

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元 年 6 月 3 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20679

研究課題名(和文) 共培養下で分化誘導した歯周組織微小血管のin vivoにおける三次元的組織解析

研究課題名(英文) In vivo three-dimensional tissue analysis of periodontal tissue microvasculature induced to differentiate in coculture

研究代表者

清水 豊 (Shimizu, Yutaka)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・助教

研究者番号：10734717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ラット脱分化脂肪細胞(RDFATs)をラット歯肉由来血管内皮細胞(RGECs)と共培養し、in vivoにて細胞を歯周組織へ移植した際の血管再生について組織学的検討を行った。RGECsと共培養を行ったRDFATs(Cocultured RDFATs)の移植は、RDFATs単独の移植と比較し、多くの血管新生を認めた。また、Cocultured RDFATsは血管への分化も認めた。Cocultured RDFATsは、血管誘導能が高く、欠損部組織の血管新生を促進することから、歯周組織の創傷治癒や再生に有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低侵襲かつ大量に取得できる脱分化脂肪細胞(DFATs)は、歯肉由来血管内皮細胞(GECs)との共培養により、歯周組織由来血管内皮細胞や歯周組織由来血管周皮細胞の特性に近い細胞に分化したと考えられる。またDFATsの移植は、血管新生や血流の改善を見込めることから、同様に歯肉毛細血管の機能を改善する可能性が考えられる。DFATsによる歯周組織血管内皮細胞および血管周皮細胞の再生および機能改善が可能であることが明らかとなれば、歯周組織の恒常性維持や歯周組織再生療法における血液、供給、創傷治癒において重要な役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, rat dedifferentiated fat cells (RDFATs) were cocultured with rat gingival endothelial cells, and histological examination was performed to examine revascularization when cells were transplanted to periodontal tissue. Transplantation of cocultured RDFATs resulted in more neovascularization than did transplantation of RDFATs alone. Cocultured RDFATs also showed differentiation into blood vessels. Cocultured RDFATs are considered to be useful for wound healing and regeneration of periodontal tissue because they have high blood vessel-inducing ability and promote angiogenesis of defective tissue.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織 微小血管 再生 脱分化脂肪細胞

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、歯周組織のみならず血管を介して全身に影響を及ぼし、糖尿病や動脈硬化、虚血性心疾患などの発症、進行に関与することが考えられている。なかでも糖尿病は、歯周病に対する重要なリスクファクターと考えられている。歯周病は、網膜症、腎症、神経障害、細小血管障害、大血管障害に続く糖尿病の第 6 番目の合併症と提唱されており、これらの合併症はいずれも血管障害に起因するものである。糖尿病モデル動物実験では、歯肉の血流量は著しく減少し、また歯肉の血管内皮細胞の機能も減弱すると報告されている。歯周組織の血管内皮細胞の維持および再生は、歯周組織の恒常性維持や歯周組織の再生における血液供給、創傷治癒において重要な役割を果たすと考えられる。

歯科領域では、骨髄間葉系幹細胞 (BMSCs) を歯周組織再生に応用した研究が数多く行われている。しかし、BMSCs は、採取する骨髄液中に含まれる割合がごくわずかであることや幹細胞を他細胞群の混入なしに分離することが困難であることなどの問題点が指摘されている。

一方、近年、侵襲性の高い BMSCs の採取に対して、より簡便に採取が可能となる脂肪組織より成熟脂肪細胞を分離し、脱分化することで幹細胞と同等の分化能を持った脱分化脂肪細胞 (DFATs) を得る方法が報告されている。DFATs は、脂肪由来幹細胞 (ASCs) や BMSCs と近似した細胞表面抗原発現パターンを示し、脂肪細胞のみならず、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞、心筋細胞、血管内皮細胞などに分化転換することが知られており、再生療法の新たな細胞源として期待できる。

われわれの研究室では、DFATs の歯周組織再生への応用や糖尿病と歯周組織微小血管障害との関連について検討を行っている。DFATs の歯周組織再生の可能性について検討した研究では、ラットに実験的歯周組織欠損を作製後、アテロコラーゲンを足場としてラット由来の DFATs を移植し、歯周組織再生について検討を行った。その結果、DFATs の移植は、歯槽骨のみならず、セメント質様構造、歯根膜様組織の新生に成功し、歯周組織再生療法における新規の細胞源として有効である可能性が示唆された。また、糖尿病モデルラットにおける歯周組織障害について検討した研究では、歯周組織の微小血管構築を行い、血管性状や走行について検討を行った。その結果、糖尿病罹患下では、歯周組織に炎症反応が確認され、歯肉毛細血管の減少傾向と走行の歪曲が認められ、糖尿病により歯周組織微小血管障害を引き起こすことが示唆された。

これまでに DFATs を用いた血管再生研究では、DFATs は虚血性組織において血管新生を促進することが報告されている。われわれは、DFATs が歯肉由来血管内皮細胞との共培養により、血管周皮細胞マーカーの発現を亢進することを明らかにし、DFATs が歯周組織微小血管の再生における細胞源となりうる可能性を示した。

2. 研究の目的

本研究では、再生療法の新たな細胞源として期待される DFATs をより効果的に歯周組織の血管再生に応用するため、ラット脱分化脂肪細胞 (RDFATs) をラット歯肉由来血管内皮細胞 (RGECS) と共培養し、*in vivo* にて細胞を歯周組織へ移植した際の血管再生について組織学的検討を行った。

3. 研究の方法

本研究は、日本歯科大学新潟生命歯学部動物実験倫理審査委員会の承認が得られている (承認番号: 103)。

(1) 実験動物

実験動物は、脂肪組織採取には 10 週齢の雄性 Sprague Dawley (SD) 系 GFP ラット 4 匹を用い、歯肉組織採取には 8 週齢の雄性 SD 系ラット 4 匹を用いた。また、血管再生の検討には 6 週齢の雄性ヌードラット 18 匹を用いた。

(2) RDFATs の調製

RDFATs は、雄性 SD 系 GFP ラットの皮下脂肪組織より獲得した。SD 系 GFP ラットの皮下鼠径部より採取した脂肪組織は、細切し、3 mg/ml コラゲナーゼタイプ I および 4 mg/ml ディスパーゼを添加したリン酸緩衝液 (PBS) を用いて、37℃ で 1 時間低速震盪にて処理した。未消化組織を濾過した後、遠心分離を行い、成熟脂肪細胞を回収した。分離した成熟脂肪細胞は、15% ウシ胎児血清 (FBS)、抗菌薬 (100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml streptomycin)、抗真菌薬 (250 ng/ml amphotericin B) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12 培養液 (DMEM/F12) で満たされた 25 ml セルカルチャーフラスコ中に播種し、細胞付着面を上方にして 37℃、5%CO₂、95%Air の炭酸ガス培養器中にて天井培養を行った。培養 7 日後、培養液を交換し、細胞付着面が下方になるように反転し、通常培養を行った。

(3) RGECS の調製

RGECS は、雄性 SD 系ラットの歯肉組織より獲得した。歯肉組織は、上皮部を除いた歯肉結合組織を研究に用いた。歯肉組織は、細切し、組織片を静置させた。組織片から歯肉細胞のアウトグロースを確認した後、37℃、5%CO₂、95%Air の炭酸ガス培養器中にて初代培養を行った。歯肉細胞は、継代培養後回収し、抗 CD31 抗体 (Purified Mouse Anti-Rat CD31) を結合したマグネットビーズ (Dynabeads® Sheep anti-Mouse IgG) を加えた。その後、マグネットを使用し、RGECS を分離した。RGECS は、5%FBS 含有血管内皮細胞用培地 (EGM-2MV) にて培養した。

(4) 共培養

RDFATs は、0.4 μ m 孔径のポリカーボネート膜 (Polycarbonate Membrane Transwell® Inserts) を介し、RGECS との共培養を行った。共培養は、RDFATs を 6 ウェルディッシュに 5.0×10^4 cells /well で播種した後、0.4 μ m 孔径のポリカーボネート膜を付属したチャンバーをウェル内に配置し、 5.0×10^4 cells の RGECS を播種した。培養液は、5%FBS 含有 EGM-2MV を使用した。また、共培養の期間は 7 日とした。なお、0.4 μ m 孔径のポリカーボネート膜は、細胞の移動を抑制する一方、液性因子を含む培地の移動が可能である。

(5) 免疫細胞化学染色

各細胞は、 1.0×10^4 cells に調製し、8 ウェルカルチャースライドに播種し、3 日間培養した。その後、細胞は、4%パラホルムアルデヒド (PFA) により 10 分間固定し、PBS で洗浄後、1%ウシ血清アルブミン含有 PBS による非特異タンパク質のブロッキングを室温で 30 分間行った。CD31 の標識には、1 次抗体に mouse monoclonal anti-CD31 antibody を用い、2 次抗体に Alexa Fluor 488 標識 goat anti-mouse IgG を用いた。von Willebrand Factor (vWF) の標識には、1 次抗体に rabbit polyclonal anti-vWF antibody を用い、2 次抗体に Alexa Fluor 568 標識 goat anti-rabbit IgG を用いた。neuron-glia antigen 2 (NG2) の標識には、1 次抗体に mouse monoclonal anti-NG2 antibody を用い、2 次抗体に Alexa Fluor 488 標識 goat anti-mouse IgG を用いた。カルチャースライドは、PBS で洗浄し、4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) を用いて核染色を行い、水溶性マウンティングメディアウムにて封入した。細胞の観察は、蛍光顕微鏡システム (IX71-PAFM) を用いて行った。

(6) ラット歯槽骨欠損の作製

歯槽骨欠損の作製は、ヌードラットにペントバルビタールの腹腔内麻酔を行い、仰臥位で開口させ固定した。その後、上顎両側第二臼歯の口蓋側近心隅角部から上顎両側第一臼歯の近心側中央部まで歯肉溝切開を行い、さらに近心方向へ歯槽頂に沿って切開を行った。切開後、歯肉を歯科用エキスカベータにて全層弁で剥離し、生理食塩液注水下で歯科用ラウンドバー (ISO standard 010) を用いて、歯槽骨、歯根膜、セメント質を切削し歯槽骨欠損を作製した。

(7) 細胞の移植

移植に用いる細胞は、15%FBS 含有 DMEM/F12 で培養した RDFATs、RGECS と共培養を行った RDFATs (Cocultured RDFATs) とした。スキャホールドとしてアテロコラーゲンスポンジ (AteloCell® CSH-10) を用いた。各細胞は、 5.0×10^6 cells/scaffold で調製し、欠損作製部位に移植を行った。また、対照として生理食塩水を含浸させたアテロコラーゲンスポンジを用いた。

(8) 微小血管構築

ゼラチン (G-9382) に蒸留水を加えた 20%ゼラチン溶液 (pH10) と 50mg/ml rhodamine (rhodamine B isothiocyanate mixed isomers 283924) を融解したジメチルスルホキシド (D-5879) とを混合し、蛍光ゼラチンを作製した。ヌードラットは、移植後 7 日にペントバルビタールの腹腔内麻酔を行い、胸壁を開き左心室より rhodamine 標識ゼラチン溶液を灌流し安楽死させた。その後、ヌードラットを低温冷却し、注入したゼラチンをゲル化させた。歯周組織を含む上顎骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒド溶液で浸漬固定を行い、10% EDTA にて脱灰を行った。脱灰後、20%ショ糖に 5%グリセリンを加えた PBS を通してミクロトームに設置した凍結ステージ上にて凍結し、厚さ 200 μ m の切片を作製した。切片は、ポリアクリル樹脂 (0.01%QCU-3 含有 Rigolac-2004 + Rigolac-70F) にて包埋した。微小血管の観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-710) を用いて行い、画像の取得は、顕微鏡ソフトウェア (ZEISS ZEN) を用いて行った。

(9) 新生血管面積の定量化

取得した画像より、スキャホールド内に存在する血管構築を示す rhodamine 標識像を新生血管とした。スキャホールド内における単位面積 (200 μ m \times 200 μ m) あたりの新生血管面積を Image J (NIH) にて測定した。統計学的分析は、RDFATs 群と Cocultured RDFATs 群の比較を Student's *t*-test を用い有意水準 1%にて行った。

4. 研究成果

(1) 免疫細胞化学染色

RDFATs は、NG2 のみ発現を認めた (図 1A)。血管内皮細胞用培地で培養した RDFATs は、CD31、vWF の発現を認めたが、NG2 の発現はわずかに認める程度であった (図 1B)。RGECS と共培養を行った RDFATs は、CD31、vWF および NG2 の発現を認めた (図 1C)。よって RDFATs は、血管内皮細胞への分化能を有する一方、RGECS との共培養により、微小血管の成熟安定化に関与する血管周皮細胞への分化が促進されることが考えられる。

(2) 微小血管構築の観察

RDFATs および Cocultured RDFATs の移植群では、スキャホールド内に血管新生を認めた (図 2A,B)。また、RDFATs 移植群では GFP 陽性とする標識を観察できなかったが、Cocultured RDFATs 移植群では GFP 陽性とする標識を認め、一部新生血管との一致を認めた (図 2A,B)。一方、コントロール群では、スキャホールド内に血管新生を認めなかった (図 2C)。

(3) 新生血管面積の比較

Cocultured RDFATs 移植群の新生血管面積は、RDFATs 移植群と比較し、有意に大きかった (図 3, $P < 0.01$)。

以上より、Cocultured RDFATs は、血管誘導能が高く、欠損部組織の血管新生を促進することから、歯周組織の創傷治癒や再生に有用であると考えられる。

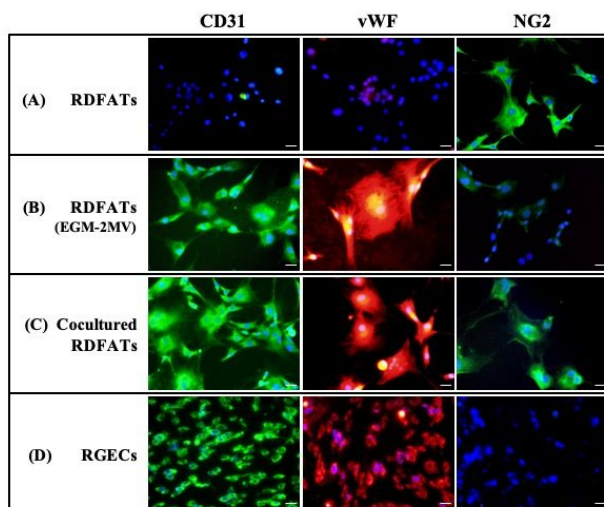


図1 免疫細胞化学染色 (bars=20 μ m)

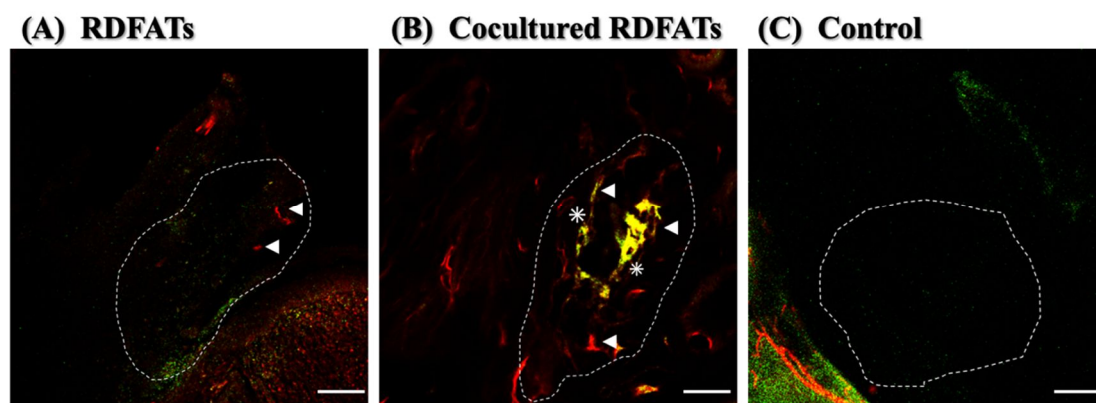


図2 微小血管構築像 (bars=100 μ m, 点線: スキャホールドの範囲, 矢印: 新生した血管, *: GFP 陽性標識)

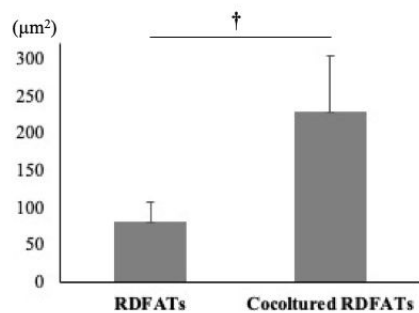


図3 新生血管面積の比較 (†: $P < 0.01$)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 清水 豊, 丸山昂介, 外山淳史, 中島 茂, 佐藤 聡. ラットを用いた脱分化脂肪細胞と歯肉由来血管内皮細胞の共培養による分化誘導の検討. 第 60 回春季日本歯周病学会学術大会. 2017 年 5 月 12 日. 福岡市

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。