

原著論文

コラーゲンをスキヤホールドとして 3次元培養したHMS0014細胞による硬組織形成

Hard Tissue Formation by Cell Culture Engineering of HMS0014 Cells
within a Collagen Scaffold

大阪歯科大学 口腔解剖学講座

三上 豊, 隈部 俊二, 岩井 康智

Yutaka MIKAMI, Shunji KUMABE and Yasutomo IWAI

Department of Oral Anatomy, Osaka Dental University

ヒト間葉系幹細胞(HMS0014)を, コラーゲンゲル(Cellmatrix Type I-A)をスキヤホールドとした3次元培養を行い, そこにチタンインプラント体を包埋した. 細胞を骨芽細胞様細胞へ分化誘導し, インプラント体周囲にみられる硬組織形成の様相を *in vitro* で観察および検討した. インプラント体と周囲のスキヤホールドの変化を経日的に観察した後, チタンインプラント体は周囲のスキヤホールドと一塊として切り出し, 樹脂包埋して研磨標本作製した. また, インプラント体周囲のスキヤホールドから凍結切片とエポソ超薄切片を作製した. 観察の結果, インプラント体表面に骨芽細胞様細胞の接着と石灰化物の沈着がみられた. スキヤホールドにおいては HMS0014 細胞は Cellmatrix の3次元網状構造を基礎にコラーゲン線維を分泌し, コラーゲン線維に関連する石灰化と細胞外マトリックスのターンオーバーを制御する組織像がみられた. contact osteogenesis と distant osteogenesis の出現がみられたことにより, インプラント療法における tissue-engineering material としてのコラーゲンゲルの有用性が示唆された.

キーワード: チタンインプラント体, HMS0014 細胞, コラーゲンスキヤホールド, *in vitro*

緒言

コラーゲンゲルをスキヤホールドとした再生療法の研究にはこれまで関節軟骨, 胆管, 角膜などに関するものが行われてきた¹⁻⁴⁾. われわれは以前の研究で, *in vitro* においてマウス骨髄由来幹細胞 KUSA/A1 (JCRB 細胞バンク, 茨木市)を, コラーゲンゲルをスキヤホールドとして用いて3次元包埋培養し, その中に市販のチタンインプラント体を埋入してインプラント体表面への硬組織形成を誘

導した^{5,6)}. それらの研究で細胞は分化誘導を開始後 7 日目でオステオカルシンの発現が増加し, 骨芽細胞様細胞に分化したことが示された. また3次元包埋培養 21 日目の観察でインプラント体表面に contact osteogenesis に類似した硬組織の形成が認められた. 本研究では, より臨床に近づけるためにヒトの骨由来の間葉系幹細胞である HMS0014 細胞(理化学研究所バイオリソースセンター, つくば市)を用いた. この細胞が

骨芽細胞様細胞へ分化するかどうか確認するため, 細胞をコラーゲンゲルに包埋し, 分化誘導を行った後, 生化学的に検索した. 骨芽細胞様細胞へ分化していることを確認した後, 細胞を混和したコラーゲンゲル内にチタンインプラント体を包埋し骨芽細胞様細胞への分化誘導を行った. インプラント体表面と周囲のコラーゲンゲルの石灰化の様相を経日的に観察した. 21 日経過後にインプラント体と周囲のコラーゲンゲルを切り出し, インプラント体と周囲のコラーゲンゲルのレジ研磨標本, インプラント体周囲のコラーゲンゲルの凍結切片および超薄切片を作製し観察した. マウス間葉系幹細胞 KUSA/A1 を用いたわれわれの先行研究でインプラント体表面とその周囲のコラーゲンゲルに硬組織の形成が確認されており, ヒト間葉系幹細胞 HMS0014 においてもインプラント体表面と周囲のコラーゲンゲルに硬組織の形成が起こるかどうかを検討した. また, これまであまり検討されてこなかったコラーゲンゲル内での線維性構造の変化についても検討した.

材料と方法

本研究は大阪歯科大学医の倫理委員会により承認を得た上で行われた(承認番号: 大歯医倫 110121).

1. 細胞培養

細胞はヒト間葉系幹細胞 HMS0014 を理化学研究所バイオリソースセンターより提供を受けて使用した. 細胞は 150 cm² 細胞培養フラスコ (AGC テクノグラス, 東京都) 内で Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (100 units / mL penicillin + 100 µg / mL streptomycin; ナカライテスク, 京都市) を加えた Poweredby10 (グライコテクニカ, 札幌市) を培地として 37°C, 5%CO₂, 95%air 存在下で培養した. 培地は 3 日毎に交換した.

2. 培養細胞の性質の生化学的検討

3 次元包埋培養を行うため 24 well ディッシュ (AGC テクノグラス) に Type I コラーゲンゲル (Cellmatrix Type I -A; 新田ゼラチン, 大阪市) と分化誘導前の HMS0014 細胞を 1.0×10⁶ cells/mL の割合で混和して播種し, Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (ナカライテスク) を加えた Poweredby10 (グライコテクニカ) を使用して培養した. 1 週間経過後, 50 µg/mL ascorbic acid (AA) (Gibco Laboratories, NY, USA), 10 mM β-glycerophosphate (GP) (Gibco Laboratories), 100 nM Dexametazone (和光純薬工業, 大阪市) を添加し, 骨芽細胞様細胞への分化誘導を行った.

培養細胞の骨芽細胞様細胞への分化を検討するため Alkaline phosphatase (ALP) 活性, DNA 量, Calcium (Ca) 量および Osteocalcin (Os) 量を測定した. 試薬としてそれぞれ Alkaline Phosphatase Substrate Kit (BIO-RAD, CA, USA), PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes, OR, USA), Calcium E-test-Wako (和光純薬工業.), Gla type Osteocalcin (GLA-OC) EIA Kit (タカラバイオ, 大津市) を用いた. 分化誘導開始後 1 日, 3 日, 7 日に培地を回収し, 試薬の使用説明書に従って測定した. 測定には Softmax Pro5 (Molecular Devices, CA, USA) を用いた. ALP 活性, Ca 量および Os 量は DNA 量の値により補正した.

3. インプラント体包埋培養

チタンインプラント体として, 臨床においてよく用いられている, POI FINAFIX (ストレート型, 直径 3.7 mm, 長さ 14 mm, ネジ型表面でプラスト処理と陽極酸化されている; 京セラメディカル, 大阪市; IP-AO) を用いた⁵⁾. 6 well のディッシュ (AGC テクノグラス (株)) に第 1 層目として 1 mm 厚に

Cellmatrix Type I-A コラーゲンゲルを敷いた。第 2 層目はその上にチタンインプラント体を横に置き, Cellmatrix Type I-A コラーゲンゲルに培養した HMS0014 細胞を 1×10^6 cells/mL の濃度で混和してディッシュに流し込み 6 mm厚となるよう包埋した。細胞の分化誘導のため 50 μ g/mL AA, 10 mM β -GP, 100 nM Dexametazone を添加した Poweredby10 (グライコテクニカ) を 2 mm厚となるようディッシュに加え第 3 層目とし, 37°C, 5%CO₂, 95%air 存在下で 21 日間培養した(図 1)。培地は 3 日毎に交換した。インプラント体および周囲のコラーゲンゲルを位相差顕微鏡(Olympus CKX41, オリンパス, 東京都)にて経日的に観察し(実験開始後 3 日, 7 日, 14 日, 21 日), 写真撮影した。実験開始後, 21 日目にインプラント体を周囲のコラーゲンゲルとともに一塊として取出し, インプラント体周囲にコラーゲンゲルが 4 mm 幅で残るようにメス刃を用いてトリミングした。インプラント体と周囲のコラーゲンゲルを 4%パラホルムアルデヒドにて固定した。PBS 洗浄後上昇列エタノールで脱水し Technovit 7200 VLC (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) に包埋し, EXAKT BS-300CP-A Band Saw Machine と EXAKT MG-400CS Microgrinding Machine (メイワフォーシス, 東京都)を用いた Cutting-Grinding

Technique により研磨標本を作製した。標本をトルイジンブルーおよびアリザリンレッド S で染色し, 光学顕微鏡 (Olympus BX41, オリンパス) で観察し, 写真撮影した。

4.3 次元培養によるコラーゲンゲルの変化の検討

チタンインプラント体を取り出したコラーゲンゲルの残りの一部を OCT コンパウンド(サクラファインテックジャパン, 東京都)で凍結包埋し, LEICA CM3050S クリオスタット (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) で凍結切片を作製し, ヘマトキシリン-エオジン (H-E) およびアリザリンレッド S で染色して, Olympus BX41 顕微鏡で観察, 写真撮影した。また, 残りのコラーゲンゲルを 2%グルタルアルデヒドで前固定, 2%オスミウム酸で後固定したのち通法によりエポン包埋した。LKB-4800 ULTROTOME I (LKB-Produkter AB, Stockholm, Sweden) により超薄切片を作製し, 酢酸ウラン, クエン酸鉛により二重電子染色を行った。標本は H-7100 透過型電子顕微鏡(日立ハイテクノロジーズ, 東京都)で観察した。なお, 細胞培養されていない状態のコラーゲンゲルと比較するため, Cellmatrix Type I-A 単体の凍結切片と超薄切片を上記と同じ方法で作製し観察した。

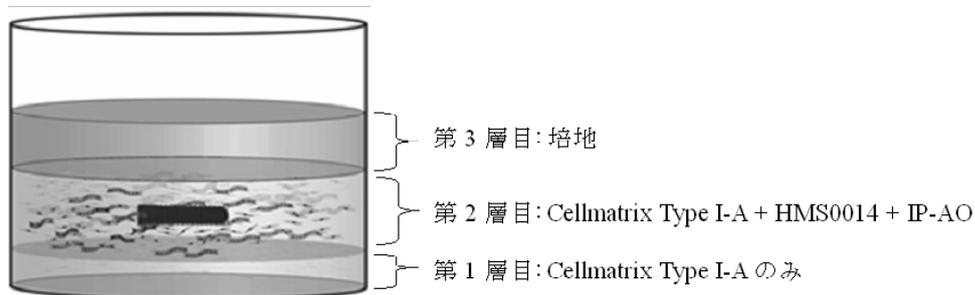


図 1 インプラント体包埋培養の模式図

結果

1. HMS0014 細胞の生化学的性質

コラーゲンを包埋培養において ALP 活性は実験開始後 1 日, 3 日, 7 日と増加傾向が認められ, 7 日から 14 日にかけて顕著な減少傾向が認められた. Ca 量は実験開始後 7 日目まではわずかな増加しか認められなかったが, 7 日から 14 日にかけて顕著な増加が認められた. Os 量も 7 日目まではわずかな増加しか認められなかったが, 7 日から 14 日にかけて急激な増加が認められた (図 2).

2. インプラント体周囲の位相差顕微鏡観察

インプラント体の周囲を取り巻く不透明の細胞外基質の経日的な発達がみられた. 実験開始後 3 日目ではインプラント体周囲のコラーゲンを包埋した HMS0014

細胞が多数認められた (図 3a). 実験開始後 7 日目にはインプラント体表面に不透過性の高い構造物が観察された (図 3b). インプラント体周囲のスキャホールドに不透過性の小塊が経日的に増加しており, 14 日目以降でより明瞭に認められるようになった (図 3c-d).

3. 培養 21 日目のインプラント体の観察

Technovit 7200 VLC に包埋したインプラント体の研磨標本で, インプラント体表面に細胞が接着しているのが確認できた (図 4b). インプラント体上にアリザリンレッド S で赤く染まる石灰化組織の形成が確認できた (図 4c). また, インプラント体近傍においてコラーゲン線維に関連する細胞外基質の形成が確認された (図 4d).

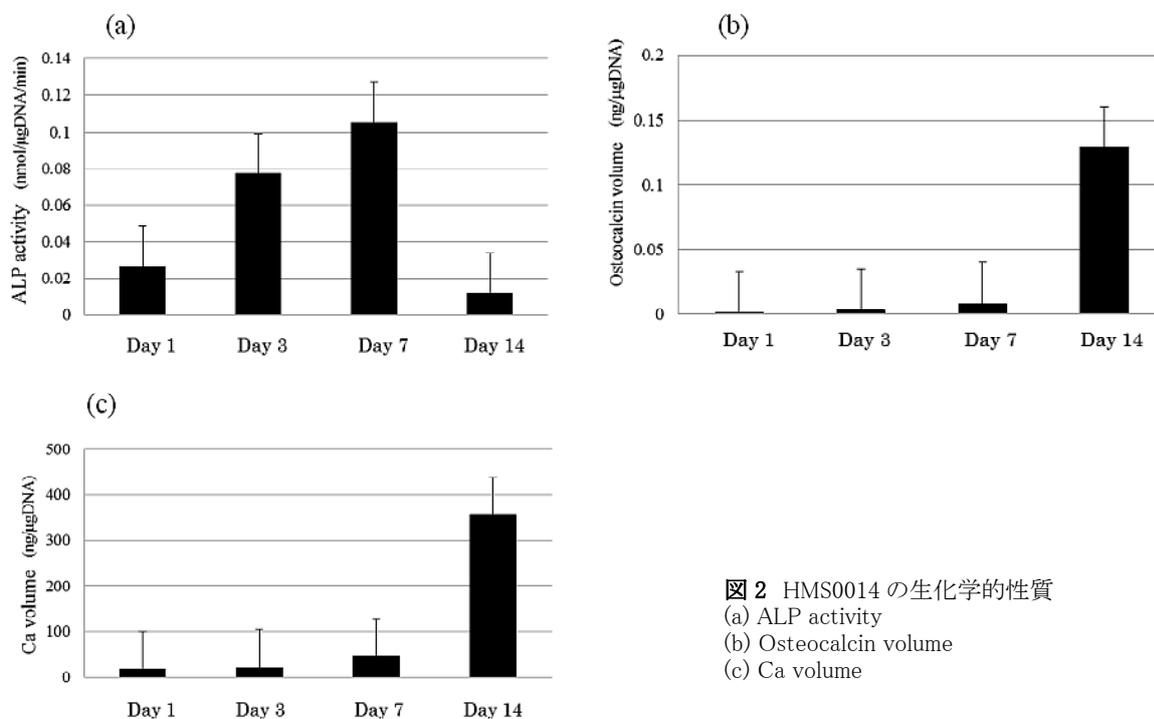


図 2 HMS0014 の生化学的性質
(a) ALP activity
(b) Osteocalcin volume
(c) Ca volume

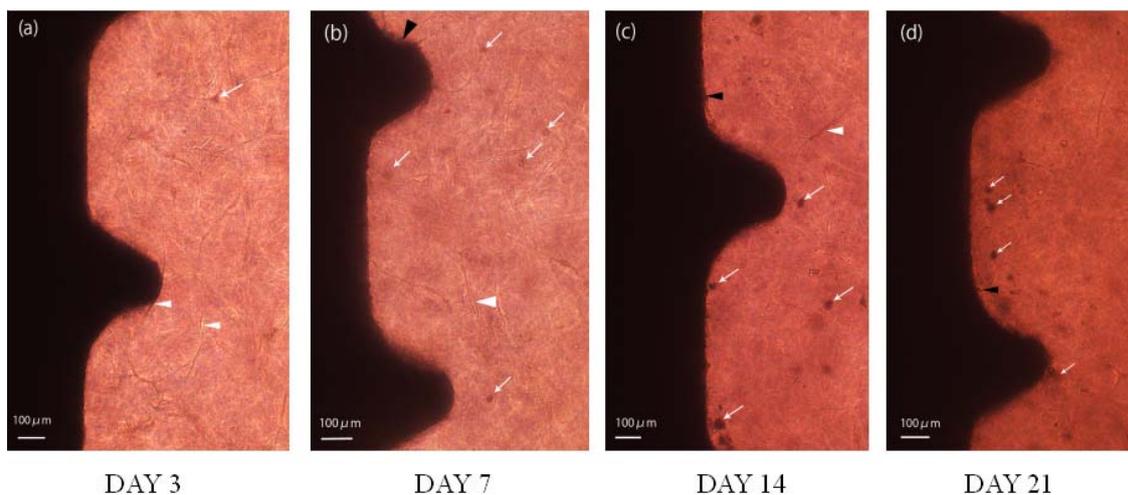


図3 3次元包埋培養の位相差顕微鏡像
白矢頭:HMS0014細胞
白矢印:コラーゲンゲルに出現した不透過性の構造物
黒矢頭:インプラント体表面に形成された不透過性の構造物

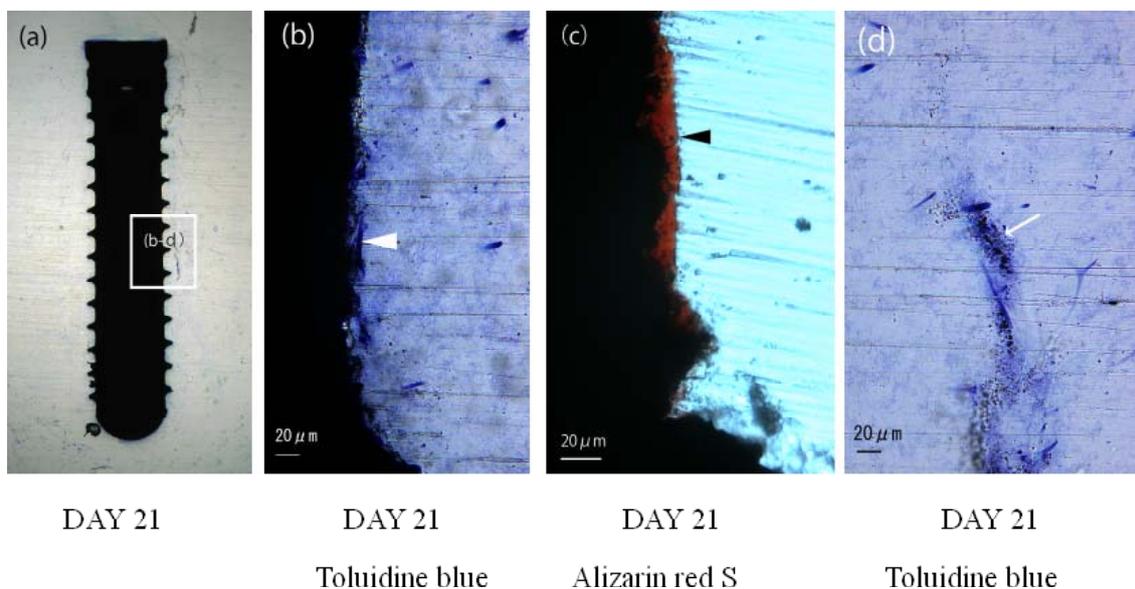


図4 レジン包埋したインプラント体研磨標本の光学顕微鏡像
白矢頭:インプラント体に接着する骨芽細胞様細胞
黒矢頭:Alizarin red Sに染まる石灰化組織
白矢印:コラーゲン線維に関連する細胞外基質の形成

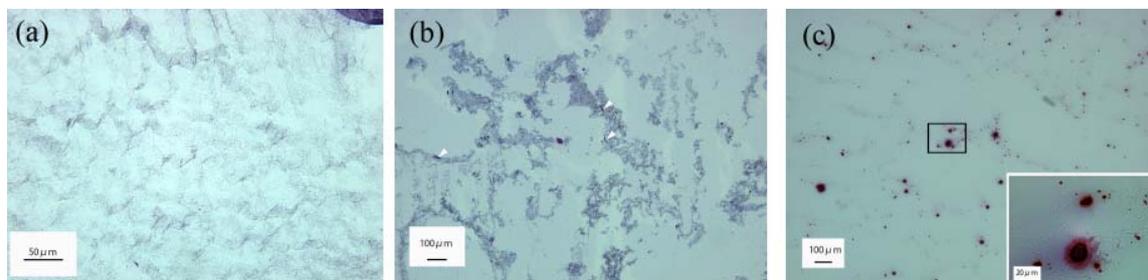


図5 Cellmatrix Type I-A 単体および3次元包埋培養(実験開始後21日目)の凍結切片の光学顕微鏡像
(a) Cellmatrix Type I-A 単体(H-E染色) (b) 実験開始後21日目(H-E染色) (c) 実験開始後21日目
(Alizarin red S染色)
白矢頭:細胞

4. 3次元培養によるコラーゲンの変化

4-1) 光学顕微鏡観察

Cellmatrix Type I-A のみをゲル化したものを凍結切片にし, H-E 染色して光学顕微鏡で観察するとコラーゲン線維が線維の密度が低い瀰漫性の網状構造を形成しているのが認められた(図 5a). 一方, HMS0014 細胞を3次元培養した凍結切片では, 線維の密度の濃い凝集性の網状構造が形成されているのが観察された(図 5b). また細胞は線維の網状構造に沿って分布していた. 細胞を3次元培養した凍結切片をアリザリンレッド S で染色すると, 網状構造に沿って石灰化塊が多数形成されているのが確認された(図 5c).

4-2) 透過型電子顕微鏡観察

Cellmatrix Type I-A 単体のものでは直径 10~20 nm の線維が確認された. 太い線維では 20 nm 間隔の横紋が認められた(図 6a). HMS0014 細胞を3次元培養したものでは細胞の周囲に太い線維束や石灰化塊が豊富に認められた(図 6b). 細胞内には小胞輸送(endocytosis, exocytosis)経路に関連する小胞, リソソームや, 粗面小胞体, ミトコンドリア, ゴルジ体などの細胞内小器官も豊富に認められた(図 6c). 細胞周囲には直径 30~40 nm で 60~70 nm 間隔の横紋をもつ I 型コラーゲン線維が認められたが, Cellmatrix Type I-A 単体にみられた直径 10~20 nm の線維は確認されなかった. また, 細胞から基

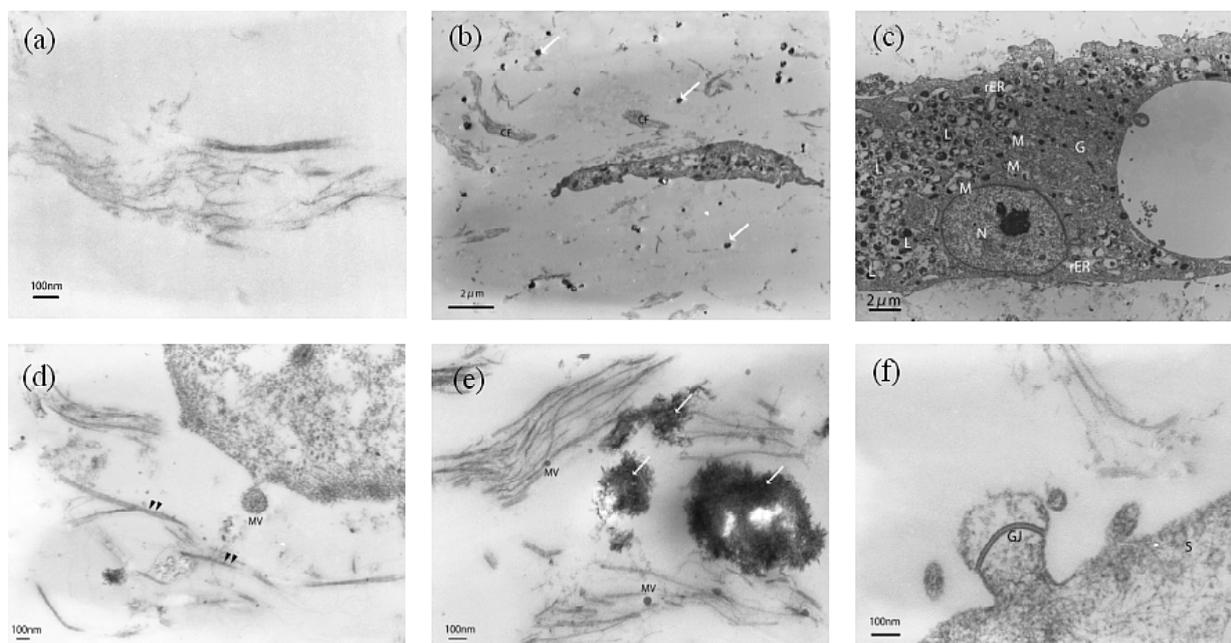


図 6 Cellmatrix Type I-A 単体および3次元包埋培養(実験開始後21日目)の透過型電子顕微鏡観察
(a) Cellmatrix Type I-A 単体 (b)~(f) 実験開始後21日目
黒矢頭: 横紋 白矢印: 石灰化構造物 CF: 線維束 N: 核 M: ミトコンドリア
L: リソソーム rER: 粗面小胞体 G: ゴルジ体 MV: 基質小胞 GJ: ギャップ結合
S: 分泌小胞

質小胞が出芽しているのが認められた(図 6d). 石灰化塊はコラーゲン線維に関連して出現しておりコラーゲン線維付近に基質小胞が出現していた(図 6e). 細胞と細胞の間にはギャップ結合とみられる細胞間結合や分泌小胞, および基質小胞の分泌が認められた(図 6f).

考 察

間葉系幹細胞はもともとは骨髄の中にみいだされたものであるが骨髄以外の多くの臓器の結合組織に存在すると考えられている⁷⁾. 間葉系幹細胞は種々の間葉系の組織を形成するが, その由来する組織により性質が異なっている. 骨形成能については骨髄, 骨膜, 歯根膜に由来する幹細胞は脂肪組織由来の間葉系幹細胞よりも明らかに高い数値を示しており, 本研究にはヒト骨由来の間葉系幹細胞である HMC0014 を用いた^{8,9)}. 間葉系幹細胞は軟骨細胞, 骨芽細胞, 脂肪細胞へ分化する性質をもつので培養細胞の生化学的検討を行い骨芽細胞様細胞に分化しているかどうかを確認した. 骨芽細胞への分化誘導開始後 1 日目から骨芽細胞の初期分化のマーカーである ALP 活性が上昇し始め 7 日目まで上昇し, 14 日目では減少していた. また, Ca 量と骨芽細胞の分化の後期で培養細胞が石灰化する時期に発現する Os 量はともに 14 日目において上昇していた. このことは HMS0014 細胞は分化誘導後比較的早い時期に骨芽細胞様細胞への分化を完了し, 7 日から 14 日の間にかけて骨様の石灰化組織の形成が開始する能力を持つことが示されたといえる^{10,11)}.

インプラント体を 3 次元包埋培養して位相差顕微鏡で観察すると 7 日目あたりからインプラント体表面に不透過性の構造物と周囲のコラーゲンゲルに不透過性の小塊が出現

し始め, 小塊は経日的に増加したが, これは HMS0014 細胞の生化学的性質で示された結果と符合し, HMS0014 細胞は骨芽細胞様の細胞に分化し, インプラント体表面と, 周囲のコラーゲンゲル内に類骨あるいは骨様の構造物を形成したと考えられる.

レジン包埋したインプラント体の研磨標本の観察から, 骨芽細胞様の細胞に分化した HMS0014 細胞はインプラント体表面に接着し contact osteogenesis 類似のアリザリンレッド S に染まる石灰化組織を形成し, また, 周囲のコラーゲンゲル内ではコラーゲン線維に関連する細胞外基質を形成していることが確認された.

Cellmatrix Type I-A 単体の凍結標本を作製し観察すると密度の低いコラーゲン線維が瀰漫性に網状構造を形成していた. しかし, 21 日間 3 次元包埋培養した標本においては密度の濃い線維が凝集性に網状構造を形成しており, 網目に沿って distant osteogenesis 類似の多数の石灰化塊が出現した. 3 次元培養した標本にみられる線維が Cellmatrix Type I-A 固有のものか細胞が作り出したものかについては, ラット骨髄由来細胞を積層培養した先行研究で Cellmatrix Type I-A のみの層では線維がまばらにしかみられないのに対し, 細胞を包含した層では線維が高密度でみられていたこと, および今回の 21 日目の透過電子顕微鏡観察で Cellmatrix Type I-A にもともとみられた線維が細胞周囲に確認されなかった点を考え合わせると今回の標本でみられた線維は大部分が HMS0014 細胞由来と考えられる⁶⁾. これにより HMS0014 細胞が Cellmatrix Type I-A の網状構造を基盤として, 自らの形成した線維で, より明確な網状構造を形成し, その中で石灰化組織を形成したと考えられる.

Cellmatrix Type I-A コラーゲンゲルはブ

タの腱の Type I コラーゲンを酸性条件下で可溶化したものであるが再構成することによりゲル化する¹²⁾。再構成されたコラーゲン線維を透過型電子顕微鏡で観察すると直径 10~20 nm の太さの線維を形成しており 20 nm 周期の横紋をもつものもみられた。HMS0014 細胞を分化誘導した後 21 日間培養した標本では、細胞周囲に直径 30~40 nm で 60~70 nm 周期の横紋を持つ I 型コラーゲン線維が認められた。さらに HMS0014 細胞由来の骨芽細胞様細胞はばらばらに孤立して存在しているのではなく、隣接した細胞と細胞間結合を形成しており、細胞の近傍にみられるコラーゲン線維に関連して石灰化が開始していることが観察された。細胞内には細胞内小器官として小胞やリソソームが多数みられることから、HMS0014 細胞由来の骨芽細胞様細胞はコラーゲンを吸収しながら細胞外基質を分泌することが示唆された^{13,14)}。また、豊富なリソソームによりタイプ 2 の Non-apoptotic プログラム細胞死が進行していることが示唆された¹⁵⁾。さらに、細胞間にギャップ結合が認められたことから、細胞は細胞間結合により相互に情報交換し合いながら、また、今回の実験環境に適応しながら distant osteogenesis 類似の石灰化組織形成を開始していることが推察される^{16,17)}。

オッセオインテグレーションを組織学的にみると、インプラント体がインプラント窩に定着するとすぐに炎症反応が起こり、初期の有機基質の沈着と初期の石灰化無線維性(コラーゲンを含まない)層の形成が誘導される。その有機基質と石灰化無線維層がインプラント体周囲の骨形成を促進するセメントラインになると考えられている。その後、インプラント体周囲の小柱骨は徐々に骨改造と骨形成がおこなわれ、長期間安定した機能的オ

ッセオインテグレーションが発達する¹⁸⁻²²⁾。

今回の研究の結果から、ヒト骨由来間葉系幹細胞を用いて、骨欠損のあるインプラント窩内において生体吸収性のスキャホールドの中でインプラント体周囲に骨形成が可能であることが示唆された。また、そこで造成された骨様組織は骨改造現象を受けることによりインプラント周囲骨組織の治癒が進むと考えられ、より安定した咀嚼機能を可能にするオッセオインテグレーション (functional osseointegration) の獲得につながることを期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し多大なご協力をいただいた大阪歯科大学口腔解剖学講座 中塚美智子講師、歯科理工学講座 橋本典也講師に深謝いたします。

本研究は大阪歯科大学中央歯学研究所形態系研究施設、組織培養実験施設を利用して行った。また、本研究の一部は JSPS 科研費 24592976 および大阪歯科大学口腔インプラント研究委託金 (研究課題番号 第 11-04 号) の助成を受けて行った。

引用文献

- 1) Wiesmann HP, Nazer N, Klatt C, Szuwart T, Meyer U. Bone tissue engineering by primary osteoblast-like cells in a monolayer system and 3-dimensional collagen gel. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 1455-1462.
- 2) Wakitani S, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. *Tissue Eng* 1998; 4: 429-444.
- 3) Nishikawa Y, Tokusashi Y, Kadohama T, Nishimori H, Ogawa K. Hepatocytic cells form bile duct-like structures within a three-dimensional collagen gel matrix. *Exp Cell Res* 1996; 223: 357-71.

- 4) Minami Y, Sugihara H, Oono S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 2316-2324.
- 5) Nakatsuka M, Mikami T, Hasimoto Y, Koni H, Chen HS, Hsiao SY, Kumabe S, Huang ST, Iwai Y, Huang HC. A preliminary study of osseointegration in the dental implant therapy in vitro – culture of mouse KUSA/A1 cells on titanium plates with different surface modifications. *TW J Oral Med Sci* 2009; 25: 4-19.
- 6) Mikami T, Kumabe S, Iwai I. A study of osseointegration—3-D culture of KUSA/A1 cells with a collagen scaffold on titanium implants with different surface modifications —. *J Oral Tissue Engin* 2010; 8: 60-73.
- 7) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8: 315-317.
- 8) Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int* 2008; 82: 238-247.
- 9) Kato T, Hattori K, Deguchi T, Katsube Y, Matsumoto T, Ohgushi H, Numabe Y. Osteogenic potential of rat stromal cells derived from periodontal ligament. *J Tissue Eng Regen Med* 2011; 5: 798-805.
- 10) 宮本哲朗, 水野守道, 田村正人, 川浪雅光. ラット骨髄間質細胞のI型コラーゲンゲル内3次元培養における骨芽細胞関連遺伝子群の発現誘導. *歯基礎誌* 2002 ; 44 : 530-540.
- 11) 山田志津香, 林善彦. 骨芽細胞分化と骨形成に関する転写因子とシグナル伝達機構. *生体医工学* 2006;44:490-495.
- 12) Bell E. Organotypic and histiotypic models of engineered tissues. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J, eds. *Principles of tissue engineering*. San Diego: Academic Press, 2000: 181-193.
- 13) Everts V, van der Zee E, Creemers L, Beertsen W. Phagocytosis and intracellular digestion of collagen, its role in turnover and remodelling. *Histochem J* 1996; 28: 229-245.
- 14) Ross MH, Pawlina W. *Cell cytoplasm*. In: *Histology: A text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2011: 22-74.
- 15) 北中千史. Non-apoptotic プログラム細胞死: アポトーシスとは形態・制御機構を異にするプログラム細胞死の存在と意義について. *山形医学* 2005;23: 83-96.
- 16) Shapiro F. Variable conformation of GAP junctions linking bone cells: a transmission electron microscopic study of linear, stacked linear, curvilinear, oval, and annular junctions. *Calcif Tissue Int* 1997; 61: 285-293.
- 17) Rosendaal M, Green CR, Rahman A, Morgan D. Up-regulation of the connexin43+ gap junction network in haemopoietic tissue before the growth of stem cells. *J Cell Sci* 1994; 107: 29-37.
- 18) Davies JE. In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec* 1996; 245: 426-445.
- 19) Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003; 67:932-949.
- 20) 山崎長郎, 高橋常男, 勝山英明, 林 揚春, 井上 孝 (編集). *Ultimate Guide IMPLANTS*. 第1版. 東京: 医歯薬出版, 2004: 38-53.
- 21) 岡本 浩監訳. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Lindhe 臨床歯周病学とインプラント 第4版 [インプラント編] 東京: クインテッセンス出版, 2005: 887-899.
- 22) 古谷野潔, 松浦正朗編著. 朝比奈泉, 和泉雄一, 佐藤博信, 寺田善博, 細川隆司. *エッセンシャル口腔インプラント学*. 第1版. 東京: 医歯薬出版, 2009; 10-37.

(Received: May 15, 2013 /
Accepted: October 17, 2013)

三上 豊ほか, コラーゲンをスキャホールドとして3次元培養した HMS0014 細胞による硬組織形成
再生歯誌 **11**(1);1-11, 2013

連絡先

隈部 俊二

〒573-1121

大阪府枚方市楠葉花園町 8-1

大阪歯科大学口腔解剖学講座

Tel: 072-864-3053

Fax: 072-864-3153

E-mail: kumabe@cc.osaka-dent.ac.jp

Hard Tissue Formation by Cell Culture Engineering of HMS0014 Cells within a Collagen Scaffold

Yutaka MIKAMI, Shunji KUMABE and Yasutomo IWAI

Department of Oral Anatomy, Osaka Dental University

Titanium (Ti) dental implant(IP)s were embedded within 3-D cultured cell clusters of human mesenchymal stem cells (HMS0014) in Cellmatrix Type I-A collagen gel scaffold; the cells were induced to differentiate into mature osteoblast(Ob)-like cells. Subsequently, we examined hard tissue formation around the Ti-IPs. After phase contrast microscopic examination of diachronic changes in the peri-IP tissue, the IPs and the surrounding scaffold were dissected, resin-embedded, ground-sectioned and prepared for light microscopy (LM). Frozen sections and ultrathin sections were further processed for LM and transmission electron microscopy (TEM) studies of the peri-IP tissue. The results demonstrated attachment of the Ob-like cells and deposition of calcifying nodules on IP surfaces. The fine structure TEM study observed secretion of type I collagen fibrils by the Ob-like HMS0014 cells along the Cellmatrix 3-D meshwork, and the occurrence of collagen-mediated mineralization in the scaffold; the cells essentially regulated ECM turnover of the engineered tissue. The present study suggests the utility of collagen gel as a tissue-engineering material to enhance contact and distant osteogenesis for the IP therapy.

Key words: *Titanium implant, HMS0014 cell, collagen scaffold, in vitro*