

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20460

研究課題名(和文) GDNFの持続的的刺激が象牙芽細胞・骨芽細胞の生存と炎症応答に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of continuous stimulation of GDNF on the survival and inflammatory response of odontoblast and osteoblast

研究代表者

西藤 法子 (Saito, Noriko)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：40735099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)： グリア細胞神経栄養因子(GDNF)分泌カプセルは長期間GDNFとVEGFを分泌し、コントロールカプセルはVEGFのみ持続的に分泌している。低栄養状態の象牙芽細胞様細胞(KN3細胞)を各カプセルの維持培地で刺激するとKN3細胞の生存細胞数がネガティブコントロール群より多く、ALP活性も有していた。両カプセルから分泌されているVEGFの阻害でコントロールカプセルで細胞生存数が減少した。以上の結果からGDNF分泌カプセルは、低栄養状態においてKN3細胞の細胞生存に有効であることが示唆された。研究内容を論文にまとめJournal of Regenerative Medicineに受理された。

研究成果の概要(英文)： Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) secreting capsule secreted GDNF and VEGF for more than 12 months, and the control capsule secreted only VEGF persistently. When odontoblast-like cells (KN3 cells) were co-cultured with the maintenance medium of both capsules under long-term starvation conditions, the number of living cells were significantly greater than without capsules and had ALP activity performance. Also, inhibition of VEGF in maintenance medium secreted from both capsules resulted in a decrease in cell survival number only in the control capsule stimulation group.

The present study provide the first evidence that the sustained delivery of GDNF from encapsulated, genetically-modified cells can enhance and prolong the survival of KN3 cells under in vitro long-term starvation conditions. And this study was accepted the paper by Journal of Regenerative Medicine.

研究分野：歯内治療学

キーワード：歯学 グリア細胞神経栄養因子 血管内皮細胞増殖因子 象牙芽細胞 細胞増殖能

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯内治療は歯科用顕微鏡やコーンビームCT、ニッケル・チタン製ファイルなどが開発され、検査や治療手技に関する進歩が見られている。しかし、不可逆的な歯髄炎症における抜髄や、根尖病巣の治癒のために根管を洗浄し患者自身の免疫に頼った自然治癒を期待する根本的な歯内治療については未だ進歩が見られていない。

(2) 我々の研究室では歯髄の局所的な再生を目的として、炎症制御や細胞誘導に関する研究を進めてきた。歯髄の局所的再生療法の確立のためには、残存歯髄の炎症制御や細胞の生存が重要であり、局所に対して持続的な必要因子の供給が必要となる。

(3) 必要な因子を持続的に分泌する細胞をカプセルに封入し、治療として体内に静置することを目的とした微小カプセル技術がある。アメリカ合衆国のGloriana Therapeutics Incorpration (旧NsGENE社)は、アルツハイマー病やパーキンソン病の治療として既に臨床研究が進められているグリア細胞神経栄養因子(GDNF)分泌カプセルを開発している。GDNFは神経細胞の生存や分化誘導に対する強力な栄養因子であり、神経組織以外でも発現が知られている。また、カプセルは微小なもので0.4mmの円柱状から、シート状にも形態を変えることが可能である。

## 2. 研究の目的

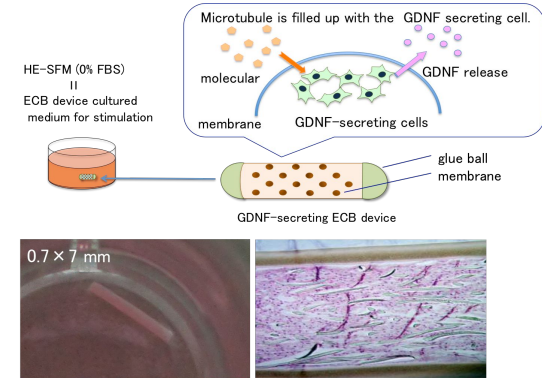
(1) 最終目標は歯髄・根尖性歯周組織に生じた炎症を制御し、組織再生誘導を積極的に行うことで、歯髄の局所的再生を行うことである。GDNFは歯の発生やラット初代培養歯髄細胞、骨芽細胞と炎症応答に関与していることが明らかにされている。以上のことから、積極的な組織誘導のために、持続的にGDNFを分泌するGDNF分泌カプセルを利用する研究を、*in vitro*と*in vivo*の実験系で行い、歯髄細胞への影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 共同研究であるアメリカ合衆国のGloriana Therapeutics Incorpration (旧NsGENE社)からGDNF分泌カプセルを供与された。GDNF分泌カプセルは恒常的にGDNFを分泌するように遺伝子改変したヒト網膜色素上皮細胞(ARPE19)を封入している。コントロールカプセルは遺伝子改変前のARPE19細胞を封入してある。各カプセルの表面には微小な孔が存在し、封入された細胞が分泌した因子はカプセルを浸漬している培地中に漏出する。

我々は*in vitro*の実験系でGDNF分泌カプセルを使用するため、供与直後から継続的に

カプセルの維持培地である無血清 Human Endothelial SFM (HE-SFM, Invitrogen) にカプセルを浸漬させ5% CO<sub>2</sub>, 37℃で管理した。管理期間中の維持培地中に分泌する因子を経時的にELISA法で確認することで、カプセルの使用可能な期間とGDNFの分泌量を判断した。また、ARPE19細胞が分泌する血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の分泌も検討した。



(2) 歯髄に対する影響を検討するため、ラット歯髄由来の株化細胞である象牙芽細胞様細胞(KN3細胞)を用いた。KN3細胞はアルカリフォスファターゼ活性も有している。KN3細胞の培養と播種は10%FBS含有-MEM培地で行い、各実験の細胞付着は24時間行った。

カプセルを共培養したKN3細胞の形態的解析を行うため、24well plateに播種したKN3細胞の培地を24時間後に0.1%FBS含有MEMに交換し、カプセルを静かにKN3細胞状に浸漬させた。各カプセルと7日間共培養した後、位相差顕微鏡法を用いてKN3細胞の形態を観察した。

また、カプセルを維持培地からKN3細胞の培養培地に浸漬するため、カプセル内の細胞が維持培地と異なる0.1%FBS含有-MEMでも機能するか転倒した。0.1%FBS含有-MEMに浸漬させたカプセルの上清中のGDNFの分泌量の変化をELISA法で測定した。

(3) KN3細胞の細胞生存率を検討するため、KN3細胞を播種し24時間後、0.1%FBSの各刺激培地で7日間、14日間培養した。ポジティブコントロールとして1%FBS含有-MEM培地(Group1)、ネガティブコントロールは0.1%FBS含有MEM培地(Group2)、0.2%FBS-MEM培地にカプセルの維持培地である無血清HE-SFMを等量加えた培地(Group3)、0.2%FBS-MEM培地にコントロールカプセルの維持培地を等量加えた培地(Group4)、0.2%FBS-MEM培地にGDNF分泌カプセルの維持培地を等量加えた培地(Group5)で刺激した。刺激は2日置きに行った。

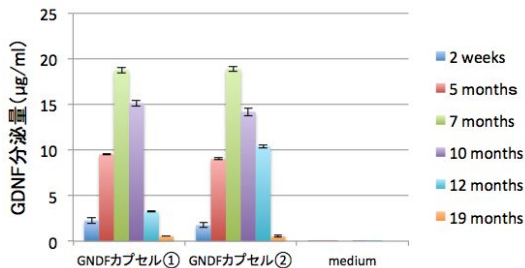
それぞれ7日間、14日間培養した細胞は死細胞をトリパンブルー染色で検出し、総細胞数と生存細胞数を算出した。

(4) 刺激後の細胞の回復能を検討するために、(3)と同様に KN3 細胞を刺激した後 2 日間、1 %FBS 含有 -MEM 培地で培養した。培養後の細胞に対してトリパンブルー染色で死細胞を検出し、生存細胞数を算出した。また、7 日間刺激した後 1 %FBS 含有 -MEM 培地に交換し、1 日後と 3 日後の細胞に対して ALP 活性と ALP 染色を行い、本来有している ALP 活性を維持しているか検討した。

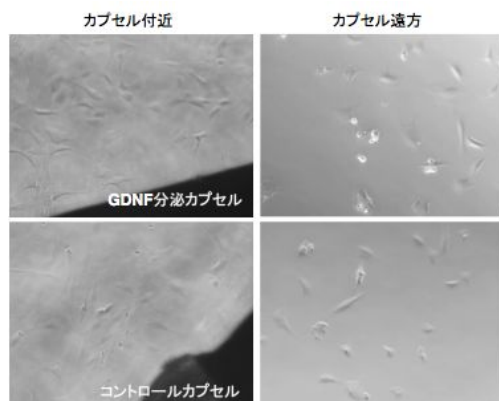
(5) 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は、両方のカプセル内の ARPE19 細胞から分泌していることが知られている。VEGF の阻害を可溶性 Flt-1 (組換えヒト VEGF R1 / Flt-1 Fc キメラ、321-FL、R & D system) で行い、培養後の細胞生存率を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) ELISA の結果から GDNF 分泌デバイスからの GDNF が 12 か月という長期間継続的に分泌していることを確認した。ARPE19 細胞が分泌する VEGF は、GDNF 分泌カプセルとコントロールカプセルから恒常的な分泌を確認した。

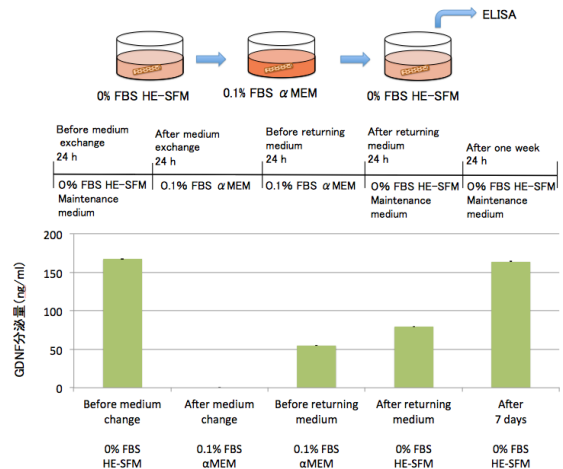


(2) 播種した KN3 細胞上にカプセルを静置させ、7 日間共培養した結果、GDNF 分泌カプセルとコントロールカプセルの両方において、カプセルの下の細胞は生存を確認した。しかし、カプセルから離れた領域では細胞は生存しなかった。



<カプセルと共培養したKN3細胞の形態>

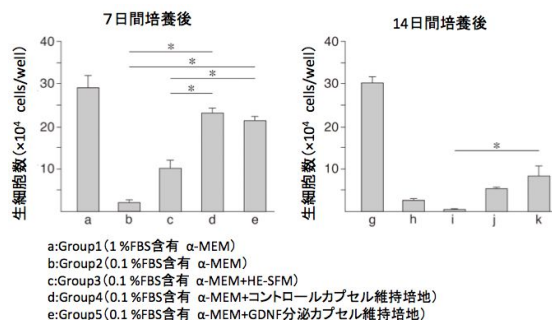
カプセルを維持培地から 0.1 %FBS 含有 MEM 培地に移動させると、維持培地中に浸漬されている場合と比較し、GDNF の分泌量が減少することが ELISA 法で確認された。



このことから、KNS 細胞に対する実験には、カプセルの維持培地を採取し、刺激物として加えることとした。

(3) 各カプセルの維持培地で 7 日間刺激した KN3 細胞の培養実験の結果、ポジティブコントロールの Group1 と比較して、ネガティブコントロールの Group2 では生存細胞数は有意に少なかった。0.2 %FBS -MEM 培地にカプセルの維持培地である無血清 HE-SFM を等量加えた培地 (Group3) では Group1 の約 3 分の 1 の生存細胞を確認した。コントロールカプセルの維持培地で刺激した群 Group4 と GDNF 分泌カプセルの維持培地で刺激した Group5 では Group2、Group3 と比較して有意に生存細胞数が多く確認された。

また 14 日間培養した場合、Group2 と Group3 では生存細胞はほとんど確認できず、GDNF 分泌カプセル維持培地を用いた Group5 で Group3 より有意に生存細胞が確認できた。

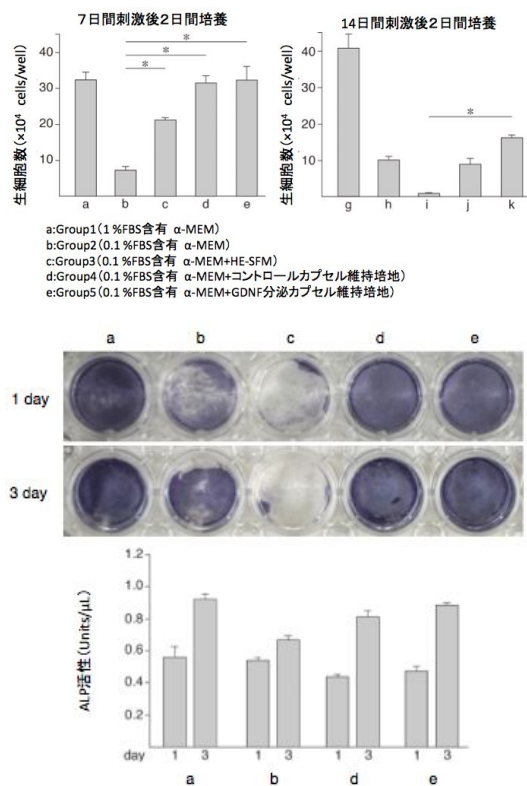


(4) (3)と同様に KN3 細胞を 7 日間刺激した後、各細胞の培地を 1 %FBS 含有 -MEM 培地に交換し 2 日間培養を行った結果、両カプセルの維持培地で刺激した Group4 と Group5 では Group1 に相当する生存細胞数を確認した。また、14 日間刺激した後 2 日間 1 %FBS 含有 -MEM 培地で培養した結果、Group5 において Group3 より有意に生存細胞数の増加は認められるが、Group1 と同程度の生存細胞は認められなかった。

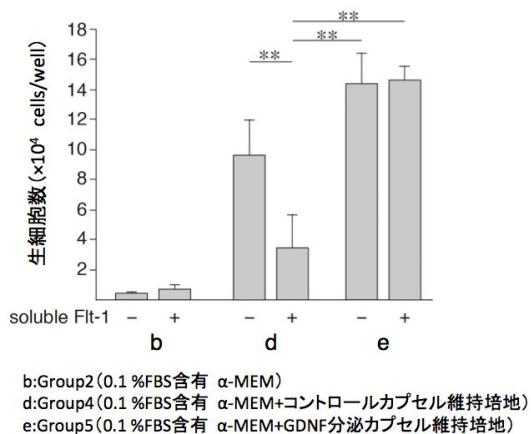
また、7 日間刺激後に 1 %FBS 含有 -MEM 培地に培地交換した細胞において ALP 染色し



た結果、Group4、Group5 で Group1 と同程度の陽性を示し、ALP 活性を有していた。



(5) カプセル内の ARPE19 細胞から分泌される VEGF の阻害 (soluble Flt-1) を行い、KN3 細胞の刺激を行い低栄養状態で培養した。その結果、VEGF を阻害したコントロールカプセルの維持培地で刺激した細胞では、阻害しない場合と比較して有意に生存細胞数の減少が認められた。一方、GDNF 分泌カプセルの維持培地では VEGF の阻害の有無に関わらず、生存細胞数に明らかな差は認められなかった。



以上の結果から、各カプセルから分泌される GDNF および VEGF は象牙芽細胞様細胞の生存能・増殖能や分化能を持続させること、および GDNF 単独でもそれらは維持されることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Saito N, Kitamura C ( 8名のうち1番目 )  
Effects of Polymer Encapsulated Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Secreting Cells on Odontoblast-like Cell Survival : Journal of Regenerative Medicine, 6(3), 2017, DOI : 10.4172/2325-9620.1000140 ( 査読あり )

〔学会発表〕(計 3件)

西藤法子、諸富孝彦、鷺尾絢子、Wahlberg Lars、Emerich Dwaine、北村知昭：細胞封入型デバイスから分泌される GDNF および VEGF が象牙芽細胞様細胞の生存に与える影響．第 146 回日本歯科保存学会学術大会、青森県 ( 2017 年 6 月 8 日、9 日 )

西藤法子、鷺尾絢子、諸富孝彦、花田可緒理、Wahlberg Lars、Emerich Dwaine、北村知昭：象牙芽細胞様細胞の生存における細胞封入型デバイスの影響．第 146 回日本歯科保存学会学術大会、栃木県 ( 2016 年 6 月 25 日、26 日 )

西藤法子、鷺尾絢子、諸富孝彦、花田可緒理、北村知昭：細胞封入多孔性カプセルの象牙芽細胞様細胞に対する影響．第 76 回九州歯科学会総会学術大会、北九州市 ( 2016 年 5 月 28 日、29 日 )

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西藤 法子 ( Saito Noriko )  
広島大学・病院 ( 歯 ) ・歯科診療医  
研究者番号 : 4 0 7 3 5 0 9 9