

令和元年6月9日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11838

研究課題名(和文) 歯根膜・血管内皮細胞共培養スフェロイドを用いた組織再生の試み

研究課題名(英文) Periodontal resgeneration using co-cultured spheroids of hPDLMSCs and HUVECs

研究代表者

臼井 通彦 (USUI, MICHHIKO)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：10453630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯根膜幹細胞(hPDLMSC)とヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)から作製した共培養スフェロイドの特性と歯周組織再生能を検証した。共培養スフェロイドは、hPDLMSCスフェロイドや単層培養したhPDLMSCに比較して、幹細胞関連遺伝子発現、VEGF発現、骨分化誘導時の骨関連遺伝子発現、石灰化結節量が有意に高かった。また、ラット歯周組織欠損モデルへ共培養スフェロイドの移植を行うと、hPDLMSCスフェロイドを移植した群に比較して、歯槽骨再生には有意な差を認めなかったものの、新生セメント質形成が有意に増加していた。以上の結果より、共培養スフェロイドは歯周組織再生を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト歯根膜幹細胞(hPDLMSC)とヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)から作製した共培養スフェロイドはすでに再生能を有すると報告されている歯根膜細胞に比較して、歯周組織欠損部において、歯槽骨のみならず、歯根膜・セメント質といった組織に関しても、有意に高い再生能力を示した。hPDLMSC、HUVECの細胞の組み合わせ、並びにスフェロイドという培養形態は組織再生を目的とした細胞移植において、有効なツールとなりえる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We investigated the characteristics and potential of periodontal tissue regeneration in co-cultured spheroids of hPDLMSCs and HUVECs in vitro and in vivo. The expression levels of stemness markers, vascular endothelial growth factor (VEGF), and osteogenesis-related genes were up-regulated in co-cultured spheroids, compared with monolayer and spheroid cultures of hPDLMSCs. The nodule formation was increased in co-cultured spheroids, compared with monolayer and spheroid-cultured hPDLMSCs. Periodontal tissue defects were prepared in the maxillary first molars of rats and subjected to transplantation assay. Treatment with co-cultured spheroids enhanced new cementum formation after 4 or 8 weeks of transplantation, although there was no significant difference in the new bone formation between co-cultured spheroids and hPDLMSC spheroids. These data suggest that co-cultured spheroids enhance the periodontal tissue regeneration.

研究分野：歯周病学

キーワード：スフェロイド 歯根膜幹細胞 歯周組織再生

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯の支持組織である歯周組織に生じる慢性炎症疾患であり、進行すると最終的には歯の喪失に至る。近年、失われた歯周組織を再生するために、成長因子を用いたサイトカイン療法などの数々の再生療法が行われているが、種々の組織から構成される歯周組織の複雑さが再生を困難にし、歯周組織を完全に回復するには至っていない。多分化能を有する間葉系幹細胞 (MSC) は、組織工学の発展とともに組織再生に有効であることが明らかとなってきた。本研究では、MSC の性質を有し、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞に分化できる歯根膜幹細胞 (hPDLMSC) に注目した。歯周組織において、hPDLMSC は骨芽細胞あるいはセメント芽細胞に分化することが知られている。また、細胞工学技術を応用して作製された歯根膜細胞シートが動物実験にて良好な再生能力を示しており、新たな歯周組織再生治療のツールとして期待されている。一般的に、MSC は 2 次元培養法で単層培養され、培養皿から分離する際にはタンパク質分解酵素で処理される。この過程で細胞と細胞外マトリックスの相互作用が傷害され、細胞機能の一部が損なわれる。3 次元培養では、2 次元培養と比べて *in vivo* の微小環境がより忠実に模倣されており、細胞間の相互作用、細胞外マトリックスの組成、種々の成長因子の発現など様々な生理機能が向上する。スフェロイドは 3 次的に自己凝集した球状の細胞塊である。スフェロイド培養された MSC は、2 次元で培養された MSC よりも分化誘導した際に分化能が高いことから、スフェロイド培養は MSC の生理活性および治療効率を増強することが示唆された。我々のスフェロイド作製用マイクロウェルチップは、細胞が接着しないようにウェル内にポリエチレングリコール (PEG) を付着させており、酵素処理することなくウェルからスフェロイドを回収することができ、従来のスフェロイド形成方法に比べて簡便である。

我々は、スフェロイド培養した hPDLMSC が単層培養 hPDLMSC に比べて幹細胞性が向上し、骨組織形成能が促進していることを見出した。また、最近の研究によれば、hPDLMSC-HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) 共培養細胞シートは、hPDLMSC 細胞シートに比べて骨形成遺伝子マーカーを高く発現し、移植実験において、歯周組織再生に成功したと報告されている。以上より、hPDLMSC、HUVEC とスフェロイドを組み合わせることによって、歯周組織再生に効果的なツールとなりうる可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究では、hPDLMSC と HUVEC を組み合わせた共培養スフェロイドを作製してその特性を検証し、さらにラット歯周組織欠損モデルに移植した際の歯周組織再生を評価することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### ① 共培養スフェロイドの作製

マイクロウェルチップを用いた共培養スフェロイドの作製は、堺らの方法に従った [23, 24]。共培養スフェロイドを作成するために、細胞数  $4.0 \times 10^5$  で、hPDLMSC と HUVEC の細胞比を 1:1, 1:2, 2:1 とした細胞懸濁液をマイクロウェルチップ上に播種した。細胞をマイクロウェルチップに 2,000 cells/well で播種し、35 mm 培養皿 (BD Falcon) 中で、 $\alpha$ -MEM および EGM-2 を混合した 2 mL の培地で 3 日間培養した。スフェロイドは、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。播種 3 日後、共培養スフェロイド、hPDLMSC スフェロイド、HUVEC スフェロイドを光学顕微鏡 (BX50; Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

#### ② 骨分化誘導により形成される石灰化結節の解析

細胞数  $4.0 \times 10^3$  の単層培養 hPDLMSC, 2 個の hPDLMSC スフェロイド (2,000

cells/spheroid), 2 個の共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1) (2,000 cells/spheroid) を単層培養条件で 48 well 培養皿 (Iwaki) に播種し, 細胞がコンフルエントに達した際に, デキサメタゾン, L-グルタミン酸, アスコルビン酸, ペニシリン/ストレプトマイシン, mesenchymal cell growth supplement,  $\beta$ -グリセロリン酸を含む hMSC Osteogenic Differentiation Medium (OIM; Lonza) に培地交換した. 骨分化誘導の 3, 7, 10, 13, 21 日後, 細胞を 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (Wako) で固定し, 沈着したカルシウム結節を 1%アリザリンレッド溶液 (Wako) で染色した. Image J (National Institutes of Health; Bethesda, MD, USA) を用いて培養皿の底面積およびアリザリンレッド陽性面積を測定し, アリザリンレッド陽性率を算出した.

### ③ラット歯周組織欠損モデルの作製およびスフェロイド移植実験

44 匹の SD ラット (7 週齢, オス; CLEA Japan, Tokyo, Japan) に 3 種混合麻酔 (メドミジン塩酸塩 (0.15 mg/kg) (Wako), ミダゾラム (2 mg/kg) (Dormicum®, Astellas Pharma, Tokyo, Japan) および酒石酸ブトルファノール (2.5 mg/kg) (Vetorphale®, Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan)) を腹腔内投与し, 全身麻酔を行った. 両側上顎第 1 大臼歯の歯肉を切開し, 口蓋側の全層歯肉弁を剥離した. 歯槽骨, 歯根膜およびセメント質を歯科用バーで除去して, 近心に分岐部欠損 (頬側・口蓋側の深さ 1.3 mm; 水平的深さ 1.5 mm) を作製した. 欠損底を示すために, ノッチを近心頬側根および口蓋根に作製した. 欠損には, (1) 偽手術 (Sham; n=3); (2) マトリゲル® (Corning; One Riverfront Plaza Corning, NY, USA) (n=3); (3) 単層培養 hPDLMSC (細胞数  $4.0 \times 10^5$ ) + マトリゲル® (n=5); (4) 単層培養 HUVEC (細胞数  $4.0 \times 10^5$ ) + マトリゲル® (n=5); (5) hPDLMSC スフェロイド (個数  $2.0 \times 10^3$ ; 2,000 cells/spheroid) + マトリゲル® (n=6); (6) 共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 個数  $2.0 \times 10^3$ ; 2,000 cells/spheroid) + マトリゲル® (n=6); (7) 共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 2, 個数  $2.0 \times 10^3$ ; 2,000 cells/spheroid) + マトリゲル® (n=6); (8) 共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 2 : 1, 個数  $2.0 \times 10^3$ ; 2,000 cells/spheroid) + マトリゲル® (n=6) の 8 通りの処置を行った. 各群の細胞はマトリゲル®をスキャフォールドとして欠損に移植した. 移植後, 歯肉弁を復位し 7-0 縫合糸 (Mani, Tochigi, Japan) で縫合した. 本実験は九州歯科大学動物実験委員会の承認を得ている (承認番号 16-027).

### ④ 3 次元マイクロ X 線 CT 解析

移植 4 週間あるいは 8 週後に屠殺を行ない, 上顎サンプルを取り出し, 3 次元  $\mu$ CT (Cosmoscan GX; Rigaku Co., Tokyo, Japan), TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan) を用いて, 手術部位の骨充填率および BV/TV を測定した. スライス CT 画像において, 上顎第 1 大臼歯口蓋側と近心頬側根の近心側と遠心側に 2 本の接線を引き, 遠心接線に垂直な線を分岐部の中央に引いた. 垂直線上で, 図 4a で示す長さを用いて, 骨充填率 =  $(a / (a + b)) \times 100$  で算出した. さらに, 手術部位における新生骨量および骨密度を定量化するために, 図 4d で示すように, 口蓋側と近心頬側根の間の部位で根尖から近心分岐部までの BV/TV を測定した.

### ⑤ 組織学的分析

3 次元  $\mu$ CT 解析後, 上顎サンプルを 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (Wako) で 3 日間固定した. Morse's solution で 4 日間脱灰し, 脱水, パラフィン包埋を行った. 8  $\mu$ m 厚さの薄切連続切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色 (H&E) で染色した. 新生骨面積率および新生セメント質形成率は Image J を用いて測定した. 新生骨面積率は, 新生骨頂とノッチに囲まれた面積を測定した. 新生セメント質は, ノッチよりも歯冠側に認められ, シャーピー

一線維が入り込んでいるセメント質と定義し、新生セメント質形成率は、ノッチからノッチまでの露出根面に沿って形成された新生セメント質の長さの割合で表した。また、細胞移植群については、アザン染色を行った。パラフィン包埋したサンプルを、0.1%アゾカルミン G 水溶液 (Wako)、アニリン・アルコール (Wako)、酢酸アルコール (Wako)、5%リンタングステン酸水溶液 (Wako)、アニリン青・オレンジ G 液 (Wako) で染色した。

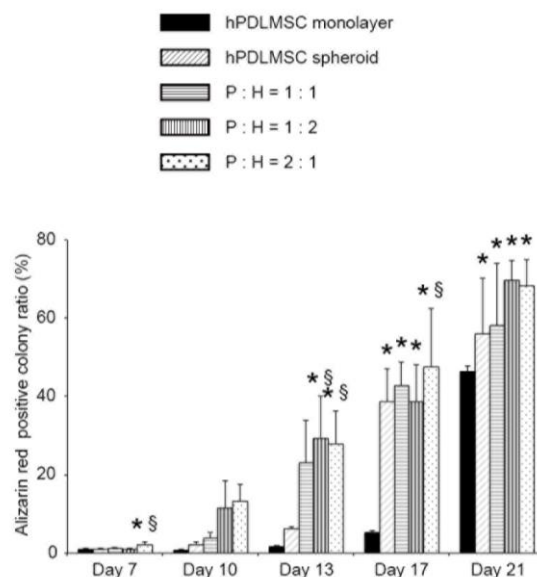
#### 4. 研究成果

##### ① 共培養スフェロイド形成と幹細胞性

マイクロウェルチップを用いて hPDLMSC スフェロイドを作製することができた(図 1a-4)。共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1) の作製も可能であり、ピペッティングでマイクロウェルから落下させても形態を維持できていた。幹細胞の自己複製および幹細胞性の調節に重要な転写因子である *OCT4*, *NANOG* の発現を検討した。リアルタイム RT-PCR の結果より、共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 2) の *OCT4* と *NANOG* の発現は、単層培養した hPDLMSC と HUVEC、および hPDLMSC スフェロイドと比べて、有意に上昇していた

##### ② 共培養スフェロイドにおける石灰化能の亢進

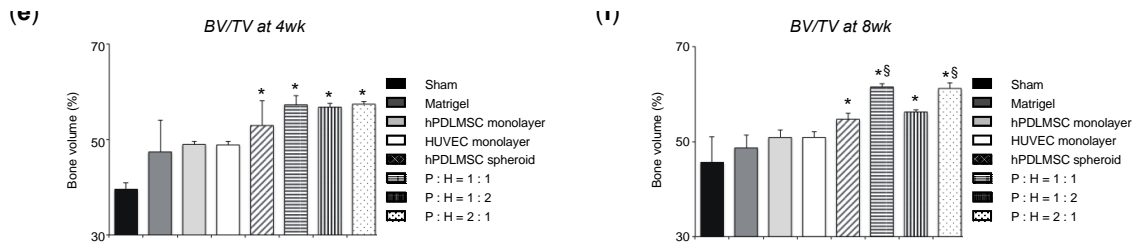
共培養スフェロイドの骨分化能を検討するために、OIM で培養した共培養スフェロイドの石灰化結節の解析を行った。以前の報告と同様に、hPDLMSC スフェロイドは単層培養 hPDLMSC に比較して、形成された石灰化結節量は増加していた。一方、OIM 存在下培養 13 日目では、共培養スフェロイド群 (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 2, 2 : 1) は、hPDLMSC スフェロイドよりも多い石灰化結節を形成したが、培養 17 日以降では共培養スフェロイド培養群と hPDLMSC スフェロイド群の間に有意な差を認めなかった。以上の結果より、共培養スフェロイドでは石灰化が早期に誘導されることが示唆された。



##### ③ 共培養スフェロイドの歯槽骨再生能の亢進

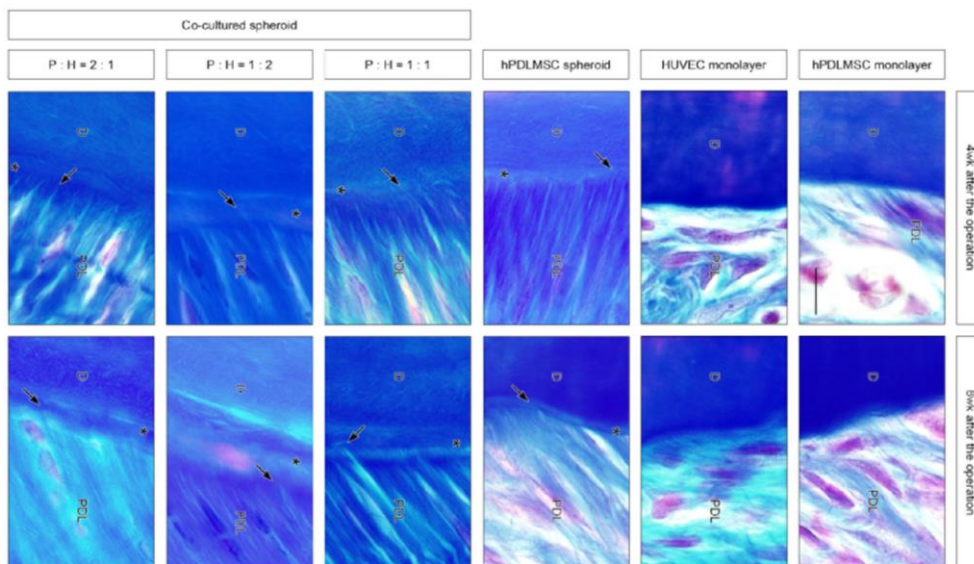
共培養スフェロイドの歯周組織再生能を明らかにするために、ラット上顎第 1 大臼歯近心分岐部に歯周組織欠損を作製し、共培養スフェロイドの移植実験を行った。移植 4 週並びに 8 週後において、共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1) および hPDLMSC スフェロイド移植群の骨充填率は Sham 群と比べて有意に高い値を示した。一方、単層培養 hPDLMSC 群と Sham 群の間と共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1) 群と hPDLMSC スフェロイド群の間にも、骨充填率において有意な差は認められなかった。

また、BV/TV に関しても骨充填率と同様に、共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1) と hPDLMSC スフェロイド移植群は、Sham 群と比べて有意に高い値を示したが、移植 8 週後においては、共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 2 : 1) と単層培養 hPDLMSC 移植群の間に、有意な差を認めた。これらのデータから、スフェロイド (共培養および hPDLMSC) 群では Sham 群、マトリゲル®群、単層培養 HUVEC 群と比べて新生骨形成が亢進していることが示唆された。



#### ④ 共培養スフェロイドの歯根膜・セメント質再生能の亢進

共培養スフェロイドによる歯根膜とセメント質の再生を検証するために、組織学的分析を実施した。移植後 4 週および 8 週において、Sham 群とマトリゲル®群では新生骨はほとんど観察されなかったが、共培養スフェロイド群 (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1) および hPDLMSC スフェロイド群では単層培養群 (hPDLMSC, HUVEC) と比べて多くの新生骨形成を認めた。術後 8 週の共培養スフェロイド群 (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1) および hPDLMSC スフェロイド群の新生骨面積率は Sham 群と単層培養 hPDLMSC 群と比べて有意に高かった。しかし、共培養スフェロイド群と hPDLMSC スフェロイド群の間に統計学的有意差は認められなかった。次に、共培養スフェロイド群 (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 2 : 1) の新生セメント質形成率は、hPDLMSC スフェロイド移植群と比べて有意に高かった。H&E 染色を高倍率で観察すると、共培養スフェロイド群 (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1) および hPDLMSC スフェロイド群において、セメント質に入り込んでいるシャープ線維が認められた (下図)。膠原線維を特異的に染色するアザン染色切片においても、共培養スフェロイド群 (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1) および hPDLMSC スフェロイド群では、シャープ線維はセメント質に入り込んでいた。すなわち、再生された歯根膜線維とセメント質には結合組織性付着が生じていることがわかった。これらのデータから、共培養スフェロイドの移植は、hPDLMSC スフェロイド移植と比べて新生セメント質形成を有意に高め、結合組織性付着が生じることが示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 4 件）

1. Enoki Y, Sato T\*, Kokabu S, Hayashi N, Iwata T, Yamato M, **Usui M**, Matsumoto M, Tomoda T, Ariyoshi W, Nishihara T, Yoda T (2017) Netrin-4 Promotes Differentiation and Migration of Osteoblasts. *In vivo* 31:793-799.
2. Hayashi N, Sato T\*, Kokabu S, **Usui M**, Yumoto M, Ikami E, Sakamoto Y, Nifuji A, Hayata T, Noda M, Yoda T. (2018) Possible association of oestrogen and Cryba4 with masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia. *Oral Diseases* doi.org/10.1111/odi.12876
3. Hieda Y, **Usui M**, Nakamura T, Morishita M, Hanatani T, Moritani Y, Koga Y, Kasai S, Inoue M, Nakashima K\*. (2018) Decreased Ratios of Interleukin-1 $\beta$  and Intercellular Adhesion Molecule 1 in Gingival Crevicular Fluid after Scaling and Root Planing Associated with Periodontal Pocket Healing. *Open Journal of Stomatology* 7: 361-376.
4. Moritani Y, **Usui M**\*, Sano K, Nakazawa K, Hanatani T, Nakatomi M, Iwata T, Sato T, Ariyoshi W, Nishihara T, Nakashima K. (2018) Spheroid culture enhances osteogenic potential of periodontal ligament mesenchymal stem cells. *Journal of Periodontal Research* 53: 870–872.

〔学会発表〕（計 6 件）

1. **白井通彦** スフェロイド作製技術による歯周組織再生の試み 平成 28 年度九州歯科学会総会 北九州 平成 28 年 5 月 29 日
2. 森谷友貴, **白井通彦**, 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 鹿児島県民交流センター、宝山ホール（県文化センター）平成 28 年年 5 月 20 日～5 月 21 日
3. **白井通彦** 歯肉上皮を再考する～その多様性と生物学的役割～日本歯周病学会学術大会 福岡 平成 29 年 5 月 11 日
4. 佐野孝太郎 **白井通彦** 中島啓介 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 日本歯周病学会学術大会 福岡 平成 29 年 5 月 12 日
5. 佐野孝太郎 **白井通彦** 中島啓介 平成 29 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 福岡 平成 29 年 11 月 19 日
6. 佐野孝太郎, **白井通彦**, 歯根膜細胞-血管内皮細胞 共培養スフェロイドは歯周組織再生を促進する. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 九州大学病院キャンパス百年講堂, 平成 30 年 9 月 5-7 日

〔図書〕（計 件）

無し

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

無し

○取得状況（計 0 件）

無し

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

無し

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：中澤浩二

ローマ字氏名：Nakazawa Koji

研究協力者氏名：佐野孝太郎

ローマ字氏名：Sano Kotaro

研究協力者氏名：森谷友貴

ローマ字氏名：Moritani Yuki

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。