

平成22年11月9日
第2回次世代WG

歯根膜シートを用いた 歯周組織の再生

岩田隆紀^{1,2}、鷺尾薫¹、大和雅之¹、妻沼有香³、山田梓³、
和泉雄一³、安藤智博²、岡野光夫¹、石川烈^{1,2}

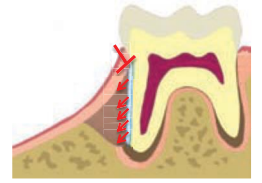
¹東京女子医科大学 先端生命医学研究所

²東京女子医科大学 歯科口腔外科

³東京医科歯科大学大学院 歯周病学分野

歯根膜由来細胞シートを用いて

- 歯根面に歯根膜由来細胞を設置
- 上皮細胞の深行増殖を抑制



歯周組織(セメント質・歯根膜・歯槽骨)の
再生を引き起こしたい

CSTEC 東京女子医科大学
細胞シートティッシュエンジニアリングセンター

TWIns Tokyo Women's Medical University - Waseda University
Institute for Translational and Clinical Biomedical Sciences

細胞シート工学を用いた歯周組織の再生

歯根膜細胞シート移植のスタート

ヒトPDLのヌードラットへの異種移植 (Hasegawa et al., 2005)

イヌ開窓モデルへの自家移植 (Akizuki et al., 2005)

石灰化誘導増地の検討

ヒトPDL + 象牙ブロックのヌードラット皮下への異種移植 (Flores et al., 2008)

ヒトPDLのヌードラットへの異種移植 (Flores et al., 2008)

βTCPを用いた歯槽骨再生を伴う歯周組織の再生
イヌ3壁性モデルへの自家移植 (Iwata et al., 2009)
イヌII度分岐部病変への自家移植 (論文執筆中)
イヌ1壁性モデルへの自家移植 (論文執筆中)

ヒト臨床に向けた取り組み

Iwata et al., 2010 and Washio et al., 2010

2000年

動物実験モデル

- 小動物モデル
- 大動物モデル (特にイヌ)

利点

多くの研究者が利用しており、欠損の作製が標準化されている

エンドポイントは新生セメント質・歯槽骨・歯根膜・接合上皮の長さで分析される。

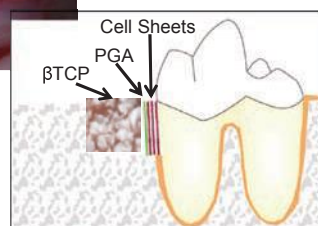
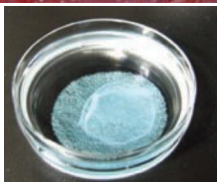
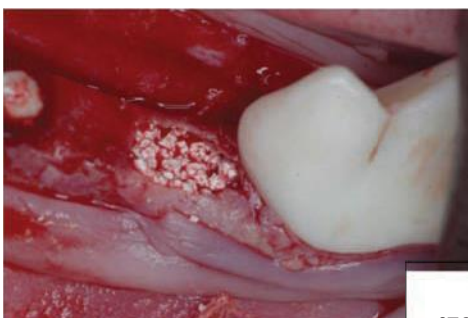
ヒトとサイズが似ているので、ヒト臨床に際してのハンドリングなどを確認できる。

CSTEC 東京女子医科大学
細胞シートティッシュエンジニアリングセンター

TWIns Tokyo Women's Medical University - Waseda University
Institute for Translational and Clinical Biomedical Sciences

CSTEC 東京女子医科大学
細胞シートティッシュエンジニアリングセンター

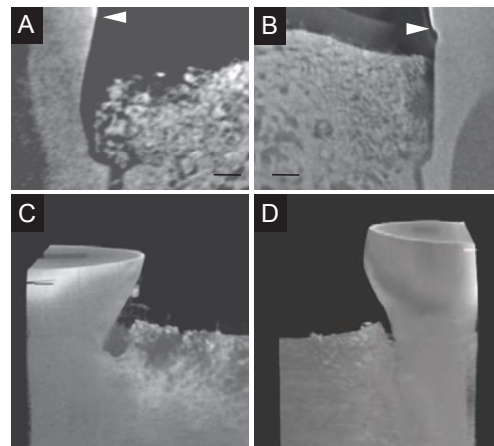
TWIns Tokyo Women's Medical University - Waseda University
Institute for Translational and Clinical Biomedical Sciences



6週後

Cell sheets (-)

Cell sheets (+)



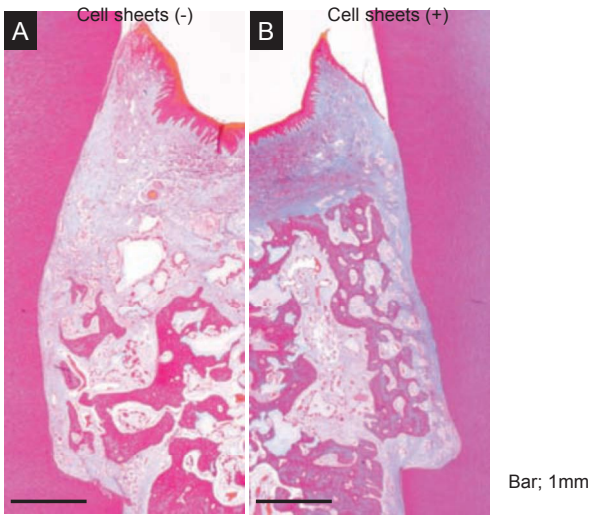
CSTEC 東京女子医科大学
細胞シートティッシュエンジニアリングセンター

TWIns Tokyo Women's Medical University - Waseda University
Institute for Translational and Clinical Biomedical Sciences

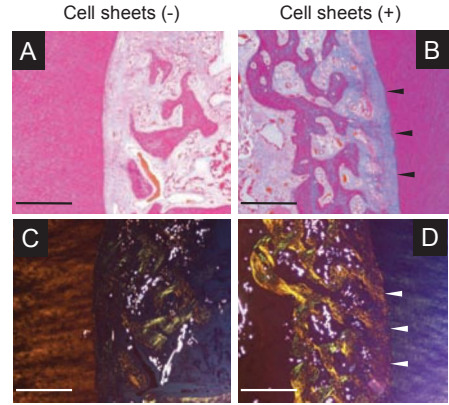
CSTEC 東京女子医科大学
細胞シートティッシュエンジニアリングセンター

TWIns Tokyo Women's Medical University - Waseda University
Institute for Translational and Clinical Biomedical Sciences

6週後



拡大像 (上:アザン染色、下偏光顕微鏡像)



Histometric Analysis of Periodontal Regeneration of 3-wall Defects

	Cell Sheet (n=4)	Negative Control (n=4)	p-value
Junctional Epithelium (mm)	-0.01 ± 0.06	0.19 ± 0.25	0.47
Bone Regeneration (%)	76.95 ± 2.54	54.70 ± 9.01	0.035*
Cementum Regeneration (%)	78.22 ± 2.75	47.69 ± 5.55	0.012*
Periodontal Score (1-5)	4.63 ± 0.13	3.50 ± 0.20	0.003†

Biomaterials, 2009

Periodontal Repair in Surgically Created Intrabony Defects in Dogs: Influence of the Number of Bone Walls on Healing Response

Chang-Sung Kim,* Seong-Ho Choi,† Jung-Kiu Chai,* Kyoo-Sung Cho,† Ik-Sang Moon,* Ulf M.E. Wikesjö,‡ and Chong-Kwan Kim*

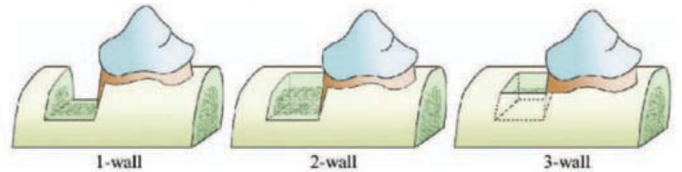


Figure 1. Schematic diagram depicting the surgically created 1-, 2-, and 3-wall intrabony defects.

Table 1. Histometric Analysis of Healing Following Gingival Flap Surgery in 1-, 2-, and 3-Wall Intrabony Defects in Dogs (mean ± SD, mm)

	1-Wall	2-Wall	3-Wall
Defect height	4.0 ± 0.3	4.0 ± 1.2	3.9 ± 0.5
Junctional epithelium	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.3	0.9 ± 0.2†
Connective tissue adhesion	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.7	1.0 ± 0.2
Cementum regeneration	1.2 ± 0.6	2.0 ± 0.6*	2.8 ± 0.5‡
Bone regeneration	1.5 ± 0.5	1.7 ± 0.6	2.3 ± 0.5‡

* Statistically significant difference between 1-wall and 2-wall; P < 0.05.
 † Statistically significant difference between 2-wall and 3-wall; P < 0.05.
 ‡ Statistically significant difference between 1-wall and 3-wall; P < 0.05.

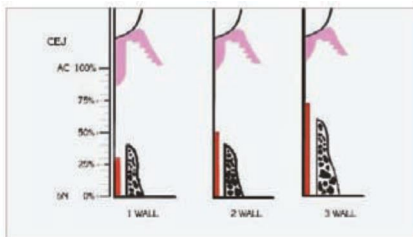
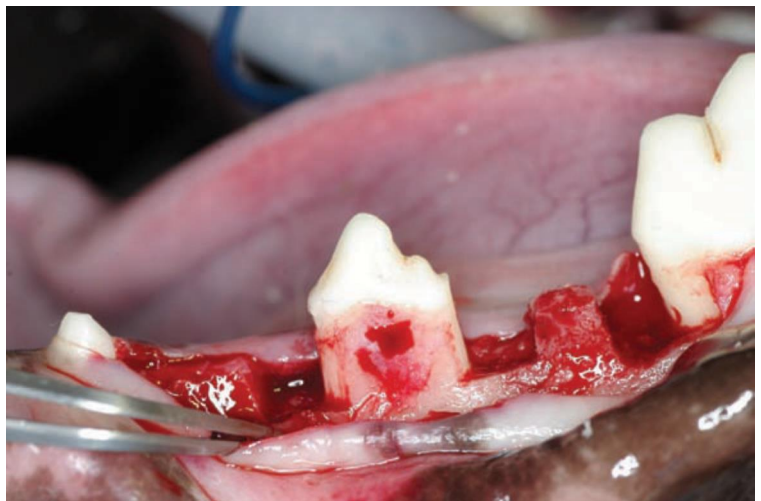
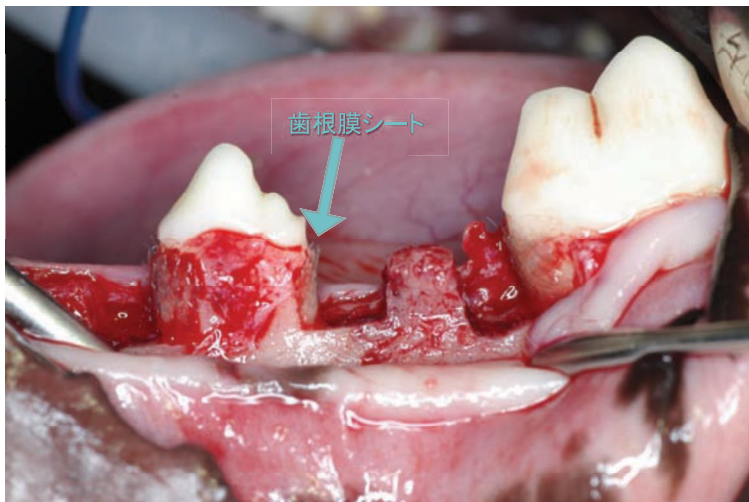
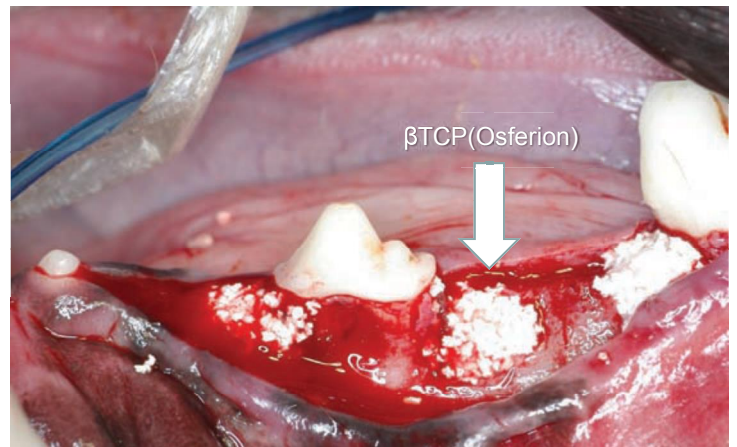


Figure 6. Periodontal healing in percentage of the defect height.

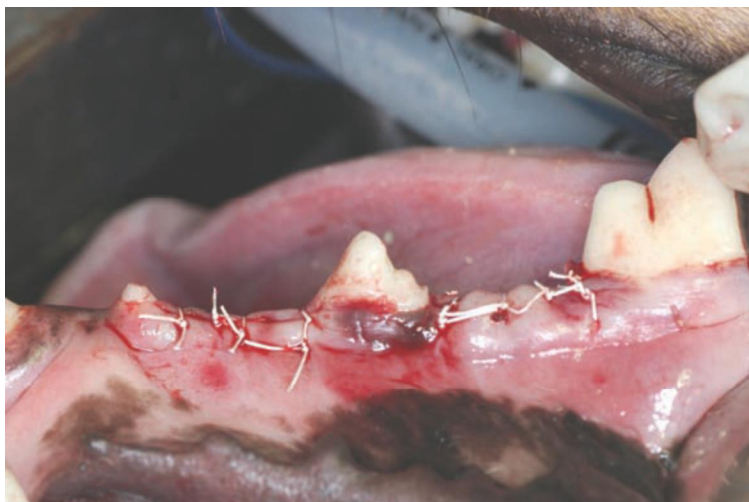




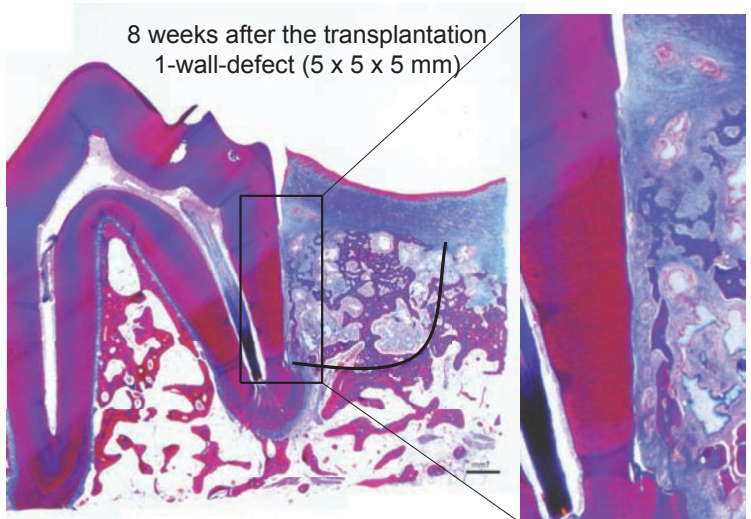
CSTEC 東京女子医科大学 細胞シートティッシュエンジニアリングセンター TWiNS Tokyo Women's Medical University - Waseda University Health Promotion Center Biomedical Sciences



CSTEC 東京女子医科大学 細胞シートティッシュエンジニアリングセンター TWiNS Tokyo Women's Medical University - Waseda University Health Promotion Center Biomedical Sciences



CSTEC 東京女子医科大学 細胞シートティッシュエンジニアリングセンター TWiNS Tokyo Women's Medical University - Waseda University Health Promotion Center Biomedical Sciences



CSTEC 東京女子医科大学 細胞シートティッシュエンジニアリングセンター TWiNS Tokyo Women's Medical University - Waseda University Health Promotion Center Biomedical Sciences

ヒト臨床にを行うにあたっての プロトコルの作製と標準化

- 試薬の改変 (GMP準拠の薬剤へ変更)
- 細胞採取 (GLP準拠)
- 細胞増殖 (継代密度と頻度の設定)
- 出荷判定項目の設定
- 大型動物でのハンドリングは良いか?
- 治療成績評価系の設定

これらの全ての項目を実験室レベルで選定した後に
CPCレベル内で細胞シートを作製し、その有効性・
安全性を評価する。

CSTEC 東京女子医科大学 細胞シートティッシュエンジニアリングセンター TWiNS Tokyo Women's Medical University - Waseda University Health Promotion Center Biomedical Sciences

Table 1. Isolation and ALP activity of hPDL cells

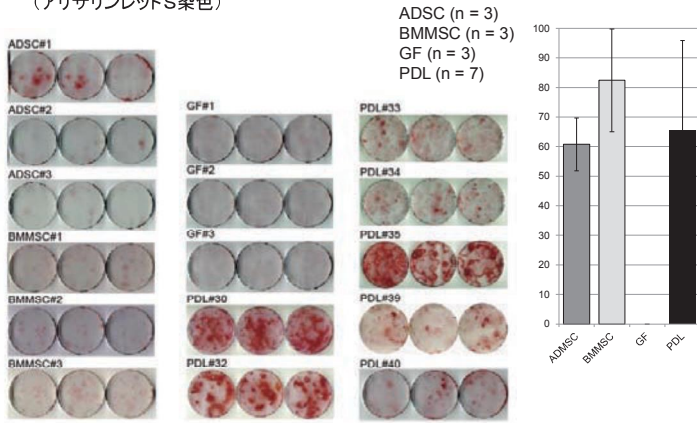
#	Age	Sex	Position	Enzyme	Cell Expansion	ALP Induction
1	19	F	18	T	+	+
2	41	M	28	T	+	+
3	34	F	38	T	+	+
4	34	F	28	T	+	+
5	14	M	22	T	+	+
6	14	M	34	T	-	-
7	24	F	38	T	+	+
8	26	M	38	T	+	+
9	26	M	18	T	+	+
10	30	F	42	T	-	-
11	24	F	24	OD	+	+
12	24	F	14	OD	+	+
13	26	F	38	T	+	+
14	25	F	38	OD	+	+
15	19	F	38	OD	+	+
16	32	F	48	OD	+	+
17	26	F	48	OD	+	+
18	30	M	28	OD	+	+
19	57	F	18	OD	+	+
20	25	M	18	OD	+	+
21	57	F	28	OD	+	+
22	18	M	28	OD	+	+
23	30	F	28	OD	+	+
24	25	F	48	OD	+	+
25	19	F	48	OD	+	+
26	57	F	38	OD	+	+
27	35	M	38	OD	+	+
28	23	M	38	OD	-	-
29	47	M	48	OD	+	+
30	31	M	48	OD	+	+
31	57	F	28	OD	+	+
32	23	F	38	OD	+	+
33	45	M	48	OD	+	+
34	32	M	48	OD	+	+
35	25	M	48	OD	+	+
36	30	F	38	OD	+	+
37	31	F	38	OD	+	+
38	34	F	48	OD	+	+
39	27	F	38	OD	+	+
40	30	F	48	OD	+	+
41	25	M	28	OD	+	+

Explant (Somerman et al., 1988) 成功率76%
コンフルエントまでの期間 約30日

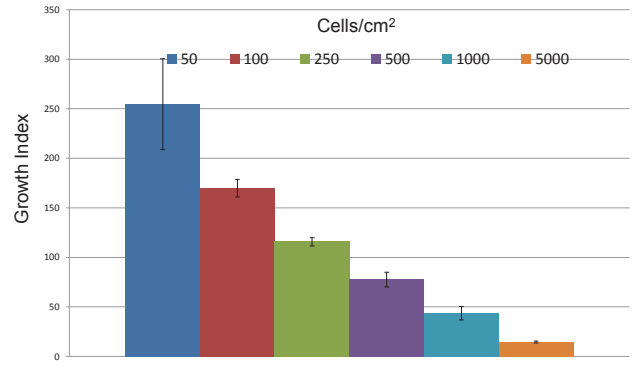
細胞獲得率
Collagenase Type I (SERVA社製) (29/30) 97%
Trypsin-EDTA (Invitrogen社製) (8/11) 73%
ALP陽転率
Collagenase Type I (SERVA社製) (29/29) 100%
Trypsin-EDTA (Invitrogen社製) (6/8) 75%

CSTEC 東京女子医科大学 細胞シートティッシュエンジニアリングセンター TWiNS Tokyo Women's Medical University - Waseda University Health Promotion Center Biomedical Sciences

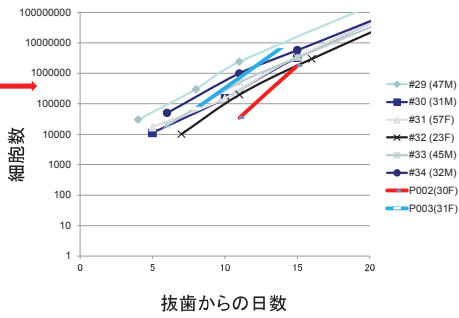
石灰化誘導培地による骨芽細胞への分化試験
(アリザリンレッドS染色)



1週間での細胞倍化指数(ヒトPDL(5))

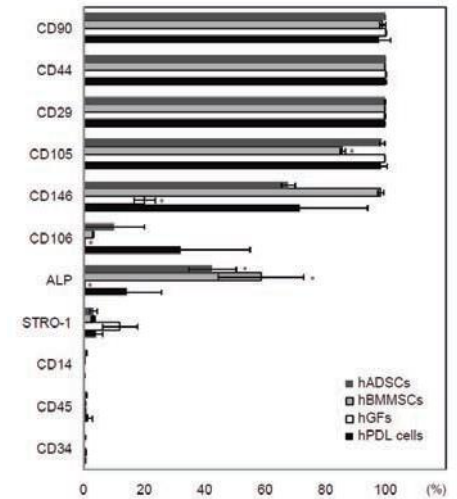


細胞シート6枚作製に
必要な細胞数

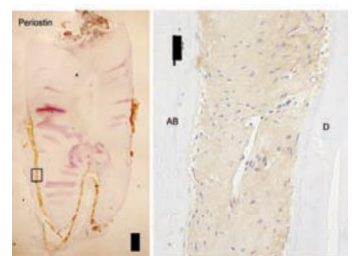
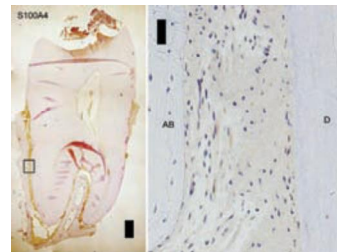
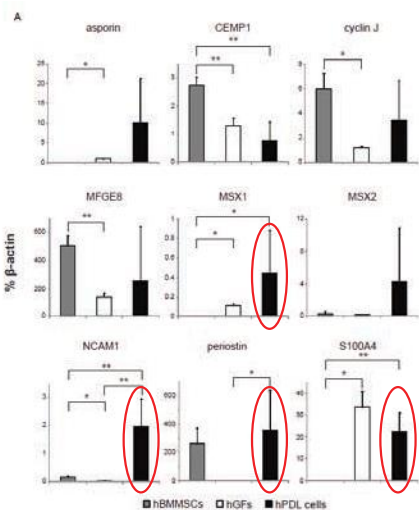


ヒト歯根膜細胞の表面抗原の
発現解析 (FCM)

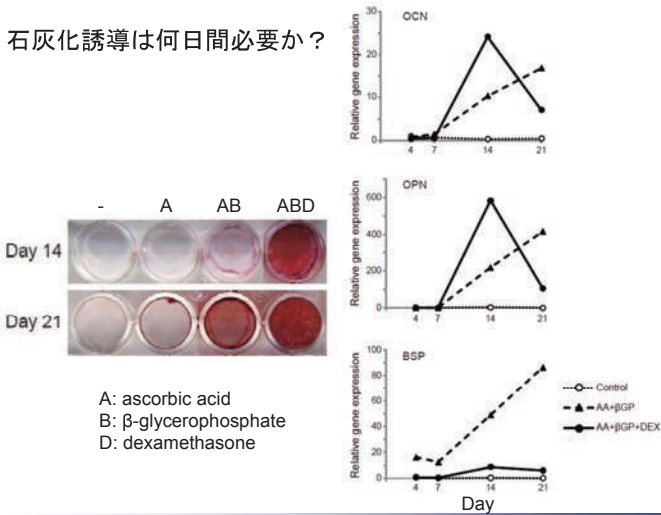
ADSC (n = 3)
BMMSC (n = 3)
GF (n = 3)
PDL (n = 3)



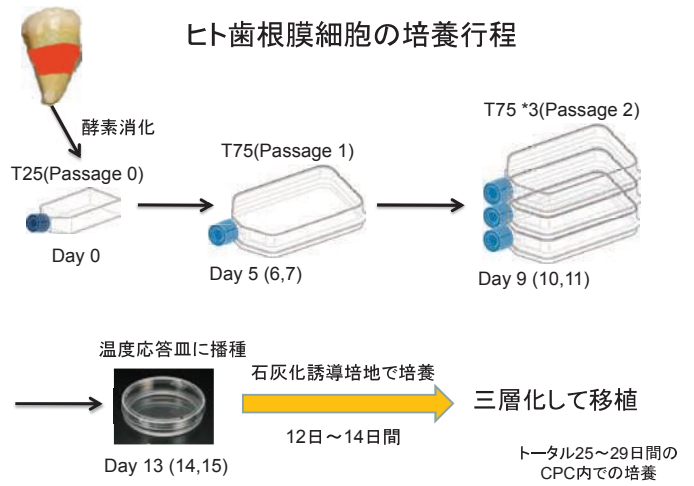
歯根膜に強く発現していると
報告されている遺伝子発現
Taqman Gene Expression Assay
hBMMSCs (n = 3)
hGFs (n = 3)
hPDL cells (n = 7)



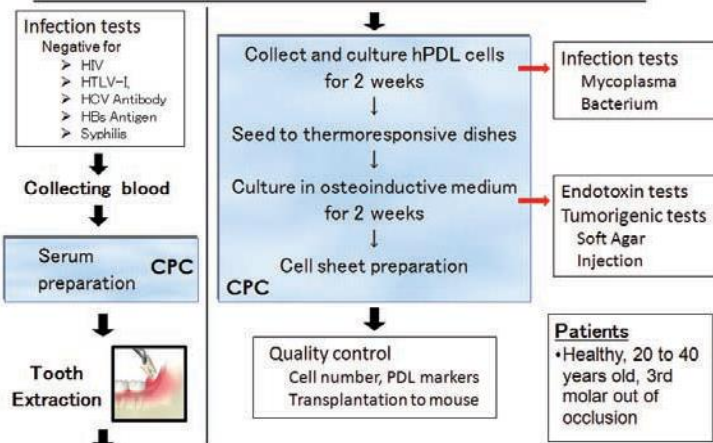
石灰化誘導は何日間必要か？



ヒト歯根膜細胞の培養行程



Flow Chart



Infection tests

		#1	#2	#3	Standard
Mycoplasma	PCR	Negative	Negative	Negative	Negative
	Culture	Negative	Negative	Negative	Negative
Endotoxin (EU/mL)	1st day	-	0.11	0.16	<4.0
	20th day	2.2	0.6	1.08	
Bacterium	Aerobic	Negative	Negative	Negative	Negative
	Anaerobic	Negative	Negative	Negative	Negative
	Fungus	Negative	Negative	Negative	Negative

Neither microbial infection nor excess amount of endotoxin in culture medium. Washio et al., 2010

Tumorigenic test (soft agar)

- 9000 cells/well were cultured in 0.5% agar OIM for 7 days.



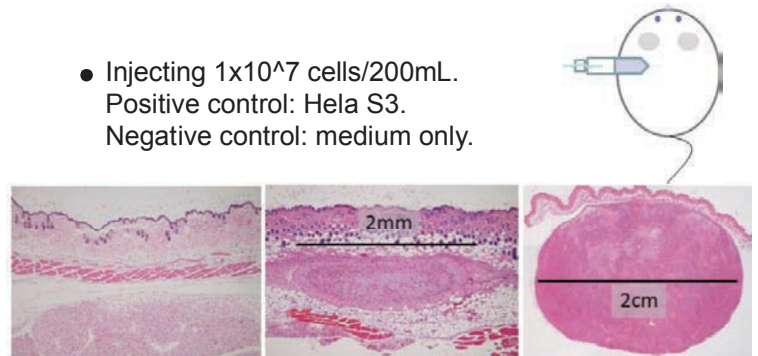
Negative control (hFibroblast) hPDL cells Positive control (Hela)

No transformation losing anchorage dependency.

Washio et al., 2010

Tumorigenic test (injection)

- Injecting 1×10^7 cells/200μL.
Positive control: HeLa S3.
Negative control: medium only.



No tumor formation after 4 and 12 weeks

Quality control in vitro

	#1	#2	#3	Std.
Cell number (Ave.#/cell sheet)	6.13×10^5	6.4×10^5	5.4×10^5	$>1 \times 10^5$
Cell survival rate (Ave.%)	98	97	95	>80
Periostin expression (cycles)	3.3	2.8	-3	<5
ALP positive cells (%)	96	62	76.3	>50
ALP activity (Ave. unit/ μ L)	0.81	0.99	1.02	>0.1

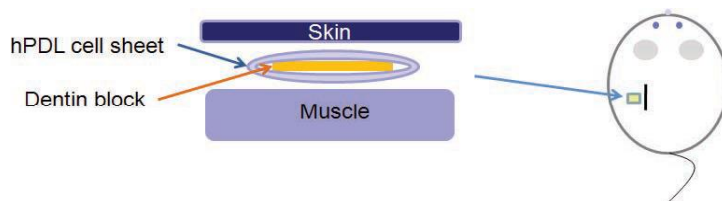
Number and survival rate of cells in sheet were sufficient.

Periostin indicated that cells possess the property of hPDL cells.

ALP expression and activity indicated osteoblastic property.

Washio et al., 2010

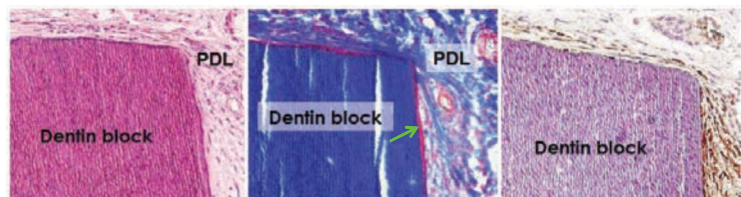
Quality control in vivo



- PDL cell sheets transplantation with dentin block under back skin of SCID mice.

Quality control in vivo

- PDL like (PDL) and cementum like (\rightarrow) tissues around grafted dentin block.
- Human vimentin positive (brown).



Cell sheet possessed the property to regenerate periodontal tissues.

Washio et al., 2010

