な細胞をそれぞれ選択的に大量に供給する方法、そしてその細胞を効果的に増殖させる新しい足場（スキャホールド）が必要と考えた。

まず細胞供給のためには培養細胞シートを考えた。細胞をシート状にすることで大量の細胞を再生の場に移植維持することが可能で、同時に接着因子や細胞外マトリクスも移植されるため、組織の再構築に非常に有利になる。用いる細胞シートは移植後速やかに周囲の組織に接着するという性質を有するため、担体の表面に付着させることが可能である。そこで歯周組織再生のために、歯根には歯根膜細胞シート、歯槽骨には骨髓細胞シートが接するようにスキャホールド表面にそれぞれ付着させ、歯周組織欠損部に埋植することを考えた。この方法により歯槽骨のみならず歯周組織全体が再生すると考えられる。

次に足場のために、超多孔性β-TCPブロックとコラーゲンスポンジを複合させたスキャホールドを考えた。β-TCPは、破骨細胞による吸収が先行してから骨芽細胞による骨形成が生じるといったカップリングのプロセスが確認されており、β-TCPを足場とした骨リモデリングにより徐々に緻密な自家骨に置換されることが明らかとなっており、臨床における有用性が示されている。β-TCPは骨伝導能を有し、機械的強度に優れているが、一方、大量に用いると生体内での吸収が遅く、成長因子の付着が悪いといった欠点を有している。そこで本研究ではプレート状のβ-TCPブロックと凹型β-TCPブロックを作製し、その内部に線維芽細胞増殖因子（FGF2）を含浸させたコラーゲンスポンジを設置する。この新規作製スキャホールドは十分な機械的強度を有しつつ、吸収性が良く、また吸収に応じてFGFが徐放されるという特徴を有している。使用するコラーゲンスポンジは当教室が以前から研究を続けているFC-HACスポンジであり、スポンジ内には早期に血管新生が多く生じるといった特性が明らかになっている。

以上のように超多孔性β-TCPブロックとコラーゲンスポンジを一体化させたFGF徐放性新規スキャホールドに部位選択的に2種の培養細胞シートを設置することで大幅な歯周組織再生が期待できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は細胞シート工学的手法により作製した骨髓細胞シートと歯根膜細胞

シートの2種の細胞シートをスキャホールド外側に設置することで大量の細胞を部位選択的に供給する新しい歯周組織再生療法を開発することである。

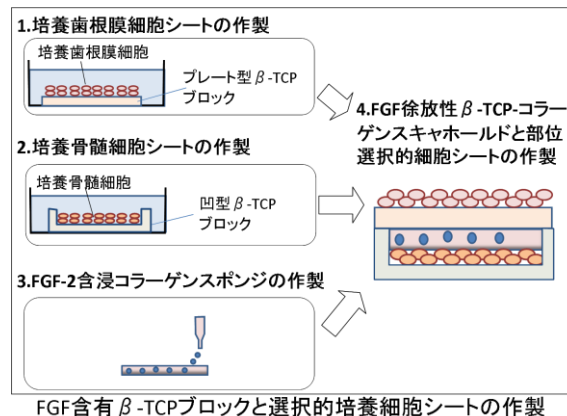
本研究では、超多孔性β-TCPブロックとコラーゲンスポンジを一体化させたFGF徐放性新規スキャホールドを培養細胞シートと併用することで大幅な歯周組織再生が期待できると考える。

このようなコンセプトの再生療法は国内外でもみられず、今までの研究成果を踏まえると歯周組織再生量を飛躍的に増加できる方法であると確信している。この治療法はどのような欠損形態の歯周組織欠損にも応用できることから臨床応用の場が極めて広い。また本研究での知見が生体材料工学、細胞シート工学にフィードバックされることで医療全般の発展にも貢献できると考えている。

3. 研究の方法

実験動物にはF344/Jc1雄性ラットを用いる。

(1) 培養骨髓/歯根膜細胞シートの作製



FGF含有β-TCPブロックと選択的培養細胞シートの作製

・骨髓細胞シート：ラットの大腿骨を摘出し、骨髓を採取。骨髓由来の付着性細胞を10%FBS、1%抗生物質添加MEMにて培養。その後ディッシュの凹型β-TCPブロック上に播種してさらに培養を行い、7、9、11日目に追加播種することで多層骨髓細胞シートを作製する。7日目に追加播種してからは培地を10%FBS、1%抗生物質添加MEMにアスコルビン酸、β-グリセロリン酸、デキサメタゾンを添加したものに变更。培養14日後にトリプシン-EDTAで処理しディッシュから剥離し細胞シートを完成させる。

・歯根膜細胞シート：ラットの歯牙を摘出し、歯根膜組織を採取。アウトグロース法および継代培養により得られた歯根膜細胞をプレート型β-TCPブロック上に播種し、培養。コンフルエントになった時点で追加播種し多層歯根膜細胞シートを作製。その後ディッシュから剥離し細胞シートを完成させる。

(2) FGF徐放性β-TCP-コラーゲンスキャホールドの作製

超多孔性β-TCPは気孔率約70%、気孔径は100~400μmとし、直径0.20mm小腔を無数に形成し、プレート型ブロックと凹型ブロック

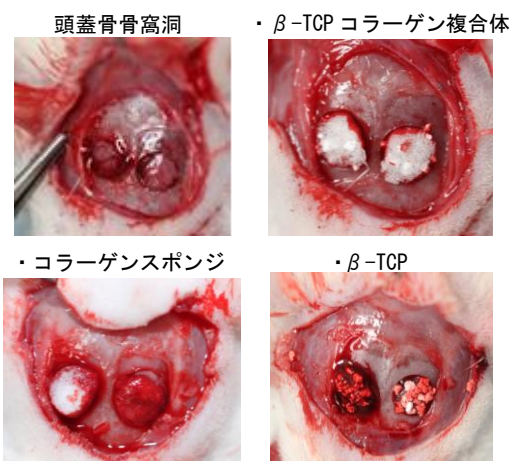
を組み合わせ、4×4×3mmに規格化する。このブロック内部にFGF(0, 3, 15 μg/個)を含浸させたFC-HACスポンジ(2×2×2mm)を填入し、β-TCP-コラーゲンスキャホールドとする。

(3) 試料作製及びラットへの埋植

培養細胞シート一体型β-TCP-コラーゲンスキャホールド(4×4×3mm)を歯牙から作製した象牙質片にナイロン糸にて両端を縫合し、固定する。全身および局所麻酔下でラット頭蓋部を切開し、頭蓋骨を露出させ、4×4×2mmの骨窩洞を形成後、試料を窩洞に接するように埋植する。

(4) 改良型β-TCP コラーゲン複合体スキャホールドの作製と埋植

さらに安定したスキャホールドとして、コラーゲンスポンジとβ-TCP小顆粒からなる複合体である改良型スキャホールドを作製する。直径5×1mmに規格化したβ-TCPコラーゲン複合体スキャホールドにFGFを含浸させたものを直径5mmのラット頭蓋骨骨窩洞形成部に対照のコラーゲンスポンジあるいはβ-TCP顆粒とともに埋植する。(下図)



(5) 評価方法

観察期間は2, 8週とし、脱灰薄切標本作製し、ヘマトキシリン-エオジン重染色を行い、組織学的計測を行う。計測項目は、炎症性細胞浸潤面積、新生骨面積、新生セメント質長さ、残存β-TCP面積等とする。また骨マーカーであるALP等の免疫染色を同時に行い、骨形成に関する細胞動態を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 培養骨髄/歯根膜細胞シートについて

本研究でβ-TCPブロックは細胞培養の良好な足場になるため、凹型ブロック上に骨髄細胞を、プレート型ブロック上に歯根膜細胞を直接播種し、ブロック上で培養させる方法について検討を行ったところ、培養骨髄細胞シートについては多層構造が観察され、ALP酵素組織を用いた評価では骨芽細胞への分化が確認されたため、β-TCPブロック上にて骨再生のための有効な細胞シートの作製が可能となったと言える。培養期間は14日間が最適であり、さらに延長した場合には細胞

の成長が阻害された。このことから、適切な培養期間を解明することが可能となった。

一方、培養歯根膜細胞シートについてはSEM所見ではブロック上に細胞が観察され、シート作製が可能な場合もあったことから効果的な方法と考えられたが、その性状は脆く安定した供給には至らなかった。骨髄細胞に比べて歯根膜細胞は絶対数が少なく発育に時間がかかることは予想されたが、全く成長しないことがしばしば認められ、本方法においても十分な細胞供給が行えない可能性が示唆された。

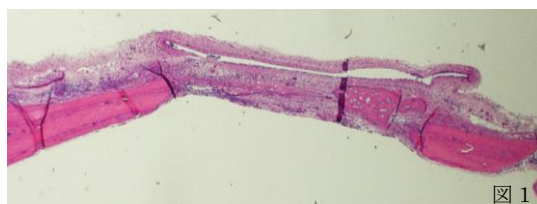
(2) 培養細胞シート一体型β-TCP-コラーゲンスキャホールドの有効性について

プレート型ブロックと凹型ブロックを組み合わせ、内部にFGFを含浸させたFC-HACスポンジを填入したβ-TCP-コラーゲンスキャホールド上に培養骨髄細胞シートを設置したものをラット頭蓋骨骨窩洞形成部に埋植し、骨増生効果について組織学的評価を行った。その結果、8週後のヘマトキシリン-エオジン重染色ではβ-TCPブロック単体を埋植させた際と比較して骨増生に有意差は認められなかった。また、β-TCP-コラーゲンスキャホールドの多くが2週までの初期段階に崩壊し、形状を留めていないものが認められた。これらの結果から、今回用いたプレート型と凹型ブロックおよびコラーゲンスポンジの組み合わせ型スキャホールドでは安定が得られず不十分であり、改良が必要と考えられた。

(3) β-TCP コラーゲン複合体スキャホールドを用いた際の骨増生について

安定したスキャホールドとして新たに作製した改良型β-TCPコラーゲン複合体スキャホールドをラット頭蓋骨骨窩洞形成部に埋植したところ良好な操作性を示し窩洞部に留置することが可能であった。

β-TCPコラーゲン複合体スキャホールドをラット頭蓋骨骨窩洞形成部に埋植し、骨増生効果について組織学的評価を行った。その結果、8週間後のヘマトキシリン-エオジン重染色ではコラーゲンスポンジあるいはβ-TCPを埋植させたものと比べて明らかに多くの骨増生が認められ、成熟骨組織に置換されているのが確認された。またFGFを併用することでより多くの骨増生が生じた(図1)。



一方、コラーゲンスポンジを埋入した欠損内は薄い線維様組織のみが確認され、コラーゲンはほぼ消失していた(図2)。β-TCPのみを埋入した欠損内には顆粒が残存しているものが多く認められた(図3)。



図 2

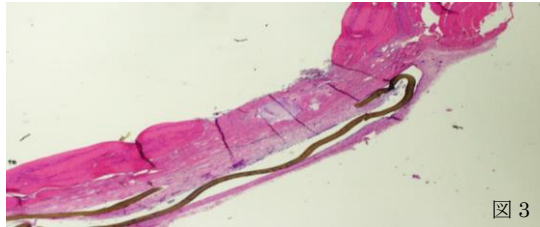


図 3

このことから、 β -TCP コラーゲン複合体スキャホールドの有効性と成長因子 FGF を併用により効果的な骨再生療法となることが示唆された。今後は骨髄/歯根膜細胞を β -TCP コラーゲン複合体スキャホールドとともに共培養した際の評価と培養細胞シートを併用して埋植した場合の骨増生について検討が必要である。

本研究期間においては適切な培養骨髄細胞シートの作製方法確立および β -TCP コラーゲン複合体スキャホールドの有効性と成長因子 FGF を併用させた際のラットにおける骨増生効果を確認することができた。これらのコンセプトは特別な装置や器具は必要とせず、あらゆるスキャホールドに応用可能であり、適切なスキャホールドと組み合わせるとこにより更に効果的な再生療法となると考えられる。

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 0 件)

[その他]

北海道大学大学院歯学研究科
歯周・歯内療法学教室ホームページ
<http://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/perio.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹生 寛恵 (TAKEFU Hiroe)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：40609103

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし