

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11381

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞液性因子による新規歯周組織再生治療の確立と再生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Novel periodontal regeneration using secreted factors from mesenchymal stem cells and clarification of its regenerative mechanisms.

研究代表者

岩崎 剣吾 (IWASAKI, Kengo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座講師

研究者番号：40401351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎では歯を支える組織の破壊から歯の喪失に至る。本研究の目的は歯根膜幹細胞培養上清(PDLSC-CM)投与による、歯周組織再生のメカニズムを解明することであった。PDLSC-CMあるいは不死化骨髄由来間葉系幹細胞由来培養上清はいずれも多種多様なタンパクを含み、培養血管内皮細胞に作用させると微小血管様構造の形成が促進した。また単球による炎症性サイトカイン産生はPDLSC-CMの存在下では抑制されており、PDLSC-CMが抗炎症作用を有することが明らかとなった。PDLSC-CMの移植は歯周組織再生を増強し、そのメカニズムとして含まれる多種多様な因子を介した、抗炎症作用、血管新生が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease is characterized by the chronic inflammation of tooth supporting tissues and the diseased tooth are extracted in the progression form of the disease. The purpose of this study was to investigate the mechanisms of periodontal regeneration by conditioned medium from periodontal ligament stem cells (PDLSC-CM). It has been found that PDLSC-CM and conditioned medium from immortalized bone marrow-derived mesenchymal stem cells contained wide variety of proteins and they enhanced the formation of microvasculature-like structures when applied onto endothelial cells. Additionally, production of proinflammatory cytokines by monocytes were inhibited in the presence of PDLSC-CM, suggesting the anti-inflammatory function of PDLSC-CM. The transplantation of PDLSC-CM enhanced periodontal regeneration and anti-inflammation and angiogenesis are the potential mechanism underlying the regenerative function of PDLSC-CM.

研究分野：再生医療

キーワード：再生 歯周病 幹細胞 動物実験

### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎は歯を支える歯周組織の慢性炎症を特徴とする炎症性疾患である。慢性炎症による組織破壊が進行すると歯は抜歯に至る。現在、成人日本人の抜歯の最大の原因が歯周炎であることより、再生治療によって歯周組織を再生することは国民の健康増進に直接的に関係すると考えられる。これまでも数々の歯周組織再生治療が提唱され、そのうちのいくつかは臨床応用されている。しかしながら、現在利用可能な再生治療法はいずれも適応症例の幅が狭く、また達成される再生量も少なく、確実な歯周組織再生を広く達成することは難しい状態である。そのため、未だ新規歯周再生療法が求められている。

近年、培養幹細胞移植による歯周組織再生の可能性が提唱され、動物実験を中心に広く検証されている。その結果、間葉系幹細胞を歯周組織欠損へ移植することによって新しいセメント質、歯根膜、歯槽骨を伴う歯周組織再生が起こることが明らかとなっている。しかしながら幹細胞移植による再生医療では移植後の細胞に由来する腫瘍形成、感染、コストなどの問題点も指摘されている。移植された幹細胞の組織再生機序の一つに、幹細胞が産生する液性因子が大きな役割を果たしていることが、最近の研究より明らかになっている。さらに、動物実験レベルでは幹細胞からの液性因子を細胞の代わりに移植することで、組織再生が誘導されることも報告されており、幹細胞移植に代わる再生治療法として注目されつつある。

### 2. 研究の目的

間葉系幹細胞から得られた培養上清の移植によって歯周組織再生が増強されるか否かを検証し、さらにその再生メカニズムを検討する目的で、培養上清に含まれるタンパク成分の解析を行い、抗炎症作用、血管新生作用について明らかにすること。

### 3. 研究の方法

ヒト歯根膜由来間葉系幹細胞 (PDLSC) の培養を行った。培養にあたっては実験プロトコルに対して東京医科歯科大学歯学部倫理委員会の承認を得た。健全な小白歯あるいは智歯の抜去歯から歯根膜組織を回収し、コラゲナーゼ・ディスパーゼから成る細胞分散液内で酵素処理を行い、細胞懸濁液を組織培養皿状で培養した。コロニーを形成しながら増殖する細胞群を継代培養し実験に供した。培養には15%ウシ胎児血清(FBS)含有αMEM培地を用いた。また、骨髄由来間葉系幹細胞の不死化細胞株である UBE6T-7, UE6E7-12, UE7T-13 を理化学研究所バイオリソースセンターより入手し培養し、正常ヒト維芽細胞 (NHDF) は Lonza より購入し 10% の FBS を含む DMEM 培地で培養した。マウス単球・マクロファージ細胞株である Raw264.7 については 10% FBS 添加 αMEM にて培養した。

細胞培養上清 (CM) の回収方法としては、70-80% コンフルエントの状態に細胞が達した段階で細胞を PBS で 3 回洗い、血清無添加の DMEM を加え 48 時間培養した。48 時間後、培養上清を回収し遠心分離 (1000 rpm, 5 分) 後、上清をフィルトレーション (0.2 マイクロメートル ポアサイズ) を行った。培養上清の濃縮には、さらに限外ろ過 (カットオフ値 10 kDa) を用いた。培養上清中のタンパク濃度測定には Bradford 法を用いた。

CM 中に含まれるタンパク成分の分析には、プロテインアレイキット (R&D 社および Ray Bio 社)、ELISA キット (R&D 社) および LS-MS/MS 解析を用いた。LC-MS/MS 解析は東京医科歯科大学プロテオーム解析室にて行った。

細胞の機能解析として、細胞増殖、遺伝子発現解析を行った。細胞増殖は WST-8 アッセイを、遺伝子発現解析については real-time PCR 法を用いて比較検討した。

動物実験としては、ビーグル成犬を用いた。下顎左右第二前臼歯を抜歯し、抜歯窩の治療後、第一臼歯近心面、第一前臼歯遠心面に 2 つの 3 壁性歯周組織欠損を作製する。欠損内に濃縮した PDLSC-CM をコラーゲンスポンジを担体として移植し、その上をフィブリン接着剤 (ペリプラスト) にて被覆し、さらに歯肉弁を復位縫合した。歯槽骨の再生量の評価にはマイクロ CT を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 間葉系幹細胞の分化能

培養した PDLSC は *in vitro* の分化誘導系において、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有することが確認された。また、骨髄間葉系幹細胞細胞株においては、UE6E7-12, UE7T-13 は脂肪、骨への分化が認められたが、UBE6T-7 はその分化能が非常に弱い事が明らかとなった。また、UE6E7-12 と UE7T-13 の間の比較では UE7T-13 の方が骨、脂肪への分化が UE6E7-12 よりも高い結果が得られた。多分化能については UE7T-13 が最も高い事が明らかとなった。

#### (2) 培養上清のタンパク量

PDLSC から回収された培養液に含まれるタンパク質の濃度を定量したところ、限外ろ過を行った後に約 500~800 microg/ml 程度であった。さらにもう一度限外ろ過を行うと、約 5000~7000 microg/ml 程度まで濃縮された。骨髄由来間葉系幹細胞細胞株である UBE6T-7, UE6E7-12, UE7T-13 においてもほぼ同様の結果が得られた。

#### (3) 培養上清に含まれる因子の解析

PDLSC, UE7T-13, NHDF から得られた培養上清中の細胞増殖因子の量を比較したところ、PDLSC-CM は NHDF-CM と比較して MCP-1, VEGF, bFGF の量が高い結果が得られた。また UE7T-13-CM は NHDF-CM と比較して、高濃度の

VEGF, bFGF, TGF- $\beta$  を含むことが明らかとなった。また、PDLSC-CM のプロテインアレーを行った結果、Serpine E1、TIMP-1、Pentraxin 3、uPA、VEGF、Angiogenin、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP6、MCP-1 などが多く含まれることが明らかとなった。さらに、LS-MS/MS 解析を行ったところ、PDLSC 培養上清が最も多く含むタンパク成分はコラーゲンやファイブロネクチンなどのマトリクスタンパクであることが確認された。

#### (4) 培養上清の他の細胞腫の増殖への影響

歯周組織再生に關与することが考えられる細胞種として骨芽細胞、セメント芽細胞、血管内皮を選択し、それぞれに培養上清を作用させ、細胞の増殖への影響を検討した。その結果、UET-13 の培養上清は細胞増殖に有意な影響を与えなかったが、PDLSC の培養上清は骨芽細胞、セメント芽細胞、血管内皮細胞の増殖を増強した。

#### (5) 培養上清の抗炎症作用

間葉系幹細胞の持つ重要な作用の一つに抗炎症作用がある。PDLSC-CM の抗炎症作用を検証するため、マウス由来単球・マクロファージ細胞株である Raw264.7 細胞を PDLSC-CM の存在、非存在下で IFN- $\gamma$  を用いて刺激した。この時の炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の遺伝子発現量を検討したところ、Raw264.7 における TNF- $\alpha$  発現は IFN- $\gamma$  刺激によって有意に増強するが、PDLSC-CM 存在下ではこの増強が弱められることが明らかとなった。

#### (6) イヌ歯周組織欠損モデルにおける培養上清の影響

3 壁性の外科的歯周組織欠損に対して、濃縮した PDLSC-CM を移植した。2 カ月後、マイクロ CT 上を撮し、再生歯周組織量を検討したところ、PDLSC-CM 移植により歯周組織再生が誘導されている像が得られた。

#### 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 3 件)

Akazawa K, Iwasaki K, Nagata M, Yokoyama N, Ayame H, Yamaki K, Tanaka Y, Honda I, Morioka C, Kimura T, Komaki M, Kishida A, Izumi Y, Morita I. Double-layered cell transfer technology for bone regeneration. Scientific Reports. 2016, 6, 33286. DOI: 10.1038/srep33286. (査読あり)

Nagata M, Iwasaki K, Akazawa K, Komaki M, Yokoyama N, Izumi Y, Morita I. Conditioned Medium from Periodontal Ligament Stem Cells Enhances Periodontal

Regeneration. Tissue Engineering Part A. 2017, 23, 367-377. DOI:10.1089/ten.TEA.2016.0274. (査読あり)

Akazawa K, Iwasaki K, Nagata M, Yokoyama N, Ayame H, Yamaki K, Tanaka Y, Honda I, Morioka C, Kimura T, Komaki M, Kishida A, Izumi Y, Morita I. Cell transfer technology for tissue engineering. Inflammation and Regeneration. 2017, 37, 21. DOI: 10.1186/s41232-017-0052-7. (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

永田瑞, 岩崎剣吾, 赤澤恵子, 小牧基浩, 横山尚毅, 遠井政行, 和泉雄一, 森田育男. 歯根膜幹細胞培養上清は歯周組織の創傷治癒を促進する. 第 143 回秋季日本歯科保存学会学術大会. 2015 年 11 月 13 日. 文京シビックホール(東京都文京区)

永田瑞, 岩崎剣吾, 小牧基浩, 赤澤恵子, 遠井政行, 横山尚毅, 和泉雄一. 歯根膜幹細胞由来液性因子による歯周組織再生と濃縮倍率の影響. 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会. 2015 年 05 月 15 日. 幕張メッセ(千葉県千葉市)

赤澤恵子, 岩崎剣吾, 小牧基浩, 横山尚毅, 菖蒲弘人, 八巻和正, 永田瑞. 骨芽細胞および歯根膜幹細胞を用いた二層細胞転写羊膜の作製. 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会. 2015 年 05 月 15 日. 幕張メッセ(千葉県千葉市)

赤澤恵子, 岩崎剣吾, 小牧基浩, 横山尚毅, 和泉雄一, 森田育男. 細胞転写技術を用いた二層の細胞層を有する細胞移植材料の作成. 第 37 回日本炎症・再生医学会. 2016 年 06 月 16 日~2016 年 06 月 17 日. 京都市勧業館 みやこめっせ(京都府京都市)

永田瑞, 岩崎剣吾, 赤澤恵子, 横山尚毅, 小牧基浩, 和泉雄一, 森田育男. 歯根膜幹細胞培養上清は歯周組織再生を促進する. 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会. 2016 年 10 月 06 日~2016 年 10 月 08 日. 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

岩崎剣吾, 永田 瑞, 赤澤恵子, 横山尚毅, 小牧基浩, 和泉雄一, 森田育男. Spheroid 培養時の歯根膜幹細胞における幹細胞関連遺伝子の変化. 第 145 回秋季日本歯科保存学会学術大会. 2016 年 10 月 27 日~2016 年 10 月 28 日. キッセイ文化ホール(長野県松本市)

岩崎剣吾, 永田瑞, 赤澤恵子, 横山尚

穀, 小牧基浩, 森田育男. 歯根膜由来間葉系幹細胞の spheroid 培養における幹細胞関連遺伝子の発現変動について. 第 38 回日本炎症・再生医学会. 2017 年 2017.07.19 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

なし  
(4)研究協力者  
なし

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岩崎 剣吾 (IWASAKI, Kengo)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・寄  
付講座講師  
研究者番号: 4 0 4 0 1 3 5 1

### (2)研究分担者

小牧 基浩 (KOMAKI, Motohiro)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・寄  
付講座准教授  
研究者番号: 3 0 4 0 1 3 6 8

森田 育男 (MORITA, Ikuo)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教  
授  
研究者番号: 6 0 1 0 0 1 2 9

和泉 雄一 (IZUMI, Yuichi)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教  
授  
研究者番号: 6 0 1 5 9 8 0 3

### (3)連携研究者