

Novel method for preparation of cell sheets using human alveolar bone periosteal cells

Tetsuya Shida, Hiroyuki Takahashi, Kazuhiro Tago and Shinji Deguchi
Department of Oral Medicine, Division of Periodontology, Kanagawa Dental College

Abstract

Tissue engineering using living cells is emerging as an alternative to tissue or organ transplantation. The purpose of the present study was to fabricate cell sheets of a thickness sufficient for transplantation and shortening of the fabrication periods. Human alveolar bone periosteal cells (HABPCs) were seeded at a density of 3.6×10^4 cells/ml on to the 24 wells of temperature-responsive cell culture dishes at 1, 7, and 11 days. Fourteen days after the first seeding, the HABPC sheets were harvested from 15 of the temperature-responsive culture dishes and stacked one over the other to fabricate HABPC multilayered sheets. The HABPC multilayered sheets were cultured for 1, 3, or 5 days and examined by histological and immunohistochemical analyses. Alkaline phosphatase staining and immunohistochemical staining for anti human type I collagen, osteopontin, osteocalcin, and runt-related transcription factor 2 showed that HABPC differentiation occurring from the outer layers of the HABPC multilayered sheets. The results suggested an increase in bone new bone formation from 3 to 5 days. Mineralized-like tissues were observed in the HABPC multilayered sheets with von Kossa staining at three days. In this study, we were able to shorten the fabrication period of the HABPC multilayered sheets by using a higher cell density for the initial cell seeding into the temperature-responsive cell culture dishes. In addition, we have reported method for the preparation of HABPC multilayered sheets of sufficient thickness for transplantation.

Key words : cell sheet, temperature-responsive cell culture dish, periosteal cell

要旨

生きた細胞を用いる組織工学が、組織や臓器移植に代わる手法として浮上してきている。本研究の目的は、移植片として使用できる厚みを持つ細胞シートの作製、および作製期間の短縮化である。ヒト歯槽骨骨膜由来細胞(HABPCs)を24穴の温度応答性培養器材へ初日と7, 11日後に同じウェル上に 3.6×10^4 cells/mlの濃度で播種した。初回の播種より14日後、他のウェルから回収した15枚の細胞シートを一箇所の細胞シート上に積層し、HABPC積層細胞シートを作製した。HABPC積層細胞シートを1, 3, 5日培養し、組織学的、免疫組織化学的に観察した。alkaline phosphatase染色およびI型コラーゲン、オステオポンチン、オステオカルシン、runt-related transcription factor 2による免疫染色より、経時的にシート表層からHABPCsの分化が促進されたと考えられ、3日目から5日目にかけて骨形成能が上昇したことが示唆された。von Kossa染色では3日目より石灰化様組織の形成が認められた。本研究において、温度応答性培養器材を使用し、初期細胞播種濃度を増やすことにより、作製期間の短縮化が可能となった。さらに、移植片として単独で使用できる十分な厚みを持ったHABPC積層細胞シートの作製方法が示唆された。

キーワード：細胞シート、温度応答性培養器材、骨膜細胞

緒言

歯周病は口腔内における最も主要な疾患であり、歯周病による歯周組織の喪失は、歯牙の動揺や脱落による機能的な障害や、歯肉退縮による審美的な障害などを引き起こし、QOLを大きく低下させる。歯周治療における最大の目標は、歯周病により失われた歯周組織の完全な再生である。歯周病に対する一般的な治療法は、原因物質および感染組織の物理的な除去と、根面への組織付着を促すものが大半である。しかし、炎症をコントロールし、症状を治癒させることが出来たととしても、歯周組織の再生は殆ど望めなかった。

そのような背景を受け、組織再生誘導法(guided tissue regeneration : GTR法)¹⁾やエナメル基質タンパク(enamel matrix

derivative : EMD)²⁾が開発された。GTR法は上皮の侵入を防ぐことでスペースメイキングを可能とし、歯根膜由来細胞の誘導を促すことが出来るが、残存骨壁が少ない場合には対応できず、適応が限られている。EMDを用いる方法は、根面と骨欠損部へエムドインゲルを塗布する方法であるため、GTR法より適応範囲が広く手技は容易であるが、スペースメイキングの点で乏しい。互いの欠点を補えるように双方を併用した治療法を用いることによって適応範囲の拡大を図る場合もあるが³⁾、術中操作がより煩雑となってしまう。

さらに、近年では組織再生工学を用いた手法や、組織再生促進のための補助的因子の開発が進み、それらを臨床へ応用すべく様々な研究が行われている。単独で異所性骨形成シグナルとしての作用を有し、強い骨誘導能を持つとされるサイトカインであ

る骨形成タンパク-2(bone morphogenetic protein-2 : BMP-2)⁴⁾は、骨形成促進を目的として整形外科や歯科の分野で研究されている。また、多血小板血漿⁵⁾は、形質転換増殖因子-β (transforming growth factor-β : TGF-β)や血小板由来増殖因子、上皮細胞成長因子などの因子を放出し、創傷治癒を促進させる^{6,7)}。歯科の分野ではインプラント埋入前処置として骨再生誘導療法にも用いられている。細胞間シグナル分子である塩基性線維芽細胞増殖因子は、線維芽細胞や血管内皮細胞などの細胞増殖を刺激することが報告されており⁸⁾、血管新生を促すことで、組織再生の促進が期待されている。

理想的な組織再生療法には、簡便な操作性や外科的侵襲の低さ、高い安全性と生体親和性、組織再生量や再生後の形態に対する高い予知性などが求められる。自家の細胞を用いた組織工学的手法^{9,10)}は、足場・細胞・増殖因子という再生の3要素¹¹⁾が揃っており、組織再生療法の理想形に近いと考えられている。

組織再生工学の中でも、自家の培養細胞を用いた細胞シートの研究が注目されており、多くの研究が報告されている。医科の分野では心筋¹²⁾や食道および胃粘膜¹³⁾、角膜¹⁴⁾の再生に応用され、再生医療における新たなアプローチとして研究が進められている。歯科の分野では、歯根膜細胞¹⁵⁾、骨膜細胞^{16,17)}、歯肉上皮細胞¹⁸⁾、口腔粘膜細胞¹⁹⁾などを用いた細胞シートの研究が行われている。また、これらの細胞シートを用いた研究において、温度応答性培養器材²⁰⁻²²⁾が多用されている。温度応答性培養器材は、温度応答性高分子

(N-isopropylacrilamide)を培養器材表面に固定しており、温度変化のみで表面性状を親水性と疎水性に変化させ、細胞と培養器材における接着をコントロールすることができる。温度応答性培養器材を用いることにより、産生された細胞外基質や細胞間結合を破壊することなく、培養された状態を維持したまま、細胞をシート状に回収することが可能となった。

以前、尾形らはヒト歯槽骨骨膜由来細胞を用いた細胞シートを折りたたみ、移植片を作製し、移植片内の細胞が骨芽細胞へ分化した可能性を示唆した¹⁷⁾。しかし、細胞を培養皿に播種した後、細胞シートを作製するまでに4週間の期間を要するため、作製期間の短縮化が課題であった。

本研究の目的は、移植片として単独で使用できる十分な強度と厚みを持つ細胞シートの作製、および細胞シート作製までの期間を短縮することである。また、作製した細胞シートを1, 3, 5日間培養し、組織学的、免疫組織化学的に観察し、その経時的変化について検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

本研究には、神奈川歯科大学附属病院に来院した歯周病患者(45歳・女性)から採取した細胞を用いた。神奈川歯科大学倫理委員会承認(承認番号：第178番)のもと、インフォームドコンセントを得た上で、歯周外科処置時に部分層弁にて剥離を行い、歯槽骨上にある骨膜組織を5×5mm²程度採取した。採取した骨膜組織を細分化した後、100mm培養皿(Becton, Dickinson and

Company, USA)上に静置した状態を保ち培養した。細胞培養液は α -Minimum Essential Medium(GIBCO, USA)に10%ウシ胎児血清(FCS: Whitter Bioproducts, USA), 0.25 mM L-ascorbic acid 2-phosphate(WAKO, 大阪)および100 units/ml penicillin(GIBCO, USA), 100 μ g/ml streptomycin(GIBCO, USA), 3.5mg/mlのD-glucose (WAKO, 大阪)を添加した培地(α -MEM)を使用し, 2日間毎に培地交換を行った。その後, 骨膜組織から遊走してきた細胞をヒト歯槽骨骨膜由来細胞(human alveolar bone periosteal cells: HABPCs)の初代培養細胞とした。HABPCsがコンフルエントに達した後, 細胞濃度を 1.8×10^4 cells/mlに調整し, 37°C, 5% CO₂の環境にて継代培養を行った。本研究では, 細胞シート作製に必要な細胞を得るため, 初代培養細胞より1週間ごとに継代培養し, 継代3代目および4代目のHABPCsを使用した。なお本研究はヘルシンキ宣言を遵守し行った。

2. HABPC 積層細胞シートの作製

HABPC 積層細胞シートの作製のため, 継代3代目のHABPCsを 3.6×10^4 cells/mlの濃度で, 24穴マルチウェルの温度応答性培養器材(UpCell®: Cell Seed, 東京)へ播種し, 37°C, 5% CO₂の環境で α -MEM培地にて培養した。7日後, コンフルエントに達したHABPCs上に継代4代目のHABPCsを同じ細胞濃度で播種し, その4日後にさらに継代4代目のHABPCsを同じ細胞濃度で播種した。その後3日間培養した。培養期間中に用いた培地は2日毎に交換した。細胞を播種したUpCell®を

室温22°Cにて15分間静置した後, HABPC 積層細胞シート作製のため, 支持体であるCell Shifter(Cell Seed, 東京)を用い, UpCell®の各ウェルより細胞をシート状のまま剥離し, 一箇所のウェル上へ15枚の細胞シートを重ねて設置した。合計16枚の細胞シートを積層させることにより三次元構造を与え, HABPC 積層細胞シートを作製した。合計15個のHABPC 積層細胞シートを作製し, 1, 3, 5日培養するグループ(n=5)に分けて α -MEM培地にて培養した。

3. 組織学的検索

培養したHABPC 積層細胞シートは, 各期間培養後, 4%パラホルムアルデヒド水溶液中で, 4°C, 6時間の固定を行った。その後, パラフィン包埋を行い, ミクロトームを用いて厚さ約4 μ mの切片を作製した。作製した切片を, キシレン(WAKO, 大阪)および100%, 95%, 90%, 80%, 70%のアルコールにて順次脱パラフィンを行い, ヘマトキシリン(WAKO, 大阪)・エオシン(WAKO, 大阪)染色(HE染色)およびALP染色キット(WAKO, 大阪)によるalkaline phosphatase(ALP)染色を行った。von Kossa染色は紫外線下で5%硝酸銀水溶液(WAKO, 大阪)に1時間反応させ, 水洗した後5%チオ硫酸ナトリウム水溶液(WAKO, 大阪)に5分間反応させた。再度水洗し, ケルンエヒトロート水溶液(武藤化学, 東京)にて対比染色を行った。

4. 免疫組織化学的検索

組織学的検索と同様の方法にて切片を作製し, 脱パラフィン後に10%正常ヤギ血清(normal goat serum: NGS)にてブ

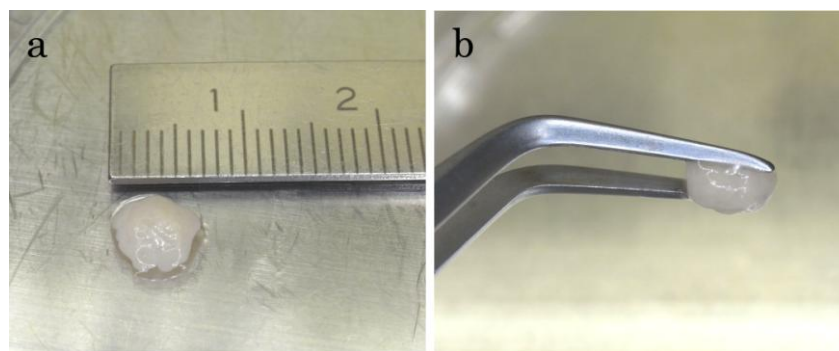


図1 作製 HABPC 積層細胞シート

a: サイズ計測。

b: ピンセットによる把持。

表1 細胞数と抗体反応陽性率

| 培養日数 (日) | 平均細胞数 (800 μ m \times 1200 μ m) | Col- I 陽性反応数 /平均細胞数 | OPN 陽性反応数 /平均細胞数 | OC 陽性反応数 /平均細胞数 | Runx2 陽性反応数 /平均細胞数 |
|-------------|--|--|---|--|---|
| 1 | 805.9 \pm 70.0 | 19.0 \pm 5.5 ($\times 10^{-3}$) | 12.6 \pm 3.2 ($\times 10^{-3}$) | 8.9 \pm 3.0 ($\times 10^{-3}$) | 13.1 \pm 3.1 ($\times 10^{-3}$) |
| 3 | 854.9 \pm 59.8 [‡] | 52.9 \pm 7.9 ($\times 10^{-3}$) [*] | 50.8 \pm 6.3 ($\times 10^{-3}$) [*] | 48.9 \pm 9.7 ($\times 10^{-3}$) [*] | 54.0 \pm 6.4 ($\times 10^{-3}$) [*] |
| 5 | 1005.8 \pm 54.6 ^{*†} | 95.7 \pm 10.5 ($\times 10^{-3}$) ^{*†} | 41.6 \pm 7.0 ($\times 10^{-3}$) ^{*†} | 65.2 \pm 10.3 ($\times 10^{-3}$) ^{*†} | 41.4 \pm 4.9 ($\times 10^{-3}$) ^{*†} |

^{*} compared with 1day group, significant difference $p < 0.01$

[‡] compared with 1day group, significant difference $p < 0.05$

[†] compared with 3days group, significant difference $p < 0.01$

ロッキングを行った。一次抗体は、抗ヒト I 型コラーゲン (Col- I) ラビット抗体 (1/200: 株式会社エル・エス・エル, 東京), 抗ヒトオステオカルシン(OC)ラビット抗体(1/25: Biomedical Technologies Inc, USA), 抗ヒトオステオポンチン(OPN)ラビット抗体 (1/1500: SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, USA), 抗ヒト runt-related transcription factor 2 (Runx2)ラビット抗体 (1/50: SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, USA)を用い、4°Cで一晩反応させた。二次抗体と発色には Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG Antibodies (Life Technologies, USA)を用いて室温で1時間作用させた。また、1, 3, 5日培養した各グループの切片へ、同様の二次抗体および発色材を1時間作用させ、ネガティブコントロールとした。観察

は蛍光顕微鏡(BH2-RFCA: OLYMPUS, 東京)にて行った。

5. 統計分析

本研究では、1, 3, 5日培養した各グループの HE 染色像において、5箇所、800 μ m \times 1200 μ m の範囲を任意に選択し(n=5, 計 25 箇所), その範囲内にて計測した細胞核数の平均値を各グループの細胞数とした。

ネガティブコントロール像より免疫陽性反応が特異的であることを確認した後、画像解析ソフト ImageJ (Ver. 1.46: U.S. National Institutes of Health, USA)を用い、HE 染色で得られた細胞の大きさを参考に免疫染色陽性反応を示した箇所を計測し、平均細胞数で除した数値を各々平均することで、各グループにおける免疫陽性反

応率の値とした。統計分析は Dr.SPSS II (Ver. 1.1 : IBM SPSS, USA)を用いて、分散分析後、Tukey 法による多重比較検定を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

1. 作製 HABPC 積層細胞シート

UpCell® 上で培養した HABPCs は、Cell Shifter にてシート状に剥離することが可能であった。細胞シートを 16 枚積層させることにより、弾力性を持った HABPC 積層細胞シートが細胞播種後 14 日目で作製できた。移植片は、ピンセットで把持し、移動させることが可能であり、それにより形態を損なうことは無かった。作製した HABPC 積層細胞シートの大きさは作製直後の状態で、直径が 5~6mm、厚さは 1.5~2mm 程度であった(図 1- a, b)。

2. 組織学的所見

HE 染色において、1 日培養したグループでは、HABPC 積層細胞シート内部に大きな空隙がいたるところに観察された(図 2-a, b)。この空隙は 3 日培養したグループにおいて、明らかに狭小化し(図 2-c, d)、5 日培養したグループにおいて、さらに狭小化した(図 3-e, f)。また、空隙の狭小化は培養皿と接していなかった面において積極的に起こる傾向が認められた。

平均細胞数では全てのグループ間で有意差が認められた(1 日と 3 日培養のグループ間にて $p < 0.05$ 、その他のグループ間比較にて $p < 0.01$)。1 日培養したグループが最も平均細胞数が少なく、5 日培養したグループが最も多い結果であり、経時的な細胞の

増殖が示された(表 1)。

ALP 染色では 1 日培養したグループにおいて既に陽性反応が認められており(図 3- a, b)、3 日および 5 日培養したグループにおいてもそれぞれ陽性反応が観察された(図 3- c, d, e, f)。各グループに共通して、培養皿に接していた面において陽性反応は明らかに少なく、培養液と接している反対側に多くの陽性反応を示す傾向が認められた。

von Kossa 染色では 1 日培養したグループにおいて全ての試料で陽性反応は認められなかった(図 4- a, b)。3 日および 5 日培養したグループにおいて、全ての HABPC 積層細胞シートの表層にて僅かな箇所石灰化様組織の形成が認められた(図 4- c, d, e, f)。また、いくつかの試料において、HABPC 積層細胞シートの内部にも石灰化様組織が認められた。

3. 免疫組織化学的所見

Col- I 陽性所見は、1 日培養したグループでは、HABPC 積層細胞シートの表層に若干の陽性反応を認めた(図 5- a)。3 日および 5 日培養したグループでは、HABPC 積層細胞シート表層から内部へ陽性反応の増加を認め(図 5- b)、5 日培養したグループにおいては表層に著明な陽性反応を認めた(図 5- c)。

OPN 陽性所見は、1 日培養したグループでは、HABPC 積層細胞シートの表層に若干の陽性反応を認め(図 6- a)、3 日培養したグループにおいては表層に著明な陽性反応を認めた(図 6- b)。5 日培養したグループにおいては内部へ陽性反応の増加を認めたが、表層における反応は減少傾向であった(図 6- c)。

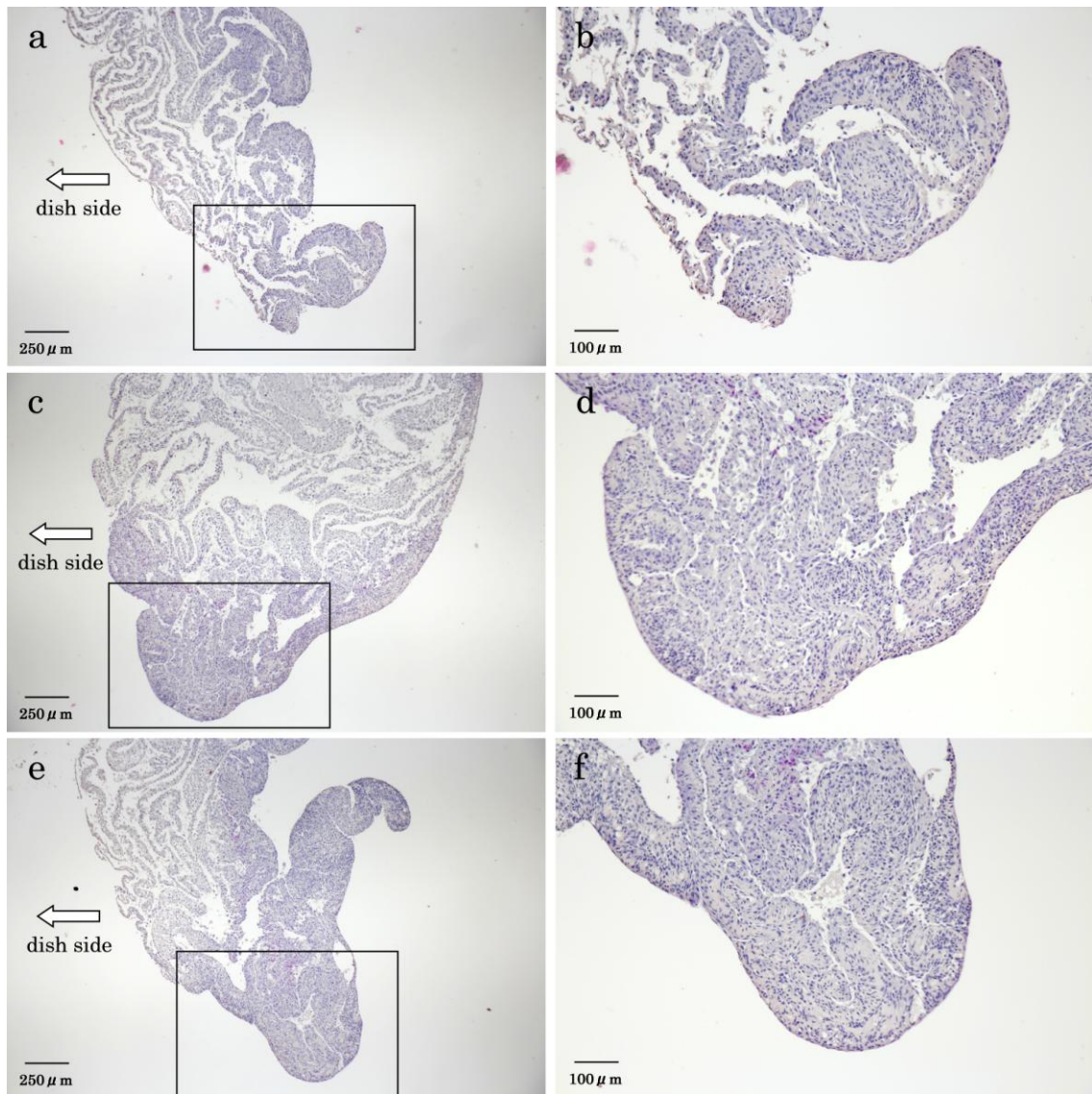


図2 HE 染色像

- a: 1日培養グループ。細胞シート間の接着が不完全であり、いたるところに空隙が認められた。
- b: 図a 実線範囲拡大像。
- c: 3日培養グループ。図a と比較し、細胞シート間の空隙は狭小化した。
- d: 図c 実線範囲拡大像。
- e: 5日培養グループ。培養皿に接していない面において細胞シート間の空隙はさらに狭小化した。
- f: 図e 実線範囲拡大像。

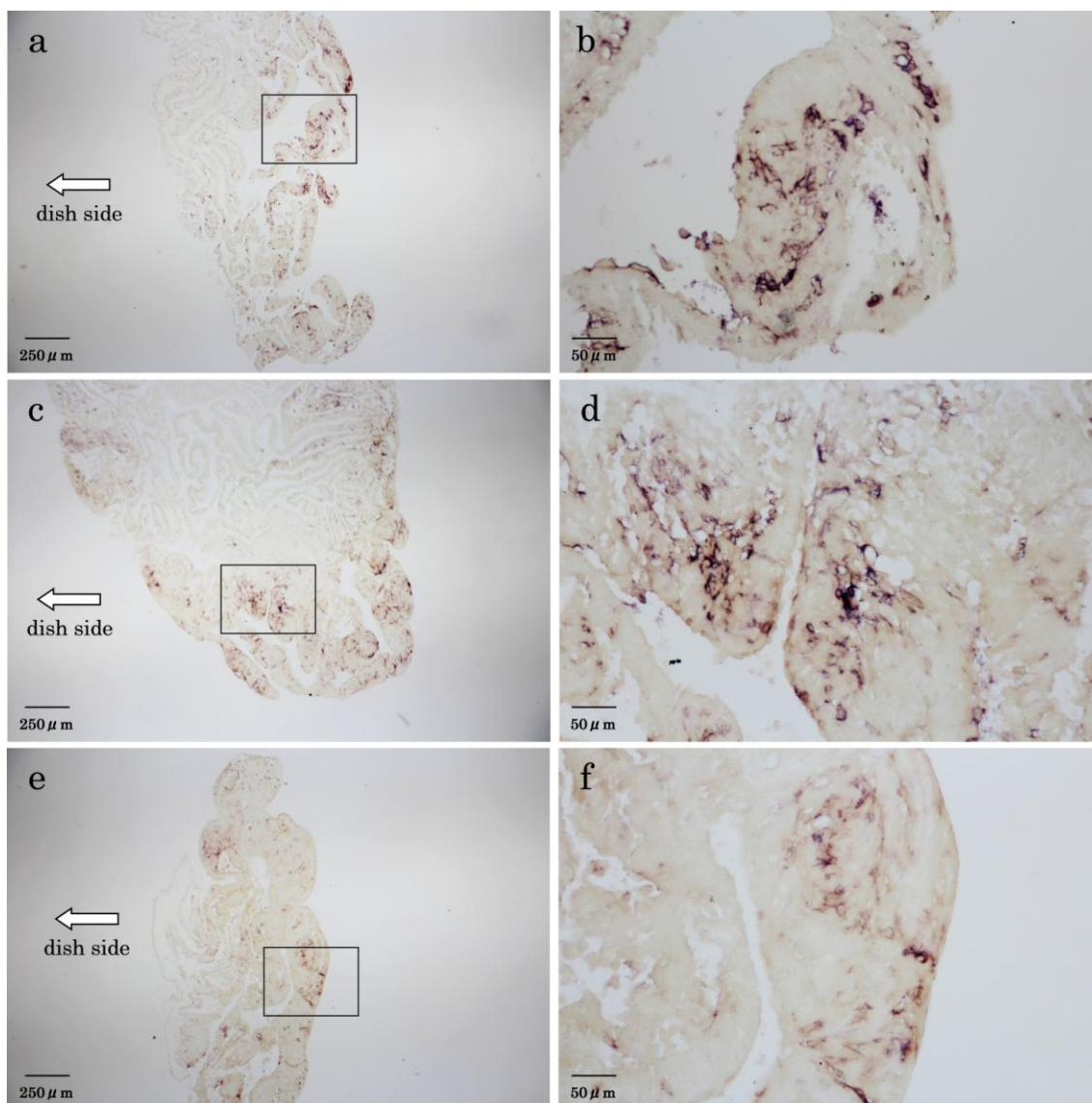


図3 ALP 染色像

a: 1日培養グループ。培養皿に接していない面において多くの陽性反応が認められた。

b: 図a 実線範囲拡大像。

c: 3日培養グループ。培養皿に接していない面において多くの陽性反応が認められた。また、図aと比較し、培養皿に接していた面においても陽性反応が増加した。

d: 図c 実線範囲拡大像。

e: 5日培養グループ。図a, cと比較し、陽性反応は減少した。

f: 図e 実線範囲拡大像。

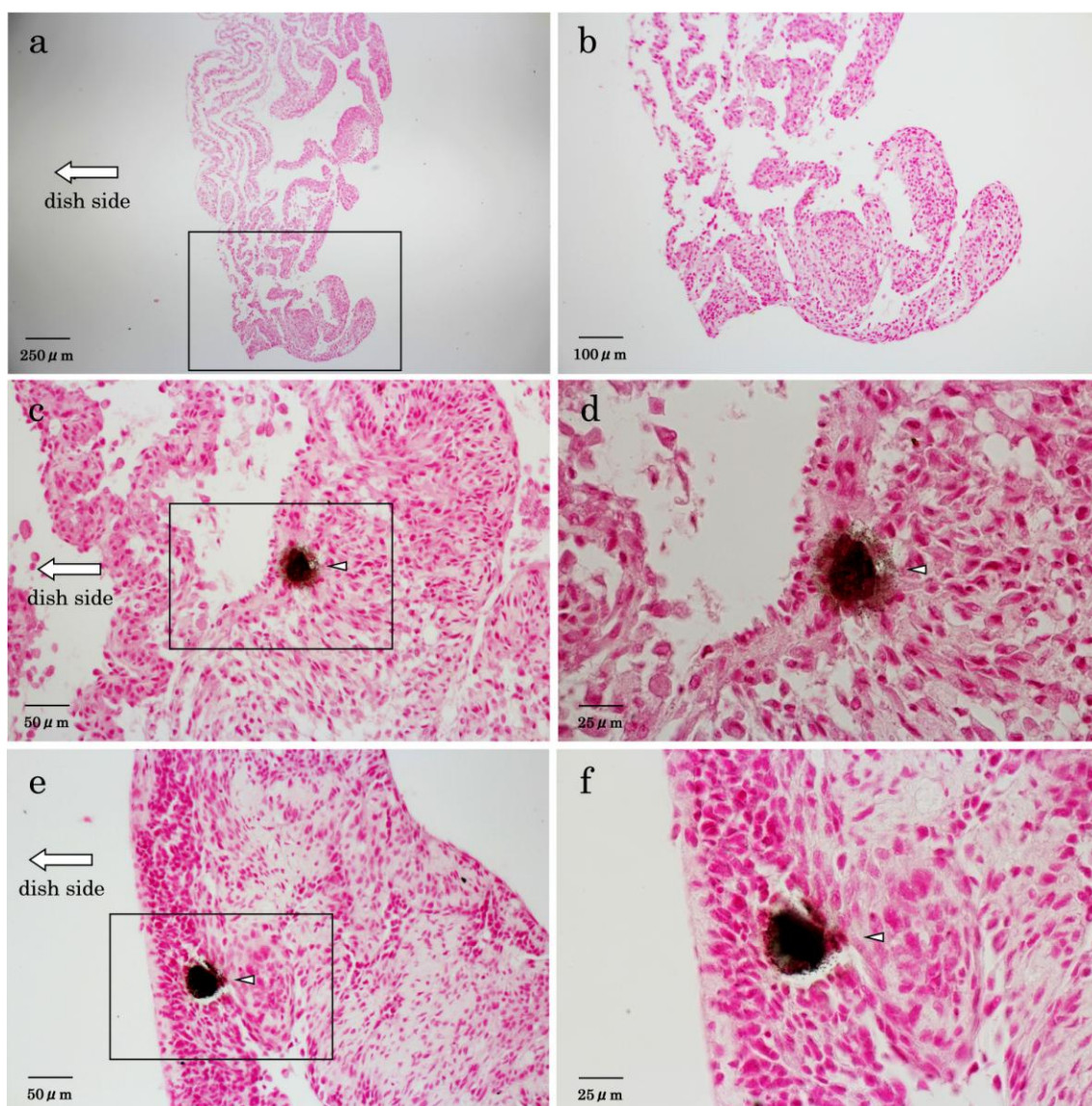


図4 von Kossa 染色像

- a: 1日培養グループ。陽性反応は認められなかった。
- b: 図a 実線範囲拡大像。
- c: 3日培養グループ。石灰化様組織の形成が認められた(矢頭)。
- d: 図c 実線範囲拡大像。石灰化様組織の形成が認められた(矢頭)。
- e: 5日培養グループ。石灰化様組織の形成が認められた(矢頭)。
- f: 図e 実線範囲拡大像。石灰化様組織の形成が認められた(矢頭)。

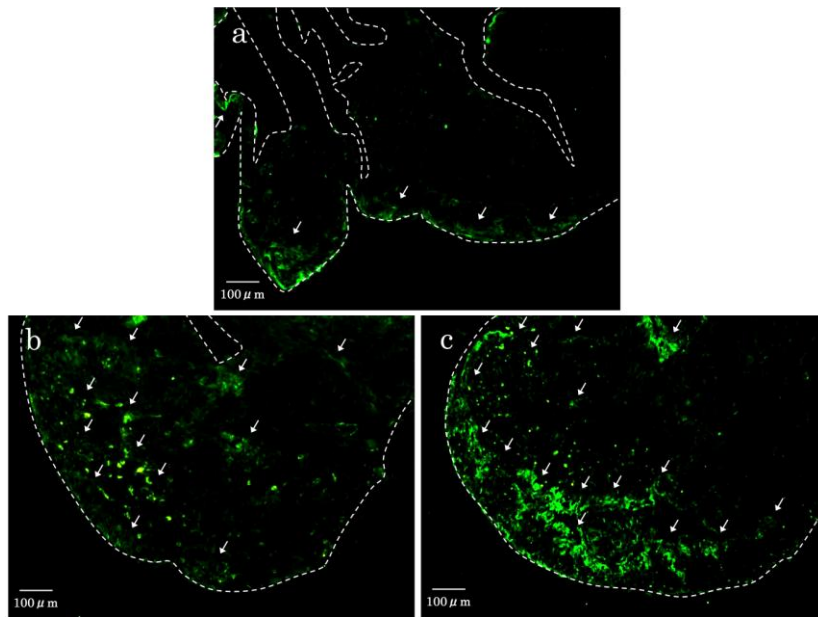


図5 Col-1 免疫染色像

- a: 1日培養グループ。HABPC 積層細胞シート表層に若干の陽性反応を認めた(矢印)。
 b: 3日培養グループ。HABPC 積層細胞シート表層から内部へ陽性反応の増加を認めた(矢印)。
 c: 5日培養グループ。HABPC 積層細胞シート表層に著明な陽性反応を認めた(矢印)。

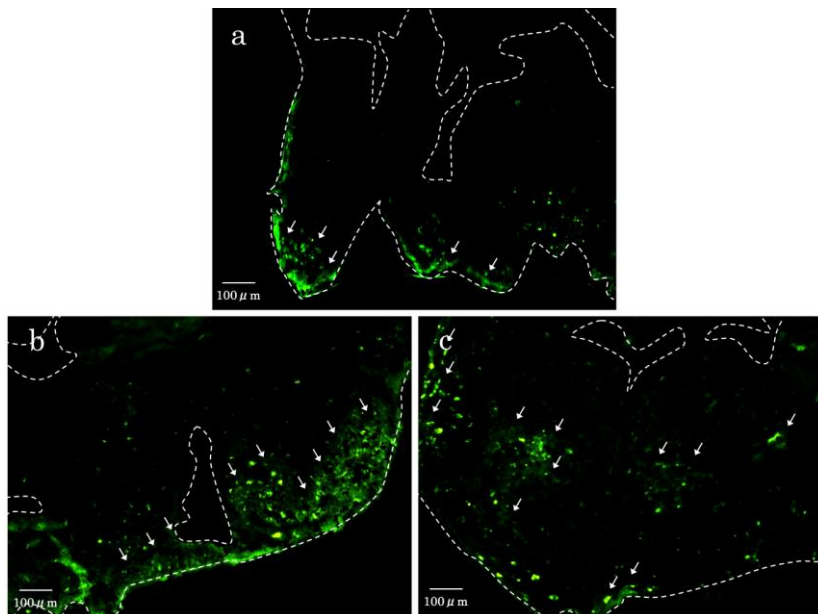


図6 OPN 免疫染色像

- a: 1日培養グループ。HABPC 積層細胞シート表層に若干の陽性反応を認めた(矢印)。
 b: 3日培養グループ。HABPC 積層細胞シート表層に著明な陽性反応を認めた(矢印)。
 c: 5日培養グループ。HABPC 積層細胞シート内部へ陽性反応の増加を認めた(矢印)が、表層における反応は減少傾向であった。

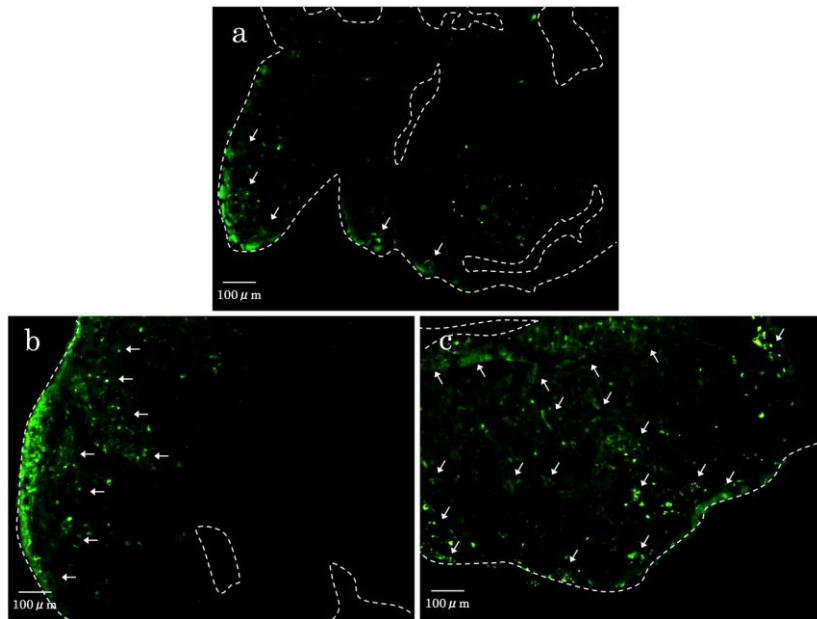


図7 OC免疫染色像

- a: 1日培養グループ。HABPC 積層細胞シート表層に僅かな陽性反応を認めた(矢印)。
 b: 3日培養グループ。HABPC 積層細胞シート表層に著明な陽性反応を認めた(矢印)。
 c: 5日培養グループ。HABPC 積層細胞シート表層から内部へ陽性反応の増加を認めた(矢印)。

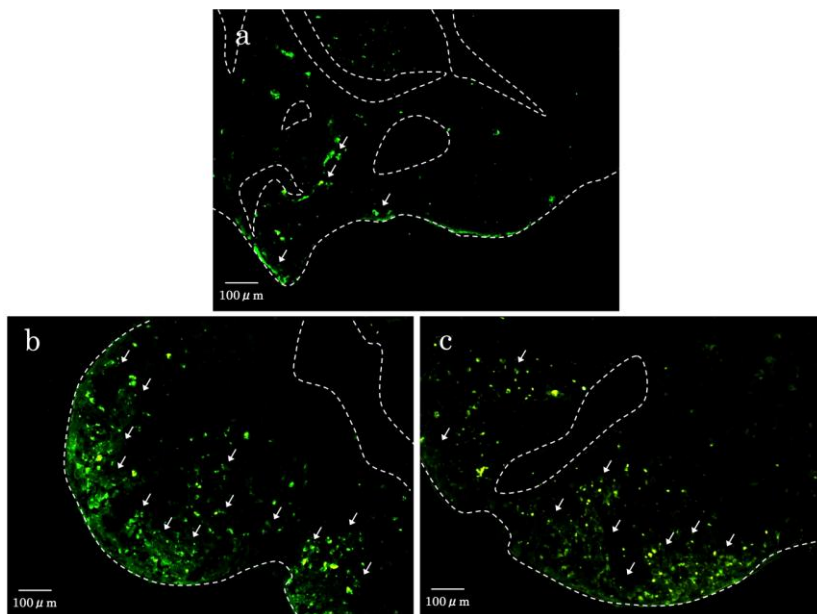


図8 Runx2免疫染色像

- a: 1日培養グループ。HABPC 積層細胞シート表層に僅かな陽性反応を認めた(矢印)。
 b: 3日培養グループ。HABPC 積層細胞シート表層に著明な陽性反応を認めた(矢印)。
 c: 5日培養グループ。HABPC 積層細胞シート表層に著明な陽性反応を認めた(矢印)が、3日培養グループと比較してその数は減少傾向であった。

OC 陽性所見は、1日培養したグループでは、HABPC 積層細胞シートの表層に僅かな陽性反応を認めた(図 7- a)。3日培養したグループにおいては表層に著明な陽性反応を認めた(図 7- b)。5日培養したグループにおいては、内部へ陽性反応の増加を認めた(図 7- c)。

Runx2 陽性所見は、1日培養したグループでは、HABPC 積層細胞シートの表層に僅かな陽性反応を認めた(図 8- a)。3日および5日培養したグループでは、HABPC 積層細胞シート表層に著明な陽性反応を認めた(図 8- b, c)。

なお、Col- I, OPN, OC, Runx2 のいずれの免疫染色像においても全てのグループ間で明らかな有意差が認められた($p < 0.01$)。OPN および Runx2 においては、3日培養したグループが最も陽性反応が多く、Col- I および OC においては、5日培養したグループが最も陽性反応が多い結果となった(表 1)。

考察

骨表面を覆う結合組織である骨膜は、骨側の骨形成層とその外層に存在する線維層の2層より構成される。骨形成層には骨芽細胞など骨形成能を有する細胞が含まれており、骨の成長や修復、再生に関与する。本研究で用いた骨膜組織は、骨形成細胞を含んでいる可能性の高い、歯槽骨側より採取した。

組織学的所見では、全ての試料において HABPC 積層細胞シートを構成する細胞シート間に空隙が観察された。この空隙は、HABPC 積層細胞シート作製時の細胞シ-

ートを重ねる工程において生じたと考えられる。これは我々が以前行った研究²³⁾においても認められていた。また、この空隙は経時的に狭小化を示した。このことは、細胞シートを構成する細胞の増殖と細胞外基質の産生による細胞間結合の増加などにより、HABPC 積層細胞シート自体が収縮したことによるものと考えられる。培養皿に接していた側では空隙の狭小化は起き難く、反対側では細胞シート同士が密着し、空隙が消失するなど狭小化が積極的に起こる傾向であった。これは、培養皿と接していない面がより培地に接し、栄養の供給が得られ易い環境であり、細胞増殖や細胞外基質の産生が盛んに生じたためと考えられる。今回、細胞の生死を特異的に確認してはいないが、HE 染色像にて観察した限りでは、HABPC 積層細胞シート内部にネクローシスの所見は全ての試料において存在しないように思われた。これは、前述の空隙へ培養液や酸素が浸透・拡散することで、複数の細胞シートが積層されていても栄養供給が十分に行われていたためと考えられる。しかし、これらについては今後、HABPC 積層細胞シート内部の細胞の生死判定を詳しく行い、調査する必要がある。

骨芽細胞は骨形成に重要な役割を担い、Col- I, ALP, OPN, OC などの特異的な遺伝子を発現する。骨芽細胞の分化の初期より Col- I 基質が形成され、ALP, オステオネクチン, OPN, OC などの遺伝子が順次発現し、タンパク量の上昇が起こる。産生された骨基質は、最終的に細胞外へ沈着していく²⁴⁻²⁷⁾。

Col- I は骨基質の 90 %を占めるタンパク質であり、ハイドロキシアパタイト結晶

の沈着による石灰化により骨が形成される²⁸⁾。その含有量は骨の強度に深く関わっており、Col-I 量の低下は骨粗鬆症などを引き起こす。また、未分化の前骨芽細胞の増殖のための足場としての役割も担う。さらにインテグリンなどの細胞接着分子と結合し、細胞内シグナルを活性化する働きもある²⁹⁾。本研究における免疫組織化学的検索では、1日培養したグループにおいてHABPC 積層細胞シートの表層より若干の陽性反応を認め、3日培養したグループでは表層および内部方向へ陽性反応が増加した。そして、5日培養したグループにおいては、表層で特に著明な反応を示した。これらの結果は、HABPC 積層細胞シートの表層より骨形成が開始される可能性を示唆している。

リン酸エステルを無機リンとアルコールに分解する酵素であるALPは、骨組織における骨芽細胞のみならず前骨芽細胞においても存在し、骨芽細胞分化の初期にその発現が認められる。そのため骨芽細胞分化のマーカーとして重要視されている³⁰⁾。本研究では1日培養したグループにおいて既に著明な陽性反応が認められ、3日および5日培養したグループにおいても陽性反応が認められた。どの試料においても培養皿に接触していない面の表層において陽性反応が著明に示された。本研究では、ALP染色像において統計分析は行わなかったが、陽性反応を示す部位は経時的に減少傾向を示した。これらの結果より、HABPCsの分化は培地に接していた面の表層から開始され、1日目から5日目にかけてHABPC 積層細胞シート内の骨形成能が上昇した可能性が示唆された。

OPNは骨組織に含まれ、骨のリモデリングやメカニカルストレスの調節に関わる骨基質タンパクである^{31, 32)}。OCは成熟骨芽細胞に特異的に認められる非コラーゲン性タンパク質であり、Runx2やActivating transcription factor-4によりその発現が調節される^{33, 34)}。本研究ではOPN、OCともに1日培養したグループにおいてHABPCs 積層細胞シートの表層より非常に僅かな陽性反応を認め、3日培養したグループにおいて表層の反応は著明となった。そして、5日培養したグループではHABPCs 積層細胞シートの内部方向へ陽性反応が増加していった。さらに、統計学的分析により、OPNは3日培養したグループの陽性反応数が最も多く、5日目にかけて減少し、OCは1日目から5日目へと陽性反応率は有意に増加していた。この結果は、骨芽細胞分化マーカーの発現様式と一致しており、これらのことから、1日目から5日目にかけてHABPCs 積層細胞シート内の骨形成能が表層から内部へ向かって上昇したと考えられた。

骨芽細胞は前述の骨基質タンパクに加え、TGF- β 、BMPなどのサイトカインを産生し、骨組織の維持や再生、代謝に重要な役割を担っている。BMPによって発現誘導が認められる遺伝子として、Runx2、Osterix/Sp7などが確認されている³⁵⁾。Runx2は骨形成の分子基盤をなす転写因子であり、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化に必須な役割を果たす。Osterix/Sp7は前骨芽細胞から骨基質タンパクを形成する未熟骨芽細胞へ分化させるとともに、軟骨細胞への分化を抑制する。骨芽細胞へ分化した後、Runx2は骨芽細胞を未熟な分化

段階に保ち、骨細胞への移行を抑制する³⁶⁾。即ち、骨の成熟には骨芽細胞への分化後に **Runx2** の発現が抑制されていくことが必要となる。本研究では 1 日培養したグループにて **HABPC** 積層細胞シート表層より僅かに陽性反応を認め、3 日および 5 日培養したグループでは表層に著明な反応を認めた。また、統計学的分析により、3 日培養したグループの陽性反応率が最も高く、5 日目にかけて減少したことが明らかとなった。これらのことより、3 日目から 5 日目にかけて **Runx2** の発現の抑制が始まり、**HABPC** 積層細胞シート内の細胞が骨形成能を発揮できる状態となっていた可能性が考えられた。

von Kossa 染色において、1 日培養したグループにおいては、全ての試料で石灰化様組織は観察されなかったが、3 日および 5 日培養したグループでは全ての試料の 1~3 箇所に石灰化様組織が認められた。この結果は、**UpCell**® を用い、16 枚の細胞シートを積層させることにより、平面培養では得ることのできない 3 次元的な培養環境が得られたことと、それにより **HABPCs** 内部に含まれているとされる骨形成細胞が、石灰化に必要なコラーゲン基質をより多く得ることができたため、石灰化誘導物質を添加していない通常の培地による培養においても石灰化様組織を生じ得たものであると考えられた。石灰化様組織が形成された箇所は、**HABPC** 積層細胞シートの表層が大半であったが、内部に形成された試料も存在した。いくつかの試料において **HABPC** 積層細胞シート内部で早期に石灰化様組織の形成を認めたことは、本研究での **HABPC** 積層細胞シート表層より石灰

化が起こるという結果と矛盾するものである。**Li** らは間葉系幹細胞を有するヒト歯髄細胞における研究において、低酸素状態は歯髄細胞に石灰化を誘導させたと報告している³⁷⁾。本研究で用いた骨膜細胞においても間葉系幹細胞が含まれているとされている³⁸⁾。本研究の **HE** 染色による組織学的検索における限りでは、**HABPC** 積層細胞シート表層から内部までネクロシスの所見は 5 日目まで認められなかったが、16 枚という多層の細胞シートにより構成されるものであり、**HABPC** 積層細胞シートの内部は表層と比較して低酸素状態であったことが予想される。よって、低酸素状態が **HABPC** 積層細胞シート内部における石灰化に影響を及ぼしていた可能性が考えられる。この矛盾点の解明については今後のさらなる研究が必要となる。

本研究によって **HABPC** 細胞シートを複数枚積層し、単独で移植が可能と思われる十分な厚みを持った **HABPC** 積層細胞シートの作製方法が示唆された。尾形らの研究¹⁷⁾と比較し、初代培養細胞より細胞シート作製に必要な細胞が得られた後、温度応答性培養器材である **UpCell**® を用い、初期細胞播種濃度を 2 倍に調整し、3 回目の細胞播種の時期を短縮することで、半分の期間の 2 週間で細胞シートを作製することが可能であった。作製した **HABPC** 積層細胞シートは、石灰化誘導物質を添加していない通常の培地による培養において、石灰化を引き起こした可能性が考えられた。組織学的、免疫組織化学的検索により、**HABPC** 積層細胞シートは、経時的にシート表層より **HABPCs** の分化が促進されたと考えられ、特に 3 日目から 5 日目にかけて

て HABPC 積層シート内部の骨形成能が上昇したことが示唆された。今後、より長期間の培養を行い、その経時的変化について検索する必要がある。また、本研究において用いた細胞は、単一の被験者より得られた細胞であるため、今後、被験者数を増やし、本研究結果との差異を確認すべきである。さらに、本研究における 1, 3, 5 日培養グループ各々の結果を踏まえ、動物実験モデルにおいて移植片の生体内における経時的変化を比較検討することにより、移植に最適な培養期間を導き出すことも重要である。

本論文の要旨は、第 55 回春季日本歯周病学会学術大会(平成 24 年 5 月 19 日)において発表した。

文献

- 1) Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 9 : 290-296, 1982.
- 2) Heijl L : Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol*, 24 : 693-696, 1997.
- 3) Sculean A, Windisch P, Chiantella GC, Donos N, Brex M, Reich E : Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. *J Periodont Res*, 28 : 397-403, 2001.
- 4) Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR : Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*, 324 : 39-46, 1996.
- 5) Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H : Platelet- rich plasma- derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol*, 74 : 858-864, 2003.
- 6) Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H : Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*, 74 : 849-857, 2003.
- 7) Bertrand-Duchesne MP, Grenier D, Gagnon G : Epidermal growth factor released from platelet-rich plasma promotes endothelial cell proliferation in vitro. *J Periodont Res*, 45 : 87-93, 2010.
- 8) Shimabukuro Y, Ichikawa T, Takayama S, Yamada S, Takedachi M, Terakura M, Hashikawa T, Murakami S : Fibroblast growth factor- 2 regulates the synthesis of hyaluronan by human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*, 203 : 557-563, 2005.
- 9) Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M : Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*, 31 : 27-33, 2003.
- 10) Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H,

- Takata T, Kato Y, Kurihara H : Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*, 75 : 1281-1287, 2004.
- 11) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. *Science*, 260 : 920-926, 1993.
- 12) Memon IA, Sawa Y, Fukushima N : Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 130 : 1333-1341, 2005.
- 13) Ohki T, Yamato M, Murakami D : Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue - engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut*, 55 : 1704-1710, 2006.
- 14) Nishida K, Yamato M, Murakami D : Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*, 351 : 1187-1196, 2004.
- 15) Flores MG, Yashiro R, Washio K, Yamato M, Okano T, Ishikawa I : Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats. *J Clin Periodontol*, 35 : 1066-1072, 2008.
- 16) 伊藤公一 : 日歯科評論別冊 2009 日常臨床における再生療法のテクニックと長期経過, 初版, ヒョーロン・パブリッシャーズ, 東京, 2009, 164-169.
- 17) 尾形 颯, 出口眞二 : ヒト歯槽骨骨膜由来細胞を用いた新しい移植片作製法. *日歯周誌*, 48 : 192-200, 2006.
- 18) Okuda K, Momose M, Murata M, Saito Y, Inoie M, Shinohara C, Wolff LF, Yoshie H : Treatment of chronic desquamative gingivitis using tissue-engineered human cultured gingival epithelial sheets : A Case Report. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 24 : 119-125, 2004.
- 19) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y : Corneal reconstruction with tissue- engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*, 351 : 1187-1196, 2004.
- 20) Yamada N, Okano T, Sakai H, Karikusa F, Sawasaki Y, Sakurai Y : Thermo- responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Macromol Chem Rapid Commun*, 11 : 571-576, 1990.
- 21) Okano T, Yamada N, Okuhara M, Sakai H, Sakurai Y : Mechanism of cell detachment from temperature- modulated, hydrophilic- hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials*, 16 : 297-303, 1995.
- 22) Sekine W, Haraguchi Y, Shimizu T, Umezawa A, Okano T : Thickness limitation and cell viability of multi-layered cell sheets and overcoming the diffusion limit by a porous-membrane culture insert. *J Biochips Tissue Chips*, doi : 10. 4172/2153-0777. S1-007, 2011.
- 23) 高橋弘行, 宗正憲和, 岩崎和人, 川津布美, 田胡和浩, 辻上 弘, 菅谷 彰, 出口眞

- 二：ヒト歯肉由来線維芽細胞を用いた積層細胞シートの作製, 及び組織学的研究(抄録). 神奈川歯学, 46 : 82, 2011.
- 24) William TB, Helena R : The Nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol*, 39 : 169-179, 1995.
- 25) Ohgushi H, Caplan AI : Stem cell technology and bioceramics : From cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res*, 48 : 913-927, 1999.
- 26) Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG : Relationship of cellular proliferation to expression of osteopontin and bone sialoprotein in regenerating rat periodontium. *Cell Tissue Res*, 285 : 491-500, 1996.
- 27) Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE : Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation : polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev Biol*, 166 : 220-234, 1994.
- 28) Yamanouchi K, Satomura K, Gotoh Y, Kitaoka E, Tobiume S, Kume K, Nagayama M : Bone formation by transplanted human osteoblasts cultured within collagen sponge with dexamethasone in vitro. *J Bone Miner Res*, 16 : 857-867, 2001.
- 29) Staatz WD, Fok KF, Zutter MM, Adams SP, Rodriguez BA, Santoro SA : Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha2 beta 1 integrin in collagen. *J Biol Chem*, 266 : 7363-7367, 1991.
- 30) Seibel MJ, Woitge HW : Basic principles and clinical applications of biochemical markers of bone metabolism : biochemical and technical aspects. *J Clin Densitom*, 2 : 299-321, 1999.
- 31) Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M : Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 : 8156-8160, 1999.
- 32) Ishijima M, Rittling SR, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M : Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin. *J Exp Med*, 193 : 399-404, 2001.
- 33) Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G : *Osf2/Cbfa1* : a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89 : 747-754, 1997.
- 34) Xiao G, Jiang D, Ge C, Zhao Z, Lai Y, Boules H, Phimpilai M, Yang X, Karsenty G, Franceschi RT : Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and *Runx2/Cbfa1* stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. *J Biol Chem*, 280 : 30689-20696, 2005.
- 35) Morszeck C : Gene expression of *runx2*, *Osterix*, *c-fos*, *DLX-3*, *DLX-5*, and

MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int*, 78 : 98-102, 2006.

36) Kanatani N, Fujita T, Fukuyama R, Liu W, Yoshida CA, Moriishi T, Yamana K, Miyazaki T, Toyosawa S, Komori T : Cbf beta regulates Runx2 function isoform-dependently in postnatal bone development. *Dev Biol*, 296 : 48-61, 2006.

37) Li L, Zhu YQ, Jiang L, Peng W, Ritchie HH : Hypoxia promotes mineralization of human dental pulp cells. *J Endod*, 36 : 799-802, 2011.

38) Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T : Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues : superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*, 52 : 2521-2529, 2005.