

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：32710
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592200
 研究課題名（和文）臍帯由来間葉系細胞を用いた組織工学的歯周組織再生材料の開発と臨床研究への橋渡し
 研究課題名（英文）Development of a tissue-engineering periodontal tissue-reproducing material using umbilical cord-derived mesenchymal cells and the association with clinical research
 研究代表者
 金指 幹元（KANAZASHI MIKIMOTO）
 鶴見大学・歯学部・講師
 研究者番号：80339811

研究成果の概要（和文）：

ヒト臍帯動・静脈周囲に存在する臍帯由来間葉系細胞（以下細胞）は低侵襲で間葉系細胞を得る事ができ、新たな再生医療への応用が期待されている。本研究では細胞中より組織再生に必要な不可欠である pericyte 集団を分離・培養し、その基本特性の解析、さらに石灰化誘導を確認することで組織工学的再生療法開発への可能性を検討した。

CD146 陽性細胞は、骨芽細胞分化誘導試薬では石灰化作用を受けなかった。さらに、その細胞集団の中に Muse 細胞も認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

The umbilical cord-derived mesenchymal cells (hereinafter, cells) present in the vicinity of the artery and veins of the umbilical cord in humans is capable of obtaining mesenchymal cells in a low-invasive manner, and the application of such cells in the field of regenerative medicine is therefore now eagerly anticipated. In this research, the pericyte group, which is essential to tissue reproduction, was separated from the cells and then was cultured. The possibility of developing a new type of tissue engineering reproduction therapy was investigated by analyzing the basic characteristics thereof and then checking for the induction of calcification.

CD146-positive cells did not calcify via the administration of osteoblast differentiation-inducing drugs. Furthermore, no Muse cells were observed in the obtained cell population.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：移植・再生医療、再生医学、細胞・組織、生理活性、歯学、歯周組織再生材料
臍帯由来間葉系細胞、BMP-2

1. 研究開始当初の背景

歯周病は日本国民の成人約80%が罹患する、いわゆる「国民病」であり、歯を喪失する原因の約半数を占め、生活習慣病のひとつでもある。一般的な歯周病の治療は、歯周ポケットにある歯周病原菌を取り除き、歯肉の炎症を抑えることで、歯槽骨が溶けて無くなるのを防ぐ。また、その後に感染組織を外科的に除去・切除することにより、歯槽骨の無くなった歯肉はやせ、歯の根の部分が露出してしまい、審美障害が残る。さらに、その治療も本来の状態に完全に返ることはなく、再発を起しやすいためという難治性がある。

歯周組織再生を達成し、本来の状態に限りなく近づけるためには、軟組織、硬組織が混在する歯周組織を“1つの機能単位”として再生させる必要がある。現在、臨床応用されている歯周組織再生療法はGTR法、エナメルタンパク質(EMD)を用いる方法がある。これらの方法はいずれも溶けてしまった歯槽骨を再生し、歯周組織をある程度再生させることが可能であるが、手術がとても難しく、術後感染が起きやすく、薬剤に動物(ブタ)由来の原材料を用いており未知感染のおそれがある(EMD)、組織再生までに時間(6~8ヶ月)がかかるといった問題点がある。

再生医療や細胞治療における我が国の細胞培養・操作技術は、基礎科学分野において国際的な競争力を保持しており、基礎研究や臨床研究においても多くの臨床実績と有効性が認められている。研究代表者は、2005年3月より1年間 Institute of Biomedical & Biomedical Engineering (Bone Interface Group), Faculty of Dentistry, University of Toronto (Chief & Chair Professor John E Davies) に留学し、ヒト臍帯動・静脈周囲に存在する間葉系細胞 Human Umbilical Cord PeriVascular (HUCPV) cells (Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors, Stem Cells, 23:220-229, 2005) について、その分離、培養および凍結保存に関する研究に従事した。臍帯由来間葉系細胞は、その採取に際してドナーへの侵襲がなく、ウイルス感染の危険性や抗原性が少ない可能性が示唆され、新たな細胞ソースとして注目されている。

研究代表者はこれまでに、科学研究費補助金、平成19年度：若手研究(B)「ヒトさい帯由来幹細胞を用いた歯周組織再生療法に関する集約的研究」の交付をうけ以下の結果を得ている。平成19年度は、トロント大学で研究代表者が自ら臍帯より分離、培養し凍結保

存した臍帯由来間葉系幹細胞を2検体、すなわち生理活性物質で未刺激の初代細胞1検体ならびに骨分化誘導培地で分化誘導した3継代めの細胞1検体を用いた。分子生物学的な解析からHUCPVsは、Oct3/4の遺伝子発現が認められ未分化状態を維持すること、また細胞表面マーカーを解析したところ幹細胞マーカーの一つであるCD44の発現を確認した。さらに、骨分化誘導試薬(50 μ g/mL ascorbic acid, 10M/L β -glycerophosphate, 10⁻⁸M/L dexamethasone)を添加して培養することでRT-PCRでI型コラーゲンならびにオステオカルシンの遺伝子発現を確認した。また、鶴見大学歯学部倫理審査委員会の承認のもと連携医療機関より臍帯をGMPに準拠し開設された歯学部附属細胞培養室(cell Processing Center:CPC)に受け入れる体系を構築した。20年度より連携医療機関で書面にて同意の得られた被験者から3検体臍帯の提供を受け、増殖率、蓄積分裂回数を10継代まで求めた。増殖速度は2~4継代で高く、最大で11倍であった。3ヶ月以上の長期培養を行ったが、全ての検体で細胞老化を認め、異常増殖は認められなかった。

また初代細胞を骨分化誘導試薬添加培地で培養し、RT-PCRにてI型コラーゲンならびにオステオカルシンの遺伝子発現を確認した。さらにアリザリン染色により濃染を認めたことから、本研究で用いた細胞は骨形成能を有することを明らかにした。

2. 研究の目的

ヒト臍帯動・静脈周囲に存在する未分化間葉系細胞を用いた次世代の組織工学的歯周組織再生材料を開発するための基礎データを得ることである。

3. 研究の方法

本研究は、鶴見大学歯学部倫理審査委員会の審査と承認(第510号)のもと、連携医療機関(産婦人科)に通院中の妊婦様に本研究の趣旨を十分説明し、書面にて同意の得られた対象者より臍帯の提供を受けた。また本学にて矯正治療あるいはその他の理由で抜歯を受ける患者様から同様に抜去歯の提供を受け行った。

(1) 細胞

効率的に組織を再生させるには、再生部位での血管新生・構築が必須である。一般的に血管新生は内皮細胞とPericyteによって構築されている細小血管から、pericyteが離脱することで開始される。そこで我々はこのpericyteに注目し、臍帯からより多くの

pericyte集団を得るため、以下に示す3つの方法で細胞を分離した。

①Sarugaser (Stem Cells, 23:220-229, 2005)、金指 (日保存誌 53(1):25~32, 2010)らの方法に従い、まず得られた臍帯を5~6cmに細切し、外膜を取り除いた。続いてWharton's jelly層より臍帯動脈および静脈を摘出しCollagenase Type Iを用いて37℃で18~24時間酵素消化し細胞成分を分離する方法(以下normal explant)。

② ①のコラゲナーゼ処理後の臍帯動・静脈をそのままカルチャーフラスコに静置し、outgrowthした細胞を得る方法(以下vessel explant)。

③ 臍帯を外膜など取り除くことなく可能な限り細切し、Collagenase Type Iを用いて37℃で18~24時間酵素消化し細胞成分を分離する方法(以下full explant)。

初代細胞は15% FBS含有 α -MEM中に懸濁し、T-75フラスコに播種し37℃、5% CO₂条件下で培養を開始し、3~4継代細胞についてpericyteのマーカールといわれるCD146、さらに間葉系細胞のマーカールといわれる、CD44、CD90、CD105、CD271、STRO-1、血球系マーカールであるCD34、CD45について、FITCあるいはPE標識モノクローナル抗体を用いたシングルカラー染色を行い、FCMにて各抗体の発現解析を行った。

また、歯周組織再生に有効な細胞群としてすでに臨床応用されている骨髄由来間葉系細胞(Lonza社)そして矯正治療などの抜去歯から歯根膜細胞、歯髓細胞、歯肉細胞をコントロールの細胞として用いた。

さらに上述の3~4継代細胞についてpericyteのマーカールであるCD146陽性細胞を得るためミルテニーバイオテク株式会社細胞分離カラムおよび標識抗体を用いて陽性細胞、陰性細胞に分けた。

(2) 生理活性物質による分化誘導および細胞内シグナル伝達解析

生理活性であるBMP-2 (100ng/mL)、FGF-2 (10ng/mL) および硬組織誘導培地(デキサメタゾン、 β グリセロリンサン、アスコルビン酸)で1、2、4週間分化誘導を行い形成されるNoduleをアリザリン染色することで硬組織形成能をスクリーニング評価した。そして骨分化形成能をもつ細胞についてCol11、BSP1、Cbfa1、OC、ALP、CD146の遺伝子発現をRT-PCR法で調べた。

(3) 足場材料

細胞を保持する足場(Scaffold)として臨

床研究で用いているゼラチンハイドロゲルを予定し、 β TCPで機械的強度を増加させたものを京都大学再生医科学研究所田畑泰彦教授より供与を受けた。

(4) その他

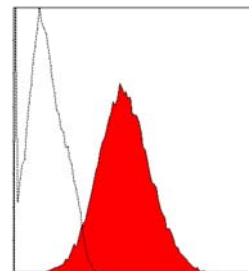
一般に間葉系幹細胞は接着性の細胞として生体各組織から採取するので、単一の細胞種ではなく複数の種類の細胞から構成される。近年、ヒト間葉系組織、間葉系培養細胞において多分化能を有するが腫瘍性を持たないMuse(Multilineage - differentiating stress enduring)細胞が報告された。

本研究の最終年は、各細胞群中のMuse細胞の有無、形成率を調べた。

4. 研究成果

CD146の発現は、上記方法(1)②vessel explantにおいて他の2つの方法より多く発現する傾向を示した(図1)。

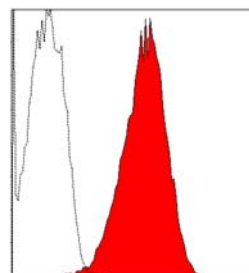
図1
細胞分離の方法によるCD146発現の違い



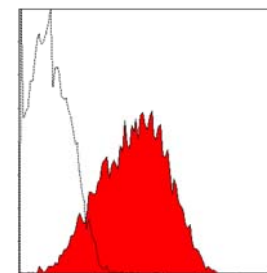
上記(1)①の方法



使用した臍帯の一例



上記(1)②の方法



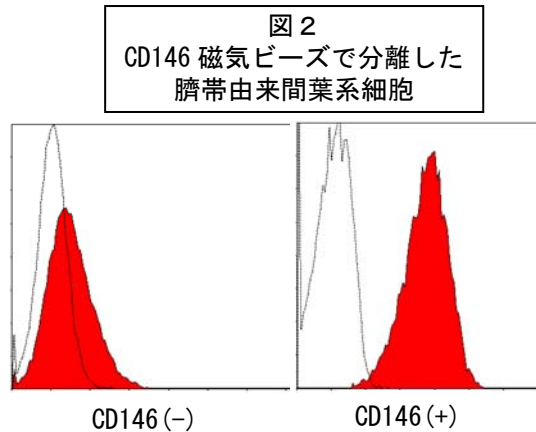
上記(1)③の方法



(1)②の方法で得られる細胞

その他の遺伝子発現は(1)①~③のすべての群において、CD44、CD90、CD105陽性、CD34、CD45、CD271、STRO-1は陰性であり、差は認められなかった。

(1)②の方法で得られた初代細胞を通法どおり培養し3~4継代した後、ミルテニーバイオテック株式会社細胞分離カラムおよび標識抗体を用いてCD146陽性細胞、陰性細胞に分けた(図2)。



このようにして得たCD146細胞すなわちPericyte集団を数種類の生理活性物質で骨芽細胞へ分化誘導を試みた。研究分担者がマウス骨髄細胞にて骨分化誘導を確認したBMP-2(コアフロント株式会社)(100ng/mL)、FGF-2(R&D systems)(10ng/mL)さらに連携研究者が使用している骨分化誘導試薬(50μg/mLアスコルビン酸、10M/Lβ-グリセロリン酸、10⁻⁸M/Lデキサメタゾン)を用い、CD146陽性臍帯由来間葉系細胞を24well plate上に1.0x10⁴に調整後、1、2および4週間培養を行った。

コントロールの細胞として、骨髄由来細胞(Lonza社)、歯根膜細胞、歯髄細胞、歯肉細胞を用いた。石灰化の状態は、アリザリン染色でNodule(石灰化結節)を観察することで確認した。

その結果、骨髄細胞、歯根膜細胞、歯髄細胞は4週間の培養期間でアリザリン陽性を示したが、CD146陽性臍帯由来間葉系細胞は陽性を示す検体は認められなかった(ストック細胞も含め7検体)(図3)。

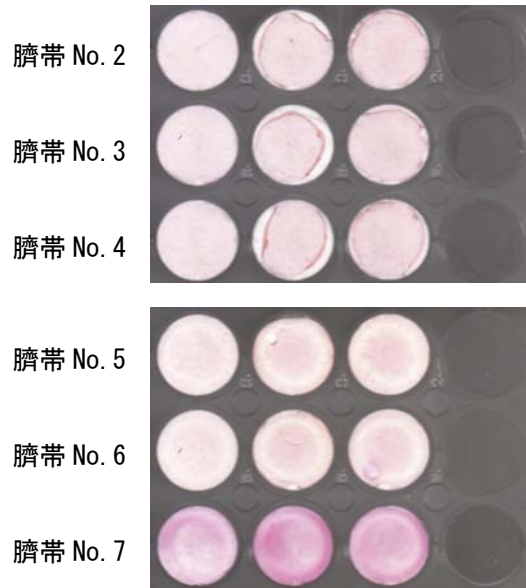
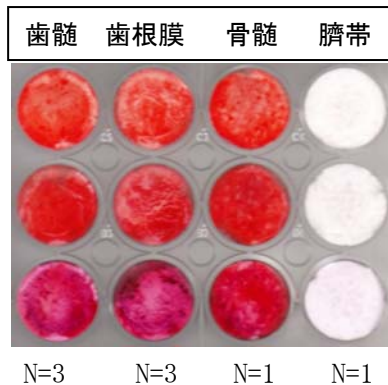
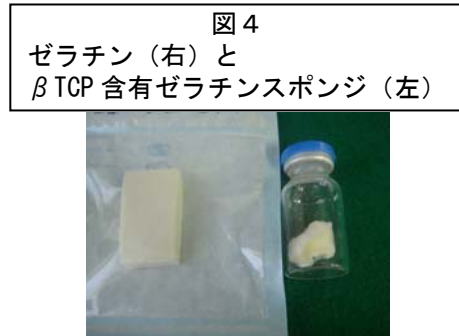


図3
歯髄、歯根膜、骨髄細胞に比べ、CD146陽性臍帯由来間葉系細胞は用いた7検体ともにアリザリン陽性の検体は認められなかった。

2011年3月11日の東日本大震災により発生した停電により、冷凍庫、冷蔵庫などの電化製品が使用出来ず、分子生物学的解析に用いる試薬、その他多くの要冷蔵、要冷凍の試薬類、特に培養中の細胞は全滅した。このため細胞だけでなく、新たに分析試薬類を得なければならず、計画が遅れてしまった。この遅れを取り戻すため、最終年度は歯根膜細胞、歯髄細胞を新たに分離培養し、臍帯由来細胞は液体窒素にストックしてあったマスター細胞を用い、同様の実験を繰り返したが、震災前と同じ結果しか得られなかった。

足場材料の選択は現在臨床研究で有効性が示されている、ゼラチンハイドロゲルに着目した。京都大学再生医科学研究所田畑泰彦教授より供与されたゼラチンはブタ皮膚由来であり、そのままでは機械的強度が不足するため、βTCPを用いてスポンジ状に加工したものを準備した(図4)。

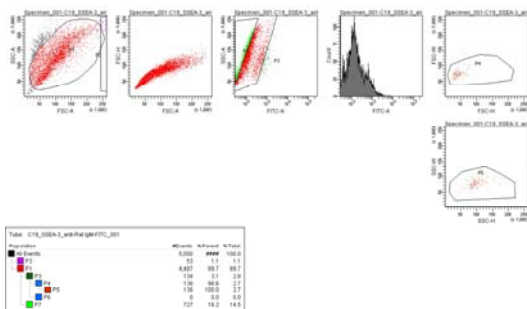


上記の通り石灰化誘導試薬でCD146 陽性臍帯由来間葉系細胞は良好な骨分化誘導を認めることは出来なかったため、ハイブリット体作製、実験動物への移植は行えなかった。

このように、臍帯由来間葉系細胞およびCD146陽性臍帯由来間葉系細胞は、それら細胞集団では骨再生を引き起こす細胞内シグナル伝達をしめることはなかったことから、より幹細胞に近い細胞を分離する必要があると考えた。すなわち、一般に間葉系幹細胞は接着性の細胞として生体各組織から採取するので、単一の細胞種ではなく複数の種類の細胞から構成される。近年、ヒト間葉系組織、間葉系培養細胞において多分化能を有するが腫瘍性を持たないMuse (Multilineage - differentiating stress enduring) 細胞が報告された。そこで本研究の最終年は、各細胞群中のMuse細胞の有無を調べた。

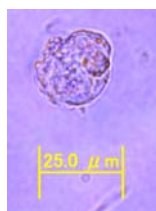
東北大学大学院医学研究科出澤真理教授らより技術移転を受け、本計画を実行した。すなわち、Muse細胞はCD105およびSSEA-3ポジティブの細胞集団をフローサイトメータで分離した(図5)ところ、7日目にクラスターを確認した(図6)。この結果臍帯由来間葉系細胞中には一定程度Muse細胞が存在する事が示唆された。

図5 臍帯由来間葉系細胞のソーティング



P3の領域(この検体では全細胞中3.2%)にCD105、SSEA-3陽性細胞が認められた。

図6 FACS後7日目に確認されたクラスター



これに対して、CD146陽性臍帯由来間葉系細胞すなわちPericyte集団中(図7)のMuse細胞の有無も検討したが、P3の領域にはCD105、SSEA-3陽性の細胞は認められなかった(図8)。

図7 CD146陽性臍帯由来間葉系細胞

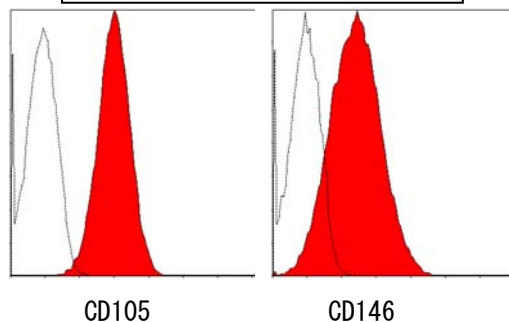
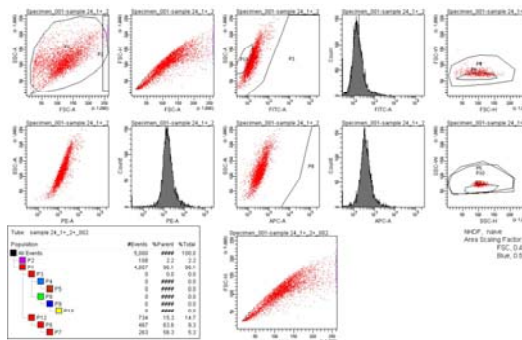


図8 Pericyte 集団の FACS



現在、東北大学大学院医学研究科出澤真理教授、京都大学再生医科学研究所田畑泰彦教授らと「臍帯由来間葉系細胞中 Muse 細胞の特性解析と歯周組織再生医療応用への展開」の共同研究を開始するところである。

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1件)

①保母浩治、金指幹元、川本忠文、五味一博：歯周骨欠損部に移植した培養歯髄細胞の組織学的評価：日保存誌 55(1):30~37, 2012 査読あり

〔学会発表〕(計7件)

①金指幹元：歯周医学における糖尿病と歯周組織再生療法の前線：2013年2月26日・第3回M&D研究会(埼玉)

②金指幹元、宮本正章、長野孝俊、田畑泰彦、五味一博：ゼラチンハイドロゲル徐放化多血小板血漿の歯周組織再生療法への応用：2012

年 12 月 22 日・第 1 回 DDS 徐放化再生医療研究会（京都）

③金指幹元：歯周病と生活：2012年10月27日・日本プライマリ・ケア連合会神奈川県支部第90回学術大会（神奈川）

④金指幹元、宮本正章、長野孝俊、田畑泰彦、五味一博：ゼラチンハイドロゲル徐放化多血小板血漿を用いた歯周組織再生療法：2012年9月2日・第10回日本再生歯科医学会 総会・学術大会（設立10周年記念大会）（神戸）

⑤金指幹元、宮本正章、長野孝俊、日下輝雄、田畑泰彦、五味一博：多血小板血漿と多孔性ハイドロキシアパタイトを応用した歯周組織再生療法の7年経過症例：2012年2月11日・第1回日本歯周病学会関東9大学・日本臨床歯周病学会関東支部合同研修会（東京）

⑥金指幹元、宮本正章、日下輝雄、田畑泰彦、五味一博：DDS徐放化多血小板血漿の歯周組織再生療法への応用に向けた多血小板血漿応用症例の7年経過例：2011年12月3日・第1回DDS徐放化再生医療研究会（東京）

⑦須藤和寛、高森 靖、菅野 恵、金指幹元、中村幸夫：ヒト臍帯および羊膜由来細胞の造血支持能の比較：2010年12月8日・BMB2010（第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会）（神戸）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金指 幹元 (KANAZASHI MIKIMOTO)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：80339811

(2) 研究分担者

片桐 岳信 (KATAGIRI TAKENOBU)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：80245802

(3) 連携研究者

弓場 俊輔 (YUBA SYUNSUKE)
産業技術総合研究所・
健康工学研究部門・研究グループ長
研究者番号：40263248