

201106001A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

歯科再生医療拠点を活用した 次世代型歯周組織再生療法の開発

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村上 伸也

平成 24 (2012) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

**歯科再生医療拠点を活用した
次世代型歯周組織再生療法の開発**

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村上 伸也

平成 24 (2012) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告	1
1. 脂肪組織由来幹細胞の移植による歯周組織再生に関する研究	2
村上伸也	
II. 分担研究報告	14
1. ヒト脂肪組織由来幹細胞の硬組織形成能力の解析に関する研究	15
齋藤正寛	
2. 歯周組織再生療法の評価法に関する研究、ヒト脂肪組織由来 ヒト脂肪組織由来幹細胞を歯周組織細胞へ分化誘導する因子の探索 ..	18
松下健二	
3. ヒト脂肪組織由来細胞の分化能と安全性に関する解析	22
阿久津英憲	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	33
V. 参考資料	483

I. 総括研究報告

脂肪組織由来幹細胞の移植による歯周組織再生に関する研究

村上 伸也

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

（総括）研究報告書

脂肪組織由来幹細胞の移植による歯周組織再生に関する研究

研究代表者 村上 伸也

大阪大学大学院歯学研究科

口腔分子免疫制御学講座・教授

研究要旨 重度歯周炎患者に対する歯周組織再生療法を樹立する目的で、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞(ADSC)と至適足場材の移入による新規歯周組織再生療法の確立を目指す。本年度は、重度歯周炎患者を対象とした臨床研究の実施に向け、ビーグル犬重度歯周病モデルを用いて ADSC と併用する足場材であるボルヒール●の至適調整法を検討すると共に、実際にボランティアから脂肪組織の提供を受け ADSC の分離、培養、移植材の調整等の一連の過程をシミュレーションするコールドランを実施した。その結果、ビーグル犬モデルで歯周組織再生が確認できた ADSC 含有ボルヒール●移植材有効と同様の移植材がヒト脂肪組織からも同様に作製できることが確認され、歯周炎患者に対して ADSC を用いた新規歯周組織再生療法の臨床研究を実施する体制の整備が完了した。

研究分担者

澤 芳樹

大阪大学大学院医学系研究科
外科学講座心臓血管外科学
教授

李 千萬

大阪大学大学院医学系研究科
医療経済産業政策学講座
特任准教授

北村 正博

大阪大学大学院歯学研究科
口腔分子免疫制御学講座
准教授

山田 聡

大阪大学歯学部附属病院
口腔治療・歯周科
講師

竹立 匡秀

大阪大学大学院歯学研究科
口腔分子免疫制御学講座
助教

橋川 智子

医療法人松徳会橋川デンタルクリニック
院長

大門 貴志

兵庫医科大学医学部数学教室
講師

A. 研究目的

歯周病は、成人が歯を喪失する第一の原因である。しかしながら、歯周病により失われた歯周組織は通常の治療では再生しないことから、「口と歯」が支える QOL を維持・増進するためには、重度歯周病に対応できる新規歯周組織再生療法の開発が急務である。本研究は、平成 20 年度再生医療推進基盤整備事業の支援により大阪大学歯学部附属病院内に設置されたセルプロセッシング・アイソレータ

(CPI) を活用し、“口と歯の機能”を脅かす重度歯周炎に対応できる脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞 (ADSC) と足場材料を組み合わせた新規歯周組織再生療法の樹立を目指すものである。

平成 22 年度までに、ADSC の歯周組織再生誘導能と安全性をヒト ADSC の *in vitro* 解析と動物実験モデルを用いた解析により確認した。すなわち、ヒト ADSC の分化過程において *RUNX-2* および *PLAP-1* の mRNA の発現上昇が認められ、ADSC が骨芽細胞や歯根膜細胞への分化能を有することが明らかとなった。また、ADSC の継代 14 代目までの培養過程において染色体数の異常や転座欠失などの染色体の構造異常は認められなかった。さらに、ビーグル犬 2 壁性歯周組織欠損モデルにおいて、ボルヒール●を足場材とした ADSC 含有移植材投与部位は、ボルヒール●単独投与部位に比べて、新生骨の形成が多く歯肉上皮の根尖方向への増殖が少ない傾向が認められ、ボルヒール●を足場材とした ADSC 含有移植材が歯周組織再生を効果的に誘導する可能性が示唆された。

そこで本年度は、ADSC を用いた新規歯周組織再生療法を確立するため、ビーグル犬重度歯周病モデルを用いてボルヒール●を足場材とした ADSC 含有移植材の至適調整法を決定する。そして、CPI を用いてボランティアから採取した脂肪組織より ADSC を単離・培養し、足場材とともに移植材を作製するまでの一連の過程 (コールドラン) を実施することにより、ADSC 移植材の調整に関するシミュレーションと最終確認を行った後、最終的に重度歯周炎患者を対象とした臨床研究を実施することを目標とした。

B. 研究方法

1. ビーグル犬脂肪組織からの ADSC の単離

ビーグル犬にペントバルビタールの静脈内投与による全身麻酔を施し、腹部大網より脂肪組織を採取し、細断後、コラゲナーゼ処理 (1 時間) を行った。そして、ficoll を用いた比重遠心により赤血球を除去し得られた細胞を培養プレートに播種し、プレートに付着した細胞 (ADSC) を単離し 3 代継代して凍結保存した。

2. ADSC 含有移植材と対照移植材の作成法

ビーグル犬の脂肪組織から単離され凍結保存しておいた ADSC を解凍・培養し、混和後の ADSC 濃度が 4.2×10^7 cells/mL となるように PBS で調整した細胞懸濁液とボルヒール●のフィブリノゲン液 (A 液) あるいはトロンビン (B 液) を、5 : 1 の割合で混和した。そして、調整した ADSC 含有 PBS 希釈 A 液と ADSC 含有 PBS 希釈 B 液を 1 : 1 の割合で $80 \mu\text{L}$ ずつ混合し、 37°C にて 30 分間インキュベートして硬化させ ADSC 含有移植材 (6.7×10^6 cells/ $160 \mu\text{L}$) を作製した。また、ADSC 細胞懸濁液の代わりに、PBS と A 液あるいは B 液を 5 : 1 の割合で混和し、その後同様に、等量を混合し硬化させたものを対照移植材とした。なお、ADSC 含有移植材と対照移植材はビーグル犬の歯周組織欠損に移植する直前に調整した。

3. ビーグル犬の実験的歯周病モデルを用いた ADSC 含有移植材の歯周組織再生誘導効果の検討

(2 壁性歯周組織欠損モデル)

通法に従い、6 頭のビーグル犬の下顎左右側第 4 前臼歯を抜去し、約 3 ヶ月間の治癒期間を経た後に、下顎両側第 1 後臼歯近心部に頬舌径 3 mm、近遠心径 5 mm、深さ 4 mm の 2 壁

性歯周組織欠損を作製した。作製した歯周組織欠損の一侧は試験側としてボルヒール●を足場材とした ADSC 含有移植材を、他側にはボルヒール●のみを含む対照移植材を投与した。その後、試験側と対照側の歯周組織欠損部の治癒状態を経時的に観察し、投与6週後に屠殺し下顎骨を採取した。そして、歯周組織欠損部の軟 X-ray 写真撮影およびマイクロ CT 断層撮影を行った後、組織標本を作製して組織学的解析を実施した。

(2級根分岐部モデル)

同様に6頭のビーグル犬の下顎左右側第3、4前臼歯の頰側根分岐部に歯軸方向径(垂直径)4mm、深さ(水平径)3mmの2級根分岐部病変相当の歯周組織欠損を作製し、作製した歯周組織欠損にパテタイプのシリコン印象材を転入し歯肉弁を縫合した。そして、4週間後、作製した歯周組織欠損の一侧を試験側、他側を対照側として、前記の2壁性歯周組織欠損モデルと同様にそれぞれADSC含有移植材および対照移植材を投与した。その後、被験部位の治癒状態を経時的に観察し、投与6週後に屠殺し、同様のX線のおよび組織学的解析を実施した。

4. ビーグル犬歯周病モデルを用いた ADSC 含有移植材と FGF-2 との併用による歯周組織再生誘導効果の探索的検討

ビーグル犬の下顎両側第1後臼歯近心部に前記と同様に2壁性歯周組織欠損を作成した。そして、作製した歯周組織欠損の一侧は試験側としてADSC含有移植材と0.3%FGF-2含有ハイドロキシプロピルセルロース(HPC)溶液を、他側(対照側)にはADSC含有移植材のみを投与した。その後、試験側と対照側の歯周組織欠損部の治癒状態を経時的に観察するとともに、投与6週後に屠殺し被験部位のマイクロ

CT断層撮影によるX線的解析を実施した。

5. 軟 X-ray 写真撮影およびその解析

採取した下顎骨の歯周組織欠損部の軟 X-ray 写真撮影を行い、新生骨塩量の計測を行った。

6. マイクロ CT 断層撮影およびその解析

採取した下顎骨をマイクロ CT にて断層撮影を行い、専用ソフトを用いて新生骨体積等の画像解析を行った。

7. 組織標本作製および組織学的解析

採取した下顎骨を4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて浸漬固定を行い、10%ギ酸クエン酸ナトリウムにて脱灰の後、凍結切片法により欠損部を含む組織切片を作製した。そして、ヘマトキシリン・エオジン染色およびアザン染色を行い、試験側と対照側の新生骨、新生セメント質、新生歯根膜を観察・比較し、ADSC含有移植材の歯周組織再生能を評価した。

8. セルプロセッシング・アイソレータ (CPI)

ヒト脂肪組織からADSCを単離・培養し足場材(ボルヒール®)とともにADSC含有移植材を作製するまでの一連の過程は閉鎖的に細胞培養が可能なセルプロセッシング・アイソレータ(AIS-H1400A)を用いて実施した。そして、このCPIには、CO₂インキュベーター(MCO-5AC(IS))、フリーザー付薬用保冷庫(MPR-214F、MPR-414F)、超低温フリーザー(MDF-33V)、液体窒素保存容器(MVE-815)およびパーティクルセンサ(KR-03)が付属し、多点環境モニタリングシステム(KF-02B)を用いてシステム全体のモニターと制御を行った。

9. CPIの稼働性能適格性確認(バリデーション)と洗浄・殺菌操作(サニテーション)

ン)

アイソレータ室、CPI、CPI 付属機器およびモニタリングシステムの稼働性能適格性確認および洗浄・殺菌操作は、バイオメディカ・ソリューション株式会社に依頼し実施した。

10. ADSC 含有移植材作製の工程管理システムの構築

採取された脂肪組織から ADSC を単離し、ボルヒール®との複合体 (ADSC 含有移植材) が作製されるまでの全工程について、検体、試薬、消耗品が管理される GMP (Good Manufacturing Practice) 基準に準拠したシステムを構築した。

11. ADSC 含有移植材作製のコールドラン

ボランティアの脂肪組織から ADSC を単離・培養しボルヒール®とともに ADSC 含有移植材を作製するまでの一連の過程をシミュレーションした。すなわち、ボランティアの自己血採取を行い細胞培養に用いる血清を分離した。その後、歯学部附属病院近未来歯科医療センターにて腹部より皮下脂肪組織を 30mL 採取し、同センター内に設置した CPI 内で、脂肪組織から ADSC を単離し、事前に採取した自己血由来血清を用いて継代培養を行い、凍結保存した。その後、ADSC を解凍、再培養し、6 倍希釈したボルヒール®と混和・調整し ADSC 含有移植材を作製した。また、この一連のコールドランの過程で、凍結前後の培養細胞を回収し、形態学的評価とともに、細胞数、生存率および間葉系幹細胞の細胞表面マーカー

(CD105⁺陽性率、CD73⁺陽性率、CD166⁺陽性率、CD44⁺陽性率、CD45⁻陽性率) の検査を実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、「研究機関等における

動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第 71 号) および「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省告示第 88 号) 等で示された動物実験等の実施に関する基本指針に準拠して行うとともに、大阪大学大学院歯学研究科の動物実験委員会の承認を得ている。また、本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究を行っているため、機関の外部委員を含めた大阪大学大学院歯学研究科ならびに歯学部附属病院倫理審査委員会において、生命倫理および安全管理に関して厳重に審査を受け、倫理委員会の承認かつ実施施設の長 (大阪大学歯学部附属病院病院長) の許可を得て、全ての研究を遂行している。さらに本研究は、ヒト体性幹細胞である ADSC を用いた臨床研究を最終目標としていることから、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成 22 年厚生労働省告示 380 号) に従った研究プロトコルを作製し、大阪大学医学部附属病院および歯学部附属病院における倫理委員会の審議を経て、その後、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する審査委員会」の審査を受け、厚生労働大臣から実施の許可を得ている (厚生労働省医政 0822 第 6 号、平成 23 年 8 月 22 日)。そして、それを受け、平成 23 年 11 月 8 日に大阪大学大学院歯学研究科ならびに歯学部附属病院より研究許可を受けた。また、ボランティアの脂肪組織から ADSC を単離し ADSC 含有移植材を作製するまでの一連の過程をシミュレーションするコールドランに関しても、大阪大学大学院歯学研究科ならびに歯学部附属病院倫理委員会の承認を得て実施した。そして、本年度に実施した研究結果から、厚生労働大臣、大阪大学大学院歯学研究科および歯学部附属病院から研究許可を得た研究計画の一部に変

更が必要となった。そのため、平成 24 年 4 月 12 日に大阪大学大学院歯学研究科ならびに歯学部附属病院倫理委員会の審議を経て承認を得た後、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する審査委員会」に研究計画の変更に関する審査申請を行った。

C. 研究結果

1. ビーグル犬の実験的歯周病モデルを用いた ADSC 含有移植材の歯周組織再生誘導効果の検討

(2 壁性歯周組織欠損モデル)

ビーグル犬の下顎第 1 後臼歯近心部に実験的 2 壁性歯周組織欠損モデルを作製し、ボルヒール●を足場材とした ADSC 含有移植材の歯周組織再生誘導効果を検討した。その結果、マイクロ CT 断層撮影による解析で、投与 6 週後の 3 次元構築像において、ADSC 含有移植材を投与した部位（試験側）は、足場材であるボルヒール●を投与した部位（対照側）に比べて作製した骨欠損範囲に有意に多い骨新生が認められた。そして、投与 6 週後のソフト X-ray 写真による解析でも、ADSC 含有移植材を投与した試験側は、対照側に比べて新生骨塩量が多い傾向が認められた。ADSC 含有移植材の歯周組織再生効果の組織学的検討でも、ADSC 含有移植材を投与した試験側では、対照側に比べセメント質の歯冠方向への新生が多く観察された。そして、歯周組織欠損部における骨新生も試験側に多く観察され、足場材であるボルヒール●を単独で投与した対照側では、欠損部の新生骨の添加はわずかにとどまっていることが多かった。また、本モデルで、ADSC 含有移植材を投与した部位（試験側）において、異常な治癒所見は認められなかった。

(2 級根分岐病変部モデル)

ビーグル犬の下顎左右側第 3、4 前臼歯の頬側根分岐部に 2 級根分岐部歯周組織欠損モデルを作製し、ボルヒール●を足場材とした ADSC 含有移植材の歯周組織再生誘導効果を検討した。その結果、マイクロ CT 断層撮影による解析では投与 6 週後の 3 次元構築像において、ADSC 含有移植材を投与した部位（試験側）は、足場材であるボルヒール●を投与した部位（対照側）に比べて作製した骨欠損部に有意に多い骨新生が認められた。そして、歯周組織再生効果の組織学的検討においても、ADSC 含有移植材を投与した試験側では、対照側に比べ有意なセメント質の歯冠方向への新生が観察された。また、本モデルにおいても、ADSC 含有移植材を投与した部位（試験側）に異常な治癒所見を認めなかった。

2. ビーグル犬歯周病モデルを用いた ADSC 含有移植材と FGF-2 との併用による歯周組織再生誘導効果の探索的検討

ビーグル犬の 2 壁性歯周組織欠損モデルにおいて、ADSC 含有移植材と 0.3%FGF-2 含有 HPC 溶液を同時に投与した試験側は、ADSC 含有移植材を単独で投与した対照側に比べ、歯周組織欠損部に著明な骨新生がマイクロ CT 撮影により観察された。また、ADSC 含有移植材と FGF-2 を併用した試験側には、対照側と同様に異常な治癒所見は投与 6 週後まで観察されなかった。

3. ADSC 含有移植材作製のコールドラン

ボランティアから皮下脂肪組織を採取し、CPI 内にて ADSC を単離、培養し、試験物（ADSC 含有移植材）作製までの過程について 2 回コールドランを実施した。

(第 1 回コールドラン)

ボランティア A は 52 歳女性で、平成 23 年

11月10日に自己血採取を行い、細胞培養に用いる血清を分離した。同11月16日に歯学部附属病院近未来歯科医療センターにて腹部より皮下脂肪組織を30mL採取し、同センター内に設置したCPI内にてADSCを単離、培養を開始した。培養開始から7日後(同11月23日)に継代培養を行い、2日後(同11月25日)のFACS解析にて95%以上の細胞がCD105⁺ CD73⁺ CD166⁺ CD44⁺ CD45⁻であることが確認されたことから、細胞を凍結保存した。その後、11月29日に凍結した細胞を融解し、再び培養を開始した。その際の生細胞率は98.4%であった。再培養3日後(同12月2日)、6日後(同12月5日)にそれぞれ継代培養を行い、再培養開始から9日後(同12月8日)に凍結前と同様の細胞表面マーカーの発現を確認した。そして、前記の調整法に従いボルヒール®と混和することによりADSC含有移植材を作製した。(第2回コールドラン)

ボランティアBは50歳女性で、平成24年3月5日に自己血、同3月14日に腹部より皮下脂肪組織を30mL採取した。そして、第1回コールドラン同様、FACSにて表面抗原の発現を確認し、3月25日に細胞を凍結した。4月17日に凍結細胞を融解し継代培養を行い、凍結前と同様の表面抗原の発現確認を行った後ADSC含有移植材を作製した。

4. CPIの稼働性能適格性確認(バリデーション)と洗浄・殺菌操作(サニテーション)の実施

平成24年2月24日および3月2日に、アイソレータ室、CPI、CPI付属機器およびモニタリングシステムのバリデーションがバイオメディカ・ソリューション株式会社により実施され、対象となったすべての設備が基準を満たしていることが確認された(参考資料参

照)。また、同年3月1日および3月2日、同社によって施設のサニテーションが行われ、続いて環境評価が行われた。施設の清浄化は目視によって良好と判定され、その後行われた環境評価において適用基準に準拠していることが確認された。

5. ADSC含有移植材作製の工程管理システムの構築

脂肪組織からADSCを単離しADSC含有移植材が作製されるまでの全工程で、CPIに搬入される検体、試薬、消耗品に二次元ラベルを発行・貼付し、CPI内で作製される中間品はICタグにて管理することで、GMP基準に準拠した試験物(ADSC含有移植材)作製のためのシステムとした。本システムは、上記コールドラン等にて検証するとともに修正を行った。

6. 研究計画の変更申請

本年度に実施した動物モデルを用いたADSC含有移植材の歯周組織再生効果の検討とボランティアの脂肪組織からADSC含有移植材を作製したコールドランの結果から、厚生労働大臣から実施許可(厚生労働省医政0822第6号、平成23年8月22日)を得ている本研究の研究計画の一部に変更が必要となった。そのため、平成24年4月12日に大阪大学大学院歯学研究科ならびに歯学部附属病院倫理委員会の審議を経て承認を得た後、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する審査委員会」に研究計画の変更に関する審査申請を行った。

D. 考察

歯周組織再生療法の最終的な目標は、歯周病により失われた歯周組織の解剖学的構造と機能を健全な状態に再構築することである。しかしながら、現在行われているGTR法やエナメルマトリックスタンパクを用いた歯周組

織再生療法では、十分な歯周組織再生効果を期待できる適応症には限界がある。そのため、新たな試みとして、サイトカイン療法や骨髄由来幹細胞などを用いた細胞治療による歯周組織再生誘導の可能性が検討されている。本研究では、歯周組織再生療法に用いる幹細胞としてADSCを利用した新規歯周組織再生療法の開発に平成21年度から取り組んできた。その結果、平成22年度までに、ヒトADSCの*in vitro*解析とビーグル犬2壁性歯周組織欠損モデルを用いた解析により、ADSCの歯周組織再生誘導能と安全性を確認するとともに、現在医療現場で臨床応用されているフィブリン製剤であるボルヒール●を足場材としたADSC含有移植材が歯周組織再生を効果的に誘導することが明らかとなった。そこで本年度は、ADSCを用いた新規歯周組織再生療法を確立するため、ビーグル犬重度歯周病モデルを用いてボルヒール●を足場材としたADSC含有移植材の最適調整法を決定後、ヒト脂肪組織からADSCの単離・培養を行いボルヒール●とともに移植材の調整（コールドラン）を実施し、最終的に重度歯周炎患者を対象とした臨床研究を実施することを計画とした。

細胞移植に際しての足場材としては、ハイドロキシアパタイト、 β -TCP（ β -リン酸三カルシウム）、乳酸グリコール酸共重合体（Poly lactic-co-glycolic acid: PLGA）、フィブリンなど、いくつかの候補材料があげられる。しかしながら、歯肉や歯根膜といった軟組織とセメント質や歯槽骨といった硬組織が複雑な立体構造を示す歯周組織の再生に用いる足場材は、適度な賦形性とスペースメーカーに必要な強度を有し、生体内の生理的環境下で吸収され、本来の組織に置換されることが望ましい。そこで本研究では、生体内で吸収

し置換される性質を有し、我々のFGF-2を用いた歯周組織再生実験によって足場材としての使用実績を有しているフィブリンゲルが、ADSCと併用する足場材としての有用であることを平成22年度に明らかにした。そして、本研究は歯周炎患者を対象としたADSCを用いた新規歯周組織再生療法の臨床研究を最終目標としていることから、人への臨床応用が認められている唯一のフィブリン製剤であるボルヒール●をADSCと併用する足場材として用いることとした。さらに、ADSCによる歯周組織再生量は歯周組織欠損部に投与するADSC数に依存すると考えられることから、混合できるADSC数を増やし、かつ足場材として適度の賦形性と強度を保持するボルヒール●の調整法を検討した。その結果、ボルヒール●のA液とB液をADSCのPBS懸濁液でそれぞれ6倍希釈し混合することにより、足場材として賦形性やスペースメーカー機能を保持したままADSC含有移植材中のADSC濃度を 4.2×10^7 cells/mLまで増加させることが可能となった。

本研究では、ボルヒール●を足場材としたADSC含有移植材の歯周組織再生に関する有効性と安全性を明らかにするため、ビーグル犬の実験的2壁性骨欠損および2級根分岐部病変モデルを作製し、各歯周組織欠損部にボルヒール●を足場材としたADSC含有移植材を投与しその歯周組織再生効果と安全性を検討した。その結果、両モデルとも、マイクロCT断層撮影による解析では投与6週後の3次元構築像において、ADSC含有移植材を投与した部位（試験側）は、足場材であるボルヒール●を投与した部位（対照側）に比べて有意に多い骨新生を示した。そして、ADSC含有移植材の歯周組織再生効果の組織学的検討でも、

ADSC 含有移植材を投与した試験側では、対照側に比べセメント質の歯冠方向への新生と骨新生が多く観察された。一方、足場材であるボルヒール●を単独で投与した対照側では、欠損部の新生セメント質や新生骨の添加はわずかにとどまっていることが多かった。また、これらのビーグル犬の歯周組織欠損モデルにおいて、ADSC 含有移植材を投与した部位（試験側）において異常な治癒所見は認められなかった。以上のことから、ボルヒール●を足場材としたADSC含有移植材の歯周組織再生に関する有効性と安全性がビーグル犬歯周組織欠損モデルにおいて確認されたとと言える。

本研究では、歯周炎患者を対象とした臨床研究を円滑に遂行するため、これまでに2人のボランティアから皮下脂肪組織を採取し、CPI内にてADSCを単離し、自己血清添加下で培養した後、ADSC含有移植材を作製するまでの過程を実際にシミュレーションするコールドランを実施した。その結果、脂肪組織から単離・培養したADSCが、間葉系幹細胞に特徴的な細胞表面マーカー（CD105⁺ CD73⁺ CD166⁺ CD44⁺ CD45⁻）を示したことから、単離されたADSCは間葉系幹細胞の特徴を有していることが確認された。また、凍結保存、融解後の生細胞率も95%以上と高く、継代培養を行っても凍結前と同様の間葉系幹細胞に特徴的な細胞表面マーカーの発現が確認された。そして、ADSCとボルヒール●を混和することにより目的とするADSC含有移植材を作製できたことから、安定的に歯周炎患者の脂肪組織からADSC含有移植材が提供できることが確認された。一方、脂肪採取からADSC含有移植材の作製まで概ね3週間程度の期間が必要であることが明らかとなり、重度歯周炎患者にADSCを用いた新規歯周組織再生療法を適応する場合

のタイムスケジュールの作成に、このADSC含有移植材作製期間を考慮する必要があることが明らかとなった。また、体重が50kg未満の場合、自己血採血量が200mlに制限されるため、ADSCの継代培養の回数や量に注意を払う必要があることも明らかとなった。

歯周炎患者にADSC含有移植材を適応する場合、ADSC含有移植材は薬事法に基づいて厚生労働大臣が定めた医薬品等の品質管理基準（GMP基準）に準拠して作製する必要がある。そのため、本研究では、歯周炎患者の脂肪組織からADSCを単離しADSC含有移植材が作製されるまでの全工程で、CPIに搬入される検体、試薬、消耗品に二次元ラベルを発行・貼付し、CPI内で作製される中間品はICタグにて管理することで、GMP基準に準拠したADSC含有移植材作製システムを構築することができた。

本研究は歯周組織再生研究分野で、新たな「細胞治療」の臨床研究の実施を目指したものである。そのため、昨年度に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する審査委員会」に臨床研究申請を行い、本年度、厚生労働大臣から実施許可（厚生労働省医政0822第6号、平成23年8月22日）を得ている。しかしながら、本年度に実施した動物モデルを用いたADSC含有移植材の歯周組織再生効果の検討とボランティアの脂肪組織からADSC含有移植材を作製したコールドランの結果から、使用するADSCの細胞数やADSC含有移植材の作製手順等に一部軽微な変更が必要となった。そのため、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する審査委員会」に研究計画の変更の審議申請を現在行っている。また、アイソレータ室、CPI、CPI付属機器およびモニタリングシステムの稼働性能適格性確認および洗浄・殺菌操作は終了し、臨床研究を実施する上での設備面の

準備はすでに完了している。今後、研究計画の変更許可を受け次第、重度歯周炎患者を対象とし臨床研究を実施する予定である。

本研究では、ADSCを用いた歯周組織再生療法への適応拡大を目指し、ビーグル犬2壁性歯周組織欠損モデルを用いて、ADSC含有移植材とFGF-2との併用による歯周組織再生誘導効果を探索的に検討した。その結果、ADSC含有移植材と0.3%FGF-2含有HPC溶液との併用により、ADSC含有移植材単独投与に比べ、著明な骨新生が歯周組織欠損部に観察された。このことは、ADSCと様々なシグナル分子を組み合わせることで、さらに広範囲に及ぶ重度歯周組織欠損部において組織再生を誘導できる可能性を示唆するものである。今後、FGF-2や血小板由来増殖因子(PDGF-BB)といったシグナル分子と本研究で構築したADSC含有移植材を効率的に融合することが可能になれば、さらに適応範囲が広く有効なPeriodontal tissue engineeringが創生されるものと期待される。

E. 結論

1. ビーグル犬の実験的2壁性歯周組織欠損モデルにボルヒール®を足場材としたADSC含有移植材を投与したところ、対照側に比べて有意に多い骨新生が認められた。
2. ビーグル犬の実験的2級根分岐部病変モデルにADSC含有移植材を投与したところ、対照側に比べて有意に多い骨新生とセメント質の歯冠方向への新生が認められた。
3. ビーグル犬の2壁性歯周組織欠損および2級根分岐部病変モデルでは、ADSC含有移植材を投与した部位において異常な治癒所見は認めなかった。

4. ボランティアから皮下脂肪組織を採取し、CPI内にてADSC含有移植材を作製するコールドランを実施した結果、脂肪組織からADSC含有移植材を安定的に提供できることが確認された。
5. 臨床研究の実施に際し、研究計画の一部に変更が必要となったため、現在「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する審査委員会」に研究計画の変更申請を行っている。

以上の結果より、重度歯周炎患者を対象にADSCを用いた新規歯周組織再生療法に関する臨床研究を実施する準備は完了した。今後、研究計画の変更許可を受け次第、重度歯周炎患者を対象とし臨床研究を実施する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Murakami S.** Periodontal regeneration by FGF-2: Present status and future outlook. PM Bartold, LJ Jin, Multi-Disciplinary Management of Periodontal Disease, 2012 Asian Pacific Society of Periodontology, Hong Kong, 2012, 1-9.
2. **Murakami S, Yamada S,** Nozaki T, and **Kitamura M.** Fibroblast Growth Factor-2 Stimulates Periodontal Tissue Regeneration. *Clinical Advances in Periodontics* 1(2): 95-99, 2011.

3. Yanagita M, Kojima Y, Mori K, **Yanada S** and **Murakami S**. Osteoinductive and anti-inflammatory effect of royal jelly on periodontal ligament cells. *Biomedical Research* 32(4): 285-291, 2011.
4. Kashiwagi Y, Yanagita M, Kojima Y, Shimabukuro Y, **Murakami S**. Nicotine up-regulates IL-8 expression in human gingival epithelial cells following stimulation with IL-1 β or *P. gingivalis* lipopolysaccharide via nicotinic acetylcholine receptor signalling. *Archives of Oral Biology* 57(5): 483-490, 2011.
5. Yanagita M, Kobayashi R, Kojima Y, Mori K, **Murakami S**. Nicotine modulates the immunological function of dendritic cells through peroxisome proliferator-activated receptor- γ upregulation. *Cellular Immunology* 274(1-2): 26-33, 2012.
6. Iwayama T, Yanagita M, Mori K, Sawada K, Ozasa M, Kubota M, Miki K, Kojima Y, **Takedachi M**, **Kitamura M**, Shimabukuro Y, **Hashikawa T**, **Murakami S**. Adiponectin regulates functions of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 47, in press, 2012.
7. Yanagita M, Hirano H, Kobashi M, Nozaki T, **Yanada S**, **Kitamura M** and **Murakami S**. Periodontal disease in a patient with Prader-Willi syndrome: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 5: 329-333, 2011.
8. **Takedachi M**, Oohara H, Smith BJ, Iyama M, Kobashi M, Maeda K, Long CL, Humphrey MB, Stoecker BJ, Toyosawa S, Thompson LF and **Murakami S**. CD73-Generated Adenosine Promotes Osteoblast Differentiation. *J Cell Physiol* 227: 2622-2631, 2012.
9. Yang J, Ii M, Kamei N, Alev C, Kwon SM, Kawamoto A, Akimaru H, Masuda H, **Sawa Y**, Asahara T. CD34+ Cells Represent Highly Functional Endothelial Progenitor Cells in Murine Bone Marrow. *PLoS ONE* 6(5): e20219, 2011.
10. Fujita T, Sakaguchi T, Miyagawa S, Saito A, Sekiya N, Izutani H and **Sawa Y**. Clinical impact of combined transplantation of autologous skeletal myoblasts and bone marrow mononuclear cells in patients with severely deteriorated ischemic cardiomyopathy. *Surg Today* 41(8): 1029-1036, 2011.
11. Shudo Y, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Shimizu T, Okano T and **Sawa Y**. Novel regenerative therapy using cell-sheet covered with omentum flap delivers a huge number of cells in a porcine myocardial infarction model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 142(5): 1188-1196, 2011.
12. Imanishi Y, Miyagawa S, Maeda N, Fukushima S, Kitagawa-Sakakida S, **Daimon T**, Hirata A, Shimizu T, Okano T, Shimomura I and **Sawa Y**. Induced adipocyte cell-sheet ameliorates cardiac dysfunction in a mouse myocardial infarction model: a novel

- drug delivery system for heart failure. *Circulation* 124(11 Suppl 1): S10-17, 2011.
13. Machida T, Tanemura M, Ohmura Y, Tanida T, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Ito T, Nagano H, Mori M, Doki Y and **Sawa Y**. Significant Improvement in Islet Yield and Survival with Modified ET-Kyoto Solution. *Cell Transplant* Apr2: Epub, 2012
 14. **Sawa Y**, Miyagawa S, Sakaguchi T, Fujita T, Matsuyama A, Saito A, Shimizu T and Okano T. Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case. *Surg Today* 42(2): 181-184, 2012.
 15. Kino-oka M, Ngo TX, Nagamori E, Takezawa Y, Miyake Y, **Sawa Y**, Saito A, Shimizu T, Okano T, and Taya M. Evaluation of vertical cell fluidity in a multilayered sheet of skeletal myoblasts. *J Biosci Bioeng* 113(1): 128-131, 2011.
- ## 2. 学会発表
1. **村上伸也** (特別講演)、歯周組織再生療法の未来を探る、日本矯正歯科協会学術大会、2011年6月26日、東京
 2. **Shinya Murakami** (シンポジウム)、Periodontal tissue engineering by FGF-2, 2nd World Wide University Network Symposium, 2011年7月25日、Leeds, UK
 3. **Shinya Murakami** (招待講演)、FGF-2 stimulates periodontal regeneration, Research Day of Otago University, 2011年8月11日、Dunedin, New Zealand
 4. **Shinya Murakami** (招待講演)、Periodontal regeneration by FGF-2: present status and future outlook, 9th General session of Asian Pacific Society of Periodontology (APSP), 2011年9月10日、Hong Kong
 5. **村上伸也** (特別講演)、歯周治療における細胞治療の標準化にむけて、第54回日本歯周病学会秋季学術大会、2011年9月24日、下関、山口
 6. **村上伸也** (シンポジウム)、脂肪組織由来幹細胞を応用した歯周組織再生療法の可能性と将来展望、第53回歯科基礎医学会学術大会、2011年10月2日、岐阜
 7. **村上伸也** (シンポジウム)、歯周組織再生療法の現状と未来、第70回日本矯正歯科学会大会2011年10月18日、名古屋
 8. 児嶋由子、柳田学、森健太、野崎剛徳、**山田聡**、**北村正博**、**村上伸也** : FGF-2により誘導される血管新生へのマウス歯根膜細胞の関与 第54回日本歯周病学会春季学術大会、2011年5月28日、福岡
 9. 中村 友美、山下 元三、河原 貴展、橋本悠平、梶川 哲宏、**山田聡**、北垣次郎太、前田 憲一郎、**北村正博**、**村上伸也** : 歯根膜細胞におけるオートファジーの役割 第54回日本歯周病学会春季学術大会、2011年5月28日、福岡
 10. 大原 廣之、**竹立 匡秀**、伊山 舜吉、**村上伸也** : CD73 (ecto-5'-nucleotidase) による、アデノシン受容体活性化制御が骨芽細胞分化に及ぼす影響、第29回日本骨代謝学会学術集会、2011年7月29日、大阪
 11. **竹立 匡秀**、沢田 啓吾、小笹 匡雄、岩

山 智明、野崎 剛徳、市川 朋生、前田 憲一郎、田内 拓史、三木 康史、大原 廣之、伊山 舜吉、安齋 純、永安利江、寺嶋 昭夫、**李 千萬、澤 芳樹、北村正博、村上伸也**：脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生誘導療法 の確立、第 59 回国際歯科研究学会日本部会、2011 年 10 月 8 日、広島

12. **竹立匡秀**：(招待講演)脂肪組織由来間葉系幹細胞移植による歯周組織再生療法の開発、大阪大学歯学部創立 60 周年記念オープンフェスタ in Suita 2011 年 10 月 16 日、大阪
13. 沢田啓吾、**竹立匡秀**、小笹匡雄、岩山智明、野崎剛徳、市川朋生、前田憲一郎、田内拓史、三木康史、大原廣之、伊山舜吉、安齋 純、**北村正博、村上伸也**：実験的歯周病モデルを用いた脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の移植による歯周組織再生、第 135 回秋季保存学会、2011 年 10 月 21 日、大阪
14. **竹立匡秀**：(招待講演)アデノシンによる骨芽細胞分化制御機構、第 113 回大阪大学歯学会例会、2012 年 1 月 12 日、大阪

Ⅱ. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
特願2006-259717PCT:「硬組織複合体再生誘導移植材」出願中
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅱ. 分担研究報告

1. ヒト脂肪組織由来幹細胞の硬組織形成能力の解析に関する研究
齋藤 正寛
2. 歯周組織再生療法の評価法に関する研究
ヒト脂肪組織由来幹細胞を歯周組織細胞へ分化誘導する因子の探索
松下 健二
3. ヒト脂肪組織由来細胞の分化能と安全性に関する解析
阿久津 英憲

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
（分担）研究報告書

ヒト脂肪組織由来幹細胞の硬組織形成能力の解析に関する研究

研究分担者 齋藤 正寛
東京理科大学
基礎工学部 生物工学科・准教授

研究要旨 「歯科再生医療拠点を活用した次世代型歯周組織再生療法の開発」を開発するために、マウス頭蓋冠欠損モデルを用いたヒト脂肪組織由来幹細胞（ADSC）製剤の骨再生能力判定試験の確立を試みた。ADSC 細胞は単独では骨欠損を修復することが出来ないため、骨芽細胞分化誘導培地を用いて骨芽細胞分化誘導を行い、骨再生能力を有するかを試みた。そのため、PGLA-コラーゲンスポンジに ADSC を播種した後に骨芽細胞分化誘導し、長期培養を行い移植した。その結果、単独移植と比較して ADSC の顕著な骨再生誘導能力は認められなかった。この結果より、ADSC 製剤を骨芽細胞へ分化誘導出来ていないため、骨再生能力を十分に引き出せていない可能性が考えられた。今後は ADSC 細胞の骨芽細胞分化誘導を検討し、骨形成能力を損なわず移植できる技術開発の必要性が考えられた。

A. 研究目的

細胞の製剤化を視野に、医薬品 GCP（平成 9 年厚生省令第 28 号「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」と等しいレベルでの科学性を確保した評価系を確立するための昨年度まで、「ヒト脂肪組織由来幹細胞の硬組織形成能力の解析に関する研究の確立を行ってきた。しかし前年度の課題として、ADSC 製剤の再生に適した scaffold の評価系が存在しないため、ADSC 製剤の生体内における骨再生能力を詳細に検討する事が不可能であった。そこで本年度は、ADSC 製剤の骨再生能力を引き出すのに有効な scaffold の選別と、マウス頭蓋冠欠損モデルによる同評価系の確立を試みた。そこで以下に記す動物モデルを用いて研究を行った。

B. 研究方法

(1) ADSC の scaffold 上での分化誘導
増殖期の ADSC を 1×10^6 cells の細胞濃度でコラーゲンゲル（高研）内あるいは PGLA/コラーゲンシートに播種し、24 時間後に細胞接着確認に移植実験に使用した。その後、100nM dexamethasone, 50 μ g/ml ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate にて 10 日間培養した後、マウス頭蓋冠モデルにて移植を行った。

(2) 頭蓋冠欠損モデルを用いた移植実験

ADSC の骨再生能力を判定するため、頭蓋冠欠損モデルを用いて解析した。具体的には免疫不全マウスの頭蓋冠にトレフィンバーを用いて直径 3mm の骨欠損を作製した。次に、(1) にて PGLA/コラーゲンシートに播種した ADSC を欠損部位に移植した。2 ヶ月後に移植片を

取り出し、 μ CT解析、組織解析ならびに免疫組織学的に骨再生能力を判定した。

(3) 骨形成能力の評価

移植部位を脱灰後にパラフィン標本を作成し、HE染色ならびに抗ヒトビメンチン抗体による免疫染色にて、移植部位における骨再生量を判定した。

(倫理面への配慮)

本動物実験は、東京理科大学動物実験委員会の承認を得た上で行われた。

C. 研究結果

1. 骨芽細胞分化誘導を行った ADSC の骨再生能力の評価

PGLA/コラーゲンシート上で骨芽細胞分化誘導培地にて培養した ADSC の骨再生能力を判定する目的で、マウス頭蓋冠欠損部位に移植実験を行った。移植後二ヶ月に ADSC 移植による骨再生能力を μ CTで判定した結果、骨欠損部位の境界面でわずかな新生骨の形成が観察されたものの、骨芽細胞分化誘導を行っていない群と差は認められなかった。一方、細胞を移植していない群においては、骨欠損部位に肉芽組織が形成されており、十分な新生骨の形成は観察されなかった。

2. 移植部位における ADSC の骨再生能力の評価

PGLA/コラーゲンシート+骨芽細胞分化誘導培地/ADSC移植片をHE染色にて解析した結果、骨組織形成が観察された。また抗ヒトビメンチン抗体を用いた免疫染色の結果より、ADSCにより再生された骨組織は、レシピエントの骨組織と連続していることが観察された。

D. 考察

本マウス頭蓋冠欠損モデルに PGLA/コラーゲンシート+骨芽細胞分化誘導培地で ADSC を播種した場合、異種動物を用いたモデルにおいて骨再生を誘導出来る事が判明した。しかし ADSC の骨再生能力を十分に発揮することは出来ず、欠損部に十分な骨再生を誘導することが出来なかった。

今後の課題として、ADSC の骨再生能力を誘導出来るための、細胞外環境の調整するための新たな分化誘導因子ならびに scaffold の選択の必要性が考えられた。

本実験において、ADSC の骨再生能力を十分に検討することは出来なかったが PGLA/コラーゲンシートと骨芽細胞分化誘導培地の組み合わせが ADSC 移植用の足場として適性を示唆する結果を得た。従って同生体材料と培養技術の組み合わせが、ADSC の骨再生能力の判定に有用な生体材料候補の一つになると思われる。

E. 結論

マウス頭蓋冠モデルを用いて ADSC の骨再生能力を判定するプロトコール確立を試みた。PGLA/コラーゲンシート+骨芽細胞分化誘導培地による ADSC の移植技術は、「歯科再生医療拠点を活用した次世代型歯周組織再生療法の開発」の評価系に適していることが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Arakaki, M. Ishikawa, T. Nakamura,

- T. Iwamoto, A. Yamada, E. Fukumoto, **M. Saito**, K. Otsu, H. Harada, Y. Yamada, and S. Fukumoto, Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. *J Biol Chem.* Mar 23;287(13):10590-601 2012.
2. **M. Saito**, T. Tsuji, Extracellular matrix administration as a potential therapeutic strategy for periodontal ligament regeneration. *Expert Opin Biol Ther*, Mar;12(3):299-309, 2012.
3. T. **M. Saito**, M. Kurokawa, M. Oda, M. Oshima, K. Tsutsui, K. Kosaka, K. Nakao, M. Ogawa, R. Manabe, N. Suda, G. Ganjargal, Y. Hada, T. Noguchi, T. Teranaka, K. Sekiguchi, T. Yoneda and T. Tsuji. ADAMTSL6 β rescues fibrillin-1 microfibril disorder in Marfan syndrome mouse model through the promotion of fibrillin-1 assembly. *J Biol Chem.* 4;286(44):38602-38613, 2011.
4. M. Oshima, M. Mizuno, A. Imamura, M. Ogawa, M. Yasukawa, H. Yamazaki, R. Morita, E. Ikeda, K. Nakao, T. Takano-Yamamoto, S. Kasugai, **M. Saito** and T. Tsuji. Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS ONE*, 6(7): e21531, 2011.
5. N. Kanamura, T. Amemiya, T. Yamamoto, K. Mishima, **M. Saito**, T. Tsuji, T. Nakamura. Dental Regenerative Therapy using Oral Tissues. *Anti-Aging Medicine* 9 (1) : 14-23, 2012.
6. 齋藤正寛、辻 孝 : <総説> マルファン症候

群における歯根膜創傷治癒不全の回復機構、*clinical calcium*、22(1):35-42 2012.

7. **齋藤正寛**、辻 孝 : <総説> 蘇る臓器, 再生医療の実現化への挑戦、*科学フォーラム 2011年6月号 (東京理科大学)*、**28**(6)、34-35、2011.
8. 大島正充、**齋藤正寛**、辻 孝 : 次世代の歯科治療システムとしての歯科再生治療～組織修復再生治療と臓器置換再生治療としての歯の再生～、*日本歯科医師会雑誌* 64(5) 、23-34、2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし