

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20626

研究課題名(和文) 歯根膜細胞スフェロイドシートの歯周組織への応用

研究課題名(英文) Application to the periodontium of the periodontal ligament cells spheroid sheet

研究代表者

花谷 智哉 (Hanatani, Tomoya)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60649250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト抜去歯から歯根膜組織を採取し、歯根膜細胞スフェロイドを作製することに成功した。この歯根膜細胞スフェロイドと単層培養歯根膜細胞の骨分化能の比較を行ったところ、RUNX2, COL1, ALP, OPN, BSP, OCNは、歯根膜細胞スフェロイドで有意に高い発現を示した。またマウス頭蓋骨欠損モデルにおいても、歯根膜細胞スフェロイド群で新生骨量、骨欠損閉鎖率、新生骨面積率が有意に高かった。

研究成果の概要(英文)：I collected periodontium from a human evulsion tooth. And I succeeded in making periodontal ligament cells spheroids. After comparing the osteogenesis of the monolayer culture periodontal ligament cells with the periodontal ligament cells spheroids, the RUNX2, COL1, ALP, OPN, BSP, OCN significantly showed high expression in a periodontal ligament cells spheroids. In a mouse calvarial bone defect model, the newly formed bone mass, the percentage of defect closure, the percentage of newly formed bone area were significantly high in periodontal ligament cells spheroids group.

研究分野：歯周病学分野

キーワード：歯根膜細胞スフェロイド

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 歯周病と再生医療

歯周病は歯垢中の歯周病原細菌によって引き起こされる慢性炎症疾患で、歯と歯肉の付着の喪失や歯槽骨の吸収を特徴とする。近年、歯周組織本来の構造や機能を取り戻す再生治療が注目を浴びているが、歯周組織の複雑さ(セメント質・歯根膜・歯槽骨・上皮・結合組織から構成される)が再生を困難にし、現在、歯周組織を完全に回復させる治療法は存在しない。近年、歯根膜細胞に間葉系幹細胞が存在し、多分化能を有することが報告された。さらに、細胞工学技術を応用した歯根膜細胞シートが作製され、動物実験にて良好な再生能力を示している。しかし、温度感受性皿を利用した歯根膜細胞シート作製の際の操作が容易でない点が、問題である。

### (2) スフェロイド(細胞凝集塊)

生体内の組織中では、細胞はお互いに結合するだけでなく、細胞外マトリックスが作る構造により支持されている。そこにはコラーゲンやエラスチン、ラミニンなどのタンパク質が存在し、細胞間のコミュニケーションを手助けしている。細胞表面にある受容体、特にインテグリンファミリーが細胞外マトリックスに結合し、周辺環境に対してどのように応答するかを決定する。この複雑な環境を考えると、平面上に単層として広がる単層培養では、細胞の持つ本来の性質が再現できなかった。スフェロイドとは、細胞が多数凝集して、3次元状態になったものである。スフェロイド中の細胞は、細胞-細胞間が接着タンパク質を介して接合することにより、細胞間コミュニケーションが行われ、細胞分化などの生理的機能が向上することが知られている。また、幹細胞のその多様性(多分化能)を維持するのに、スフェロイド形態であることが必要とされている。近年、スフェロイドの再生医療への応用が期待され、スフェロイドを形成するための技術や材料についての研究が多くなされてきている。

### (3) スフェロイド形成技術

既存のスフェロイドの形成・培養技術では煩雑な操作が必要で、さらにスフェロイドの大きさの制御が難しいなどの問題を抱えていた。しかし、微細加工技術と基板表面修飾技術を利用することにより、簡便な操作で均質なスフェロイドを大量に形成、培養、回収できる「マイクロウェルチップ」が開発された。それを用いて、いくつかの細胞のスフェロイド形成ができるようになった。最近、歯根膜細胞と同じ間葉系細胞で、石灰化能を有し、前骨芽細胞として知られる MC3T3E1 細胞を用いてスフェロイドを形成することに成功した。

## 2. 研究の目的

多分化能を有することが知られている歯

根膜細胞を利用して、歯根膜細胞スフェロイドを作製し、その多分化能に関わる機能解析を行う。さらに、マウス頭蓋骨欠損モデルに歯根膜細胞スフェロイドを移植して、その骨再生能を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯根膜細胞スフェロイドの機能解析

歯根膜細胞より歯根膜細胞スフェロイドを作製し、幹細胞マーカーの発現や各種誘導培地(骨・軟骨)によって誘導し、その多分化能について検討する。

### (2) 歯根膜細胞スフェロイドのマウス頭蓋骨欠損への応用

作製した歯根膜細胞スフェロイドをマウス頭蓋骨欠損モデルに応用し、切片を作製し、骨再生能について検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 歯根膜細胞スフェロイドの作製

ヒト抜去歯の歯根中央 1/3 から鋭利なメスにて歯根膜組織を採取し、コラーゲナーゼ・ディスパーゼを用いた酵素法により歯根膜細胞を分離した。歯根膜細胞を 100mm dish でサブコンフルエントまで培養、150mm dish に継代することにより十分な細胞数を確保した。スフェロイド作製用マイクロウェルチップに歯根膜細胞を播種し、3日間培養することで、歯根膜細胞スフェロイドを作製した。マイクロウェルチップに播種後 3 時間では、細胞はウェル内に散在していたが、6 時間で凝集し始め、72 時間後には完全な球状のスフェロイドを形成した。

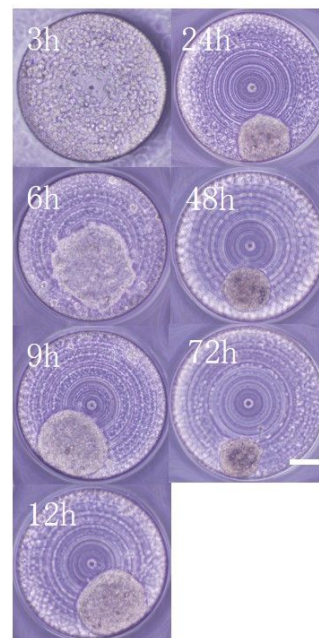


図1 歯根膜細胞スフェロイドの形成

### (2) 歯根膜スフェロイドの機能解析

Real time RT-PCR を用いて、多能性マーカー

ー (OCT4, NANOG) の遺伝子発現を確認した。単層培養歯根膜細胞と比較して、歯根膜細胞スフェロイドにおける多能性マーカー遺伝子の発現は上昇し、歯根膜細胞スフェロイドは幹細胞の多能性を維持することが示唆された。FACSを用いて、間葉系幹細胞マーカー (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146) と造血系細胞マーカー (CD34, CD45) の表面抗原発現を確認した。歯根膜細胞スフェロイドにおいて、単層培養歯根膜細胞と同様に間葉系幹細胞マーカーの発現がみられ、ネガティブコントロールである造血系細胞マーカーの発現はみられなかった。以上のことから、歯根膜細胞スフェロイドには間葉系幹細胞が存在し、多分化能を有することが示唆された。

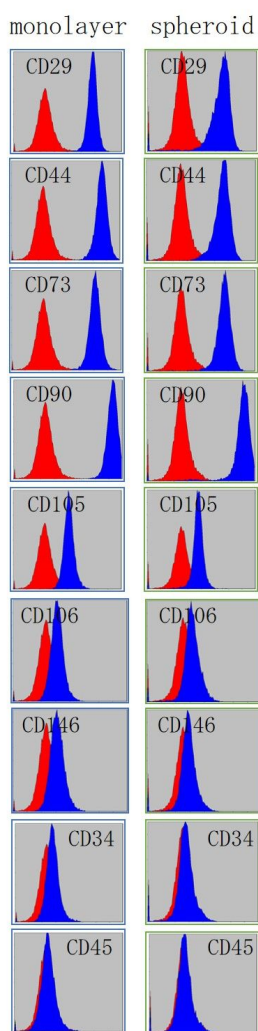


図2 FACSによる単層培養歯根膜細胞と歯根膜細胞スフェロイドの幹細胞性の検討

### (3) 多分化能の検証

軟骨分化条件 (dexamethasone, ascorbate, ITS+, sodium pyruvate, proline を含む培地で培養) で 21 日間ペレット培養後、4%パラホルムアルデヒドにより固定し、パラフィン包埋後切片を作製し、HE 染色およびアルシアンブルー染色を行った。歯根膜細胞スフェロ

イドは単層培養歯根膜細胞と同様にアルシアンブルーで染色されたことから、軟骨に分化することが示唆された。歯根膜細胞スフェロイドと単層培養歯根膜細胞を骨分化条件 (dexamethasone, ascorbate, -glycerophosphate を含む培地で培養) で 14 日まで培養し、アリザリンレッド染色、real time RT-PCR による骨関連遺伝子 (RUNX2, COL1, ALP, OPN, BSP, OCN) の発現、ALP 活性を比較した。アリザリンレッド染色で検出した歯根膜細胞スフェロイドにおける石灰化結節量は、単層培養歯根膜細胞と比較して有意に増加した。培養 7, 10, 14 日目の real time RT-PCR において、骨分化の初期に発現が上昇する RUNX2, COL1, ALP は、7, 10 日目で歯根膜細胞スフェロイドが有意に高い発現を示し、骨分化の後期に発現が上昇する OPN, BSP, OCN は、10, 14 日目で歯根膜細胞スフェロイドが有意に高い発現を示した。培養 0, 7, 10, 14 日目の ALP 活性において、歯根膜細胞スフェロイドは 7, 10, 14 日目で有意に高い活性を示した。

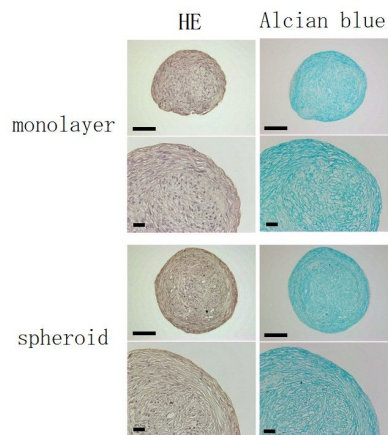


図3 単層培養歯根膜細胞と歯根膜細胞スフェロイドのアルシアンブルー染色



図4 単層培養歯根膜細胞と歯根膜細胞スフェロイドのアリザリンレッド染色

### (4) マウス頭蓋骨欠損モデルにおける歯根膜細胞スフェロイドの骨再生能

ヒト抜去歯牙から採取した歯根膜組織より、酵素法にて歯根膜細胞を単離し、マイクロウェルチップに播種して歯根膜細胞スフェロイドを作製した。C57BL/6N マウス (46 匹) の右側頭蓋骨頂部に、トレフィンバーを

用いて直径 3mm の骨欠損を作製し、マトリゲル®をスキャフォールドとして、マトリゲル®移植、偽手術 (sham) を行った。14 日、28 日後に屠殺し、エックス線写真撮影後、脱灰薄切標本作製した。HE 染色を行い、移植により生じた新生骨について検証した。エックス線写真解析および組織切片解析において、歯根膜細胞スフェロイド移植群は他の群と比較して有意に高い新生骨量を示し、骨欠損閉鎖率、新生骨面積率が他群に比較して有意に高かった。

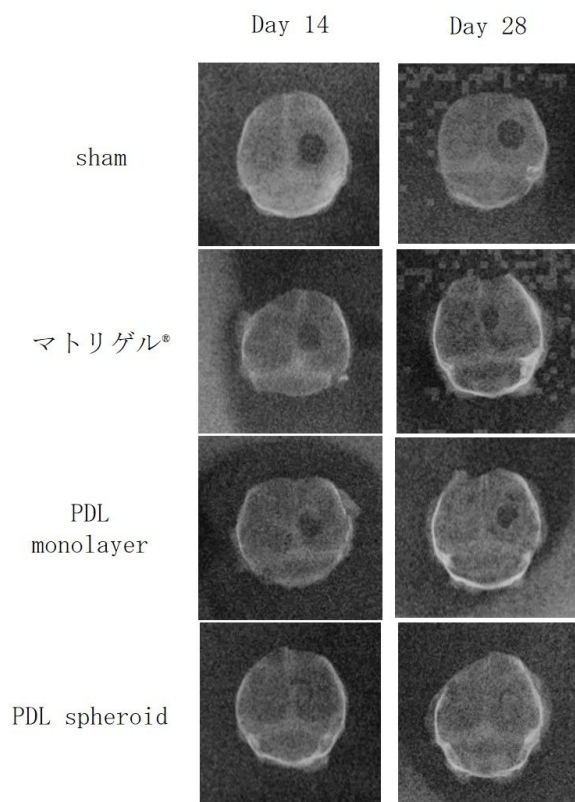


図 5 マウス頭蓋新生骨エックス線写真

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

森谷 友貴、臼井 通彦、花谷 智哉、佐野 孝太郎、西原 達次、中島 啓介、歯根膜細胞スフェロイドは骨分化能を増強する、第 59 回春季日本歯周病学会学術大会、鹿児島、2016 年 5 月 19-20 日

森谷 友貴、臼井 通彦、花谷 智哉、佐野 孝太郎、中富 満城、有吉 涉、西原 達次、中澤 浩二、中島 啓介、スフェロイド培養が歯根膜細胞の骨分化能に及ぼす影響、平成 28 年度 日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会、長崎、2016 年 11 月 6 日

〔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〕  
特記事項なし

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

花谷 智哉 (HANATANI Tomoya)  
九州歯科大学・歯周病学分野・助教  
研究者番号： 60649250

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

臼井 通彦 (USUI Michihiko)  
九州歯科大学・歯周病学分野・准教授  
研究者番号： 10453630

有吉 涉 (ARIYOSHI Wataru)  
九州歯科大学・感染分子生物学分野・准教授  
研究者番号： 40405551

中富 満城 (NAKATOMI Mitsushiro)  
九州歯科大学・解剖学分野・講師  
研究者番号： 10571771

中澤 浩二 (NAKAZAWA Kohji)  
北九州市立大学・国際環境工学部・教授  
研究者番号： 00304733

#### (4) 研究協力者

森谷 友貴 (MORITANI Yuki)

九州歯科大学・歯周病学分野・大学院4年  
研究者番号：なし

佐野 孝太郎 (SANO Kotaro)  
九州歯科大学・歯周病学分野・大学院3年  
研究者番号：なし