

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 18 日現在

機関番号：32404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670894

研究課題名(和文)新規不織布フィルターを用いた顎骨骨髓由来間葉系幹細胞による再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of regeneration therapy by mesenchymal stem cell from gnathic bone marrow using novel nonwoven fabric filter

研究代表者

林 丈一郎 (Hayashi, Joichiro)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：50337507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、間葉系幹細胞に親和性が高い不織布フィルターを組み込んだ閉鎖系デバイスが、顎骨からの骨髓間葉系幹細胞の分離において、有用であるか否かを評価することである。44検体の顎骨骨髓液を、インプラント埋入手術時に患者35人から採取した。回収した細胞は、細胞培養用シャーレに播種した。また、コントロールとして、本デバイスを用いず、遠心分離して上清を除き、細胞を直接シャーレに播種した。その結果、本デバイスを用いたところ、30検体中10検体(33.3%)からコロニー形成が認められた。一方、コントロールでコロニー形成が確認されたのは、14検体中3検体(21.4%)であった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate the usefulness of a device with a nonwoven fabric filter, which selectively traps MSC based on affinity, for isolation of MSC from gnathic bone marrow. A total of 44 bone marrow aspirates were obtained from 35 patients during surgery for dental implant placement. The isolated cells were then seeded on tissue culture dishes. As a control, without using the device, the cells harvested by centrifugation were directly seeded on the dishes. As a result, colony forming cells by using the device were detected in 10 of 30 samples (33.3%). The colony forming cells without using the device were obtained in 3 of 14 samples (21.4%). It was thus suggested that the use of the device with a nonwoven fabric filter may allow efficient isolation of MSC from gnathic bone marrow in a closed system.

研究分野：歯周病学

キーワード：間葉系細胞 顎骨 不織布フィルター 再生療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周治療においては、組織再生誘導法やエナメルマトリックスタンパク質を用いた歯周組織再生療法を行うことにより、歯周病によって失われた組織の再生が可能となってきた。また、インプラント治療では、遮蔽膜や移植骨を用いた歯槽堤の増大手術も行われるようになってきている。しかしながら、これらの再生療法の適応範囲は狭く、長い治療期間を要し、限られた効果しか期待できない。また、用いられる材料の中には、異種由来のものや他家由来のものもあり、それらを用いた場合、牛海綿状脳症や未知の感染症に罹患するリスクを完全に排除することはできない。

(2) 近年、歯周治療およびインプラント治療における組織再生を目的として、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) を用いた再生療法が検討されている。この治療法は、患者の腸骨骨髓液から MSC を分離し、体外で培養した後に移植するもので、必要とされる組織を効果的に再生させることが期待されている。また、患者自身の細胞を用いることから、ウイルス等の感染や拒絶反応のリスクがなく、倫理的な問題も回避できるという利点を有している。しかしながら、培養のために専用の培養室など大きな設備を必要とすることや、骨髓液を腸骨から採取することなどにより、限られた施設でしか実施することができないという難点がある。

(3) MSC の供給源として、これまで主に腸骨骨髓が利用されてきた。腸骨骨髓からは大量の MSC を回収することが可能であるが、外科的な侵襲が大きいという欠点がある。歯髓組織あるいは歯根膜組織も MSC の供給源として検討されているが、歯を抜去しなければならず、回収できる細胞数が少ないという欠点がある。それに対し顎骨の骨髓は、薄い口腔粘膜直下に存在していることから、外科的にアクセスするのは容易であり、腸骨と比較して外科的な侵襲が小さく、骨髓液採取に伴発する疼痛などの不快症状の発生頻度も低いことが予想される。また、抜歯時、歯周外科手術時、あるいは歯科用インプラント埋入時等、直接的に骨髓にアクセスできる機会も多い。しかしながら、これまで顎骨から MSC の分離を試みた研究は少ない。

(4) 最近、骨髓液から MSC リッチ画分を、簡便かつ安全に、そして効率的に分離できる間葉系幹細胞分離デバイスが開発された。このデバイスは、MSC に親和性が高いレーヨンおよびポリエチレンより合成された不織布フィルターを用いたもので、少量の骨髓液から MSC を短時間で効率よく分離することができる。したがって、本デバイスを用いることにより、顎骨から採取できる少量の骨髓液から MSC を分離できる可能

性がある。また、本デバイスは、通常の遠心分離器を用いる方法とは異なり、閉鎖系で MSC を分離することができることから、微生物などが混入する危険性が低いという利点も有している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、間葉系幹細胞分離デバイスを用いた歯周組織再生療法およびインプラント埋入時の歯槽堤増大法を新たに開発することを前提として、顎骨骨髓からの MSC 分離における本デバイスの有用性を評価し、顎骨から安全かつ簡便に MSC を分離・培養できる方法を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 明海大学歯学部附属明海大学病院歯周病科に来院し、インプラント治療を行った患者 35 人を被験者とし、合計 44 検体を採取した。被験者の平均年齢は 56.1 ± 12.6 歳で、男性 12 人、女性 23 人であった。本研究は、明海大学歯学部倫理委員会の承認 (A0904) のもと、被験者には十分に研究の説明を行った後、同意書を得て行った。

(2) 顎骨からの骨髓液は、骨髓穿刺針または注射針を用いて採取した。骨髓穿刺針を用いる方法では、骨面に起始点を形成した後に、骨髓穿刺針 (SIL-181, タスク, 栃木) を用いて皮質骨を穿孔した。骨髓穿刺針は中空の外筒と中空部分を封鎖する内筒で構成されており、穿刺し先端部分が骨髓に到達した後に内筒を抜き取ることにより、針の中に骨が目詰まりすることなく骨髓液を採取できる。内筒除去後、2.5 ml のシリンジ (ss-02Sz, テルモ, 東京) を装着し、陰圧にて骨髓液を採取した。注射針を用いる方法では、注水下にてインプラント埋入窩形成用のドリル一式 (Zimmer Dental, Carlsbad, CA, USA) を用いて埋入窩を形成した後に、滲出してきた骨髓液を 2.5 ml のシリンジを装着した 18 ゲージの注射針 (NN-1838R, テルモ) を用いて採取した。ヘパリンナトリウム (100 IU/ml, 田辺三菱製薬, 大阪)、その後、ペニシリン (200 IU/ml, Gibco BRL, Rockville, MD, USA)、ストレプトマイシン (0.2 mg/ml, Gibco BRL)、およびアンフォテリシン B (500 ng/ml, Gibco BRL) を添加した滅菌生理食塩水 1 ml に、採取した骨髓液を注入し、転倒混和後、4 ℃ にて保存した。

(3) MSC 分離には、間葉系幹細胞分離デバイス (株式会社カネカ, 大阪) を用いた。まず、滅菌生理食塩液を通液してカラムのプライミングをした後、生理食塩液にて希釈した検体を、デバイスに通液した。次に滅菌生理食塩液を骨髓液と同じ方向に通液し、フィルターに付着していない赤血球等を洗い流した後、逆方向から細胞培養培地 50 ml を注入することにより、フィルターに付着した細胞を

回収用バッグに回収した。細胞培養培地には、10%ウシ胎仔血清（和光純薬工業，大阪）含有 minimum essential medium（Gibco BRL）培地を用いた。また，デバイスへの通液は，すべて一定の流速（6 ml/min）で行った。回収した細胞は，直径 10 cm の培養用シャーレ（BD Bioscience, San Jose, CA, USA）に播種し，37.5% CO₂ 下で培養を行った。2 日から 4 日おきに各シャーレの培地を交換し，浮遊細胞を除去した。そして，培養 14 日後に顕微鏡観察にてコロニー形成の有無を観察した。また，コントロールとして，全骨髄播種法により MSC を分離した。全骨髄播種法では，デバイスを用いず，検体を 500 X g にて 5 分間遠心分離して上清を除き，骨髄細胞を細胞培養液に懸濁後シャーレに播種した。細胞播種密度は，デバイスを用いた方法と全骨髄播種法ともに，0.026 ml 骨髄液/cm² とした。

(4) コロニーを形成した細胞の一部は，間葉系幹細胞のポジティブマーカーである CD73, CD90, および CD105, ネガティブマーカーである CD14, CD19, CD34, CD45, および HLA-DR の発現について検討した。シャーレに付着した細胞をトリプシン様酵素（TrypLETM Select, Gibco BRL）を用いて回収し，single cell suspension とした細胞（1 X 10⁵ cells/0.5 ml 生理食塩水）を，室温で 30 分間 FITC 標識マウス抗ヒト CD73（希釈倍率 1:50）, CD90（希釈倍率 1:100）, CD105（希釈倍率 1:100）, CD14（希釈倍率 1:50）, CD19（希釈倍率 1:50）, CD34（希釈倍率 1:500）, CD45（希釈倍率 1:50）, および HLA-DR（希釈倍率 1:50）モノクローナル抗体（BD Bioscience）と反応させた後，FACS Calibur（BD Bioscience）を用いたフローサイトメトリー法により表面抗原を検出した。

(5) コロニー形成検体率の統計学的比較は，Fisher の直接確率計算法を用いた。また，各要因がコロニー形成の有無に及ぼす影響は，ロジスティック回帰分析により検討した。各統計処理には統計処理ソフト IBM SPSS statistics 20（日本アイ・ピー・エム，東京）を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 顎骨骨髄液から間葉系幹細胞分離デバイスまたは遠心分離機を用いて処理後，培養用シャーレに形成されたコロニーを顕微鏡下にて観察した。コロニーを形成していた細胞は，MSC の特徴である線維芽細胞様形態を呈していた。

(2) コロニーを形成した 13 検体のうち 8 検体については細胞表面抗原の分析を行った。間葉系幹細胞のポジティブマーカーである CD105 は，すべての検体において陽性率は 95% 以上であった。ネガティブマーカーであ

る CD34 および CD45 は，すべての検体において陽性率は 2% 以下であった。さらに，1 検体については，ポジティブマーカーとして CD73, CD90, CD105 を検索したところ，いずれも 99% 以上の陽性率を示し，ネガティブマーカーである CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR は，いずれも陽性率 1% 未満であった。

(3) 間葉系幹細胞分離デバイスを用いて MSC の分離を試みたところ，30 検体中 10 検体（33.3%）の検体からコロニー形成細胞がみられた。一方，間葉系幹細胞分離デバイスを用いず，全骨髄播種法によりコロニー形成が確認されたのは，14 検体中 3 検体（21.4%）であった。コロニー形成検体率は，デバイスを用いた方が高い傾向がみられたが，統計学的に有意な差ではなかった。また，コロニー形成がみられた 13 検体のうち，コロニー数が 1 個のものが 6 検体，2 個のものが 5 検体，4 個のものが 1 検体，そして 10 個のものが 1 検体であった。

(4) 間葉系幹細胞分離デバイスを用いて分離した検体において，骨髄液を採取する際に骨髄穿刺針を用いた方法では，15 検体中 6 検体（40.0%）においてコロニー形成が確認されたのに対し，注射針を用いた方法では 15 検体中 4 検体（26.7%）であった。また，全骨髄播種法により分離した検体においては，骨髄穿刺針を用いた方法では 7 検体中 2 検体の 28.6%，注射針を用いた方法では 7 検体中 1 検体の 14.3% であった。いずれの分離方法においても，注射針を用いる方法よりも，穿刺針を用いる方がコロニーを形成する検体の割合が高い傾向がみられたが，統計学的有意差はみられなかった。

(5) 男性と女性に分けて比較したところ，コロニー形成検体率は，デバイスを用いた場合には男性で 36.4%，女性では 31.6%，全骨髄播種法を用いた場合では，男性で 25.0%，女性で 20.0% であり，いずれの方法においても統計学的に有意な差はみられなかったものの，コロニー形成検体率はデバイスの使用の有無に関わらず，わずかであるが女性の方が低かった。

(6) 年代別に分けてみたところ，デバイスを用いた場合には 50 歳代では 11 検体中 4 検体で 36.4%，60 歳代では 13 検体中 6 検体で 46.2% の検体からコロニー形成細胞が分離されたが，20 歳代，30 歳代，40 歳代，および 70 歳代では検体数が少ないものの，1 検体も分離されなかった。デバイスを用いなかった場合では，60 歳代で 8 検体中 3 検体からコロニー形成細胞が分離されたが，40 歳代の 1 検体，50 歳代の 5 検体からは分離されなかった。

(7) 採取した部位を上顎と下顎で分けてみ

たところ、デバイスを用いた場合には上顎と下顎はともにコロニー形成検体率は 33.3%であった。全骨髄播種法の場合では、上顎では 1 検体もコロニー形成が認められず、下顎では 27.2%から分離されたが、有意な差はみられなかった。

(8) 採取部位を前歯部、小臼歯部、および大臼歯部に分けて比較したところ、デバイスを用いた場合には、コロニー形成検体率は小臼歯部で最も高く 60.0%、前歯部では 40.0%、大臼歯部では 25.0%であった。デバイスを用いなかった場合においても、コロニー形成検体率は小臼歯部で最も高く 40.0%、前歯部では 0.0%、大臼歯部では 14.3%であった。いずれの分離方法でも小臼歯でコロニー形成検体率が高い傾向がみられたが、統計学的に有意な差ではなかった。

(9) 骨髄液採取量で分類したところ、デバイスを用いた場合には 151~200 μ l で 12 検体中 5 検体の 41.7%と最もコロニー形成検体率が高く、201~300 μ l で 33.3%、300 μ l 以上では 28.6%と、骨髄液採取量が多いほど、コロニー形成率が高いという傾向は見られなかった。全骨髄播種法を用いた場合では、300 μ l 以上で最もコロニー形成検体率が高い傾向がみられたが 2 検体中 1 検体と検体数が少ないため、統計学的に有意な差はみられなかった。

(10) 各要因がコロニー形成に及ぼす影響をロジスティック回帰分析により検索したところ、いずれの要因も有意差はみられなかったが、オッズ比では、小臼歯から採取した場合が 6.809 と最も高く、次にデバイスを用いる場合が 4.090 と高い傾向がみられた。

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 9 件)

Onishi H, Ro M, Suzuki T, Ishii M, Otsuka H, Yatabe K, Hayashi J, Tatsumi J, Shin K. Lysine-specific proteolytic activity responsible for forsythia detaching factor modification. Archives of Oral Biology, 査読有, 71, 24-30, 2016
DOI: 10.1016/j.archoralbio.2016.06.022.

林 丈一朗. 歯周炎患者に対してインプラント外科手術時に隣在する天然歯のハード&ソフトティッシュマネジメントを行った一症例. 日本歯周病学会会誌, 査読有, 58, 117-124, 2016.
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/perio/-char/ja>

Joichi ro Hayashi, Ki tetsu Shin, Henry H.

Takei. Minimally Invasive Surgical Approaches for Esthetic Implant Dentistry: A Case Report. Journal of Oral Implantology, 査読有, 42, 93-97.
DOI: 10.1563/aaid-joi-D-14-00065

林 丈一朗, 難波 智美, 上 佳弘, 岩田 卓也, 安井 絢子, 葛山 賢司, 石井 麻紀子, 大西 英知, 辰巳 順一, 申 基喆. 歯周炎患者に対するインプラント治療の治療成績に関する後ろ向き研究 - インプラント周囲軟組織の状態が予後に及ぼす影響について - . 明海歯科医学, 査読有, 44, 208-216.
<http://www.dent.meikai.ac.jp/media/>

林 丈一朗, 吉田 進也, 落合 幸彦, 安井 絢子, 新家 央康, 石井 麻紀子, 大西 英知, 櫻井 裕士, 申 基喆. 不織布フィルターを用いた閉鎖系デバイスによる顎骨骨髄からの間葉系幹細胞分離に関する研究. 明海歯科医学, 査読有, 44, 17-26.
<http://www.dent.meikai.ac.jp/media/>

[学会発表](計 21 件)

林 丈一朗, 谷田部 一大, 申 基喆. 審美領域における低侵襲な臨床的歯冠長延長術. 第 23 回日本歯科医学会総会, 2016 年 10 月 21-23 日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市).

林 丈一朗. 歯周病患者に対するインプラント治療の問題点とその対応. 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会(招待講演), 2016 年 10 月 7-8 日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市).

Joichiro HAYASHI, Ayako YASUI, Shinya YOSHIDA, Hidetomo ONISHI, Kazuhiro YATABE, Junichi TATSUMI, Hiroshi SAKURAI, Kitetsu SHIN. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Gnathic Bone Marrow by Closed System Device Using Nonwoven Fabric Filter. EuroPerio 8, 2015 年 6 月 6-8 日, London (UK).

林 丈一朗, 吉田 進也, 落合 幸彦, 林 鋼兵, 寺西 麻里奈, 谷田部 一大, 辰巳 順一, 櫻井 裕士, 申 基喆. 不織布フィルターを用いた閉鎖系システムによる顎骨骨髄からの間葉系幹細胞分離. 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会. 2014 年 5 月 22-24 日, 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市).

林 丈一朗. 歯周病患者へのインプラント治療-4つの問題点とその解決法-. 第 31 回日本顎咬合学会学術大会(招待講演). 2014 年 6 月 14-15 日, 東京国際フォーラム(東京都千代田区).

[図書](計 2 件)

林 丈一朗(分担)「iPS細胞」IN: Implant

Dentistry Encyclopedia , クインテッセンス
出版 , 2014 , 146 .

林 丈一朗 (分担) , 「 歯間乳頭の再生 」 IN:
Implant Dentistry Encyclopedia , クインテ
ッセンス出版 , 2014 , 198 .

〔 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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

林 丈一朗 (HAYASHI , Joichiro)
明海大学 ・ 歯学部 ・ 准教授
研究者番号 : 50337507

(2) 研究分担者

友村 明人 (TOMOMURA , Akito)
明海大学 ・ 歯学部 ・ 教授
研究者番号 : 60188810

申 基てつ (SHIN , Kitetsu)
明海大学 ・ 歯学部 ・ 教授
研究者番号 : 40187555

辰巳 順一 (Tatsumi , Junichi)
明海大学 ・ 歯学部 ・ 准教授
研究者番号 : 40187555

谷田部 一大 (YATABE , Kazuhiro)
明海大学 ・ 歯学部 ・ 講師
研究者番号 : 00526551

大西 英知 (ONISHI , Hidetomo)
明海大学 ・ 歯学部 ・ 助教
研究者番号 : 30580279

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :

(4) 研究協力者
()