

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15710

研究課題名(和文) 歯肉由来間葉系幹細胞が有する疾患治療能のアスピリンによる増強

研究課題名(英文) Positive reactino of Aspirin for mesenchymal stem cell therapy

研究代表者

古谷野 潔 (Koyano, Kiyoshi)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：50195872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞(iPS-cells/MSCs)は優れた増殖能、分化能から医科/歯科領域における再生治療の切り札として研究が進められている。しかし臨床応用が現実のものとなった今、幹細胞による治療効果の不安定さが新たな問題となった(効果の大小/効果が皆無/症状を悪化)。本研究チームでは、幹細胞に対するアスピリン処理によって如何なる幹細胞にも再生治療に耐えうる能力を賦活させ、予知性の高い治療を目指すこととした。治療効果の安定性については幹細胞治療を進めていく上でクリアしなければならない問題であり、この研究によって得られる成果は歯科のみでなく幹細胞を用いたあらゆる再生・細胞治療の基盤になると期待する。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) have been isolated from a variety of tissues, including bone marrow, adipose and mucosa. MSCs have the capacity for self-renewal and differentiation. Reports have been published on the systemic administration of MSCs leading to functional improvements by engraftment and differentiation, thus providing a new strategy to regenerate damaged tissues. Recently, it has become clear that MSCs possess immunomodulatory properties and can therefore be used to treat diseases. However, the therapeutic effect mechanisms of MSCs are yet to be elucidated. Here, we investigated these mechanisms of improvement with Aspirin administration.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：間葉系幹細胞 アスピリン 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

現在インプラント治療は歯科の欠損補綴において必要不可欠な治療法となっている。ところが近年では、インプラント治療は機能の回復だけでなく、審美性の回復が望まれるようになってきている。1998年インプラント治療の先駆的会議であるITI Consensus Conference トロント大会以来、成功基準として「審美的な上部構造の機能的支持」と明記されるようになった。またOsseointegration study club of Japan等でも2006年の議題に上がっており、日本においても審美面を重要視したインプラント治療がなされている。加えて、この審美面と機能性を兼ね備えた治療は、出来るだけ長い期間維持されることが患者と術者の双方から強く望まれるようになってきている。

そのため、本研究と同様にインプラント周囲の骨結合および上皮封鎖の獲得、維持、安定を目指した研究が数多くなされるようになった。

2. 研究の目的

上記の通り、治療後のインプラントの安定は近年インプラント研究の中心となっている。歯科インプラント治療は基礎的データが欠落したまま、臨床現場で進歩を遂げた特殊な医療技術である。その有効性は患者需要の著しい伸びからも容易にうかがえる(後述図参照)。そのため、永久歯を失った際の歯科医療の選択肢としては必要不可欠なものである。研究は日々続けられその成功率も上昇、術後1年でも95%の症例で人工物であるインプラントが口腔内で歯と同様の働きをしているとされる。しかし、残りの5%や5~10年と長期経過症例ではインプラントの生存率は著しく減少し、脱落の理由に関しては解明されぬまま経験的に様々な憶測がされるのみである。

そこで我々は総合大学としての利点を生かし、インプラント専門の臨床チームの強力により原因を追及。それにより、独自の原因に行き当たった。これは独創的な発想であるが、基礎研究に十分裏打ちされた限りなく事実に近い概念と思われる。そこで我々はその歯科インプラント治療の失敗原因として浮上した新たな要因を解決させる治療薬として、近年臨床現場の表舞台に現れてきた間葉系幹細胞(MSC)に着目した。

この幹細胞もインプラント同様、臨床応用が基礎研究による裏打ちを飛び越えて始まっている医療であるが、その有効性は画期的であり多方面から研究されている。しかし基礎研究と臨床研究では間葉系幹細胞の主たる働きに関して

視点が異なる。これは実に興味深い減少であるが、我々はそれを橋渡しするとともに知識の共有をはかり、また別の角度から臨床応用につなぐことを考えている。特に本研究は「アスピリン」に注目している。アスピリン投与はペンシルバニア大学に在籍している Songtao Shi 教授の下で県有分担者が習得してきた技術である。副作用が少なく最大限の治療効果を生むことが細胞治療の最大の目的であるため、このような発想と概念は必要不可欠である。

現在すでにいくつかの研究施設がMSCを用いた再生研究を行っている。事実臨床的にその成果を上げているが、今後国としてその技術を世界に発信するには、分業的に知識や技術の多施設への分散が必要と思われる。また今回のような新たな発想をくわえることでより優れた結果が得られるものと考えられる。

そのため今回のような機会において、我々の研究を進め、さらに臨床応用することで、今後の国の医療技術の進歩に貢献していくことが最終的な目的である。

3. 研究の方法

チタン製の歯科インプラント周囲において間葉系幹細胞の存在がどれほど有効であるかを明らかにするため、動物および培養実験を各1年ずつに分けておこなった。

大まかには付着上皮細胞の単離をするとともに *in vitro* 的にインプラント体周囲での付着上皮構造再生とその接着力向上を評価する。すなわちチタンプレート上に単離した付着上皮の細胞を播種、先に挙げた増殖因子 IGF-I、EGF そして PI3K-activator を添加し、接着性の変化を定量的、形態的、生化学的に評価する。そしてインプラント上皮封鎖に適切な増殖因子とその濃度を特定した。

さらに自家採取の付着上皮細胞を、植立したプラットホームスイッチング・インプラント周囲に填入、さらに IGF-1、EGF そして PI3K-activator 等の増殖因子を添加して周囲上皮の形成を経時的に評価した。

【動物実験】

全身投与される MSC は4週齢の雄性 Wistar ラット骨髄から採取された。また6週齢実験モデルは、上顎右側第一臼歯を抜歯後、即時に純チタン製インプラント(図1)を埋入され、その24時間後に MSC が尾静脈より全身投与された。そして埋入4週後に軟組織の免疫組織化学的に観察した。さらにその封鎖性は西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP; 分子量約 41,000)をインプラント周囲溝に30分間持続投与し、その浸透深さを組織上で観察することで評価した。また図4で示す実験では GFP 遺伝子導入ラットを用いた。この際に使用する MSC にアスピリン処理を施すことでその効果を評価する。

【培養実験】

出生4日齢の Wistar ラット口腔粘膜より採取した上皮組織から上皮細胞(OECs)を単離した。

その後3日間だけ単独で培養し、同数の MSC など各種指定条件で共培養した。そして OECs が MSC から受ける影響についてアポトーシス (Apoptosis marker/ FACs)、細胞増殖能 (Brd-U assay)、接着能 (Adhesion assay) などで評価した。

なお、この際使用した MSC も正しく単離できたか分化能や増殖能などの STEMNESS を十分に評価した上で実験群に投与した。

アスピリンの効果についてはすでいくつかの報告があるが、本実験室での採取方法で応用可能か、などの確認のため再度おこなうこととする。

4. 研究成果

【動物実験】

埋入4週後のモデルで、インプラント-周囲上皮界面における接着の指標としてラミニン-332 の局在を観察した。背景でも記した通りインプラント周囲上皮の接着構造は根尖側2/3に限局していたが、MSC 投与によりインプラント体界面全体に観察された。また上皮封鎖能を直接評価する HRP の浸漬実験でも、MSC 投与群における HRP の侵入阻害能が上昇していた。

MSC 全身投与によるインプラント周囲上皮の封鎖性改善は、投与された GFP 陽性 MSC がインプラント周囲上皮と結合組織界面付近に集積することで説明出来る。ただしこの集積も1週間を過ぎると観察されない。

インプラントと周囲上皮界面におけるラミニン-332 の発現量増加や HRP の侵入抑制を示した実験結果は、MSC の全身投与がインプラント周囲での封鎖性を局所的に上昇させたことを示す。この機序として MSC の集積がある。実際、腫瘍や創傷部位への MSC 集積に加えサイトカインなどの分泌による治癒促進効果が報告されている。

本研究でもインプラント埋入という行為が炎症を惹起させ、MSC の集積を促したのかもしれない。ただしその集積が1週間と比較的短期間であるにも関わらず、埋入 4 週間後でも上皮封鎖性を高く維持していた。MSC が消失しても尚なぜ効果は持続したのだろうか。その疑問に答えるべく培養実験を以下の様に行った。

【培養実験】

OECs の単独培養 (Cont), MSC との共培養 (Co-cul)、さらに共培養時に Trans-well®を使用し、MSC との細胞接触を遮断して共培養 (Trans-well)の3群を作製した。Cont 群と比較してTrans-well 群ではOECsの生存性が上昇した。また増殖性および接着性でも有意な増加が認められた。

投与 MSC が宿主側の MSC の性質を変えた事である。病的な状況下にあるMSCは病態を悪化させる病的性質を有する事も知られており、本研究のように全身的な MSC 投与はインプラント体周囲の病的なMSCに対し炎症抑制や治癒促進を促す一方、上皮細胞にはMSCが発現するサイトカインの効果で接着性向上などの直接的影響を及ぼしているのかもしれない。

全身投与されたMSCはインプラント周囲の上皮細胞に対して直接作用し、封鎖性を向上することが示唆された。このようなMSCによる細胞治療はインプラント周囲組織における外部刺激への抵抗性を保ち、インプラント体の口腔内での長期安定化に貢献するかもしれない。

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 2 件)

1. Matsuura Y, Atsuta I, Ayukawa Y, Yamaza T, Kondo R, Takahashi A, Ueda N, Oshiro W, Tsukiyama Y, Koyano K. Therapeutic interactions between mesenchymal stem cells for healing medication-related osteonecrosis of the jaw. Stem Cell Res Ther. 2016 Aug 17;7(1):119.

2. Atsuta I, Ayukawa Y, Kondo R, Oshiro W, Matsuura Y, Furuhashi A, Tsukiyama Y, Koyano K. Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation. J Prosthodont Res. 2016 Jan;60(1):3-11.

〔学会発表〕(計 1 件)

Matsuura Y, Atsuta I, Ayukawa Y, Yamaza T, Kondo R, Takahashi A, Ueda N, Oshiro W, Tsukiyama Y, Koyano K. The 93rd IADR General Session & Exhibition 「Effect of mesenchymal stem cells on dental implant epithelial sealing」 March 19, 2017, San Francisco

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

古谷野 潔 (KOYANO, KIYOSHI)
九州大学大学院歯学研究院・口腔機能修復学講座インプラント・義歯補綴学分野・教授
研究者番号：50195872

(2)研究分担者

熱田 生 (ATSUTA, IKIRU)
九州大学大学院歯学研究院・口腔機能修復学講座インプラント・義歯補綴学分野・助教
研究者番号：30423487

鮎川 保則 (AYUKAWA, YASUNORI)
九州大学大学院歯学研究院・口腔機能修復学講座インプラント・義歯補綴学分野・講師
研究者番号：50304697

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()

追記事項として2017年6月10日現在)

所属機関：USC(南カリフォルニア大学：University of Southern California)

部局名：CCMB(Center of Craniofacial Molecular Biology)

職名：Research Associate

状況：現在中国の Department of Prosthodontics, Stomatological Hospital, Xi'an Jiaotong University(西安交通大学)と共同し「強皮症患者へのMSC投与による臨床効果」についてのプロジェクトを遂行中である。すでに8名の患者に投与し、データの採取を行っている。

今回の研究成果をもって現在上記研究所の研究所長 Songtao Shi 教授の下で研究中である。研究1年目の基礎研究時までを留

学期間とし、研究計画2年目より臨床研究を目指し国内での研究に移行する。ただ現在も九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座咀嚼機能再建学分野講師、鮎川保則らがインプラント研究を続けており、随時連携は可能であることを追記しておく。