

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11990

研究課題名(和文) 歯根膜細胞スフェロイドと血管新生因子の併用による歯周組織再生の試み

研究課題名(英文) Attempt of the periodontal tissue regeneration by the combination of periodontal ligament cell spheroid and vascularization factor

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：スフェロイド(細胞凝集塊)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。ヒト抜去歯から歯根膜細胞を分離し、ヒト臍帯静脈内皮細胞を組み合わせ共培養スフェロイドを作製した。

この共培養スフェロイドから多能性マーカー(あらゆる種類の細胞に分化できる細胞の能力)の遺伝子発現を確認した。また、骨関連遺伝子(骨を作るのに関連する遺伝子)の高い発現を示した。さらにラットの歯の周囲の歯周組織を欠損させ、この共培養スフェロイドを移植したところ、歯槽骨の再生が認められ、なおかつ歯根膜の再生も認められた。さらにセメント質の再生が認められ、複雑な歯周組織の再生がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は歯周病細菌によって引き起こされる慢性炎症疾患であり、歯と歯肉の付着の喪失や歯槽骨の吸収が生じる。日本での罹患率は成人の70%以上と報告されており、歯周病による歯周組織破壊が進行すると、歯は脱落し、咬合力の低下による生活の質の低下が問題となる。現在、この破壊された歯周組織を再生させる方法は発表されているが、完全に回復させる治療法は存在しない。その理由として、歯周組織の複雑さがあげられる。

近年、歯根膜細胞に幹細胞が存在し、多分化能を有し、複雑な構造をした歯周組織の各組織に分化する可能性が示唆されており、それが臨床応用できれば、歯周病によって失われた歯周組織の再生が期待される。

研究成果の概要(英文)：With the spheroid, a lot of cells cohered and became in a three-dimensional state. We isolated periodontal ligament cells from a human (hPDLMSCs) withdrawal tooth and we put the human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) together and made Co-cultured spheroids.

We confirmed onset of gene of the stemness markers from this co-cultured spheroids from hPDLMSCs and HUVECs. We showed the high expression of bone related genes. Periodontal tissue defects were prepared in the maxillary first molars of rats. The furcation defects were created by removing the alveolar bone, periodontal ligament, and root cementum. Co-cultured spheroids were transplanted into the defects. Treatment with co-cultured spheroids

enhanced alveolar bone, periodontal ligament and new cementum formation after transplantation.

研究分野：歯周病学分野

キーワード：歯周再生医学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 歯周組織再生治療の問題点

歯周病は歯周病細菌によって引き起こされる慢性炎症疾患であり、歯と歯肉の付着の喪失や歯槽骨の吸収が生じる。日本での罹患率は成人の70%以上と報告されており、歯周病による歯周組織破壊が進行すると、歯は脱落し、咬合力の低下によるQOLの低下が問題となる。現在、医工学の発展に伴い、様々な歯周組織再生療法が行われるようになってきた。しかし歯周組織の複雑さ(セメント質、歯根膜、歯槽骨、歯肉上皮、結合組織から構成される)が再生を困難にしている。近年、歯根膜細胞に幹細胞が存在し、多分化能を有し、複雑な構造をした歯周組織の各組織に分化する可能性が示唆され、その臨床応用が期待されている。

#### (2) スフェロイド(細胞凝集塊)

細胞を用いた組織再生に用いられる技術として、細胞シート技術、細胞ビーズ技術)などがあるが、我々はスフェロイド技術に着目した。スフェロイド(細胞凝集塊)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なわれ、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、幹細胞がその多様性(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。

#### (3) 歯根膜細胞スフェロイドとその問題点

現在、我々は多分化能を有する歯根膜細胞を用いて、スフェロイドを作製し、組織再生に取り組んでいる。歯根膜細胞スフェロイドを骨分化誘導条件にて培養すると、単層培養された歯根膜細胞に比較して、多くの石灰化結節が形成された。さらに、マウス頭蓋骨に骨欠損を作製し、歯根膜細胞スフェロイドを移植し、その再生能を検討した結果、単層培養歯根膜細胞より有意な新生骨量の増加を認めた。以上より、歯根膜細胞スフェロイドは歯周組織再生の新規のツールとなる可能性が示唆された。しかし、スフェロイドは「central necrosis」という問題を抱えている。スフェロイドを形成する細胞数を増加させ、スフェロイド粒径を大きくすると、スフェロイド中心部に栄養や酸素が供給されなくなり壊死をおこしてしまう。また、修復された組織の維持や創傷治癒・再生の過程において、血管の存在が大変重要であることが明らかになっている。本研究はこれらの問題を解決するために、既存の血管新生因子である VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) を歯根膜細胞スフェロイド移植と併用することにより、効果的な骨組織・歯周組織再生を目指すものである。

### 2. 研究の目的

歯周病により破壊された歯周組織を再生する死守組織再生療法が注目を浴びているが、既存の治療では、上皮組織・間葉系組織の混在した複雑な構造をしている歯周組織を完全に再生することはできない。スフェロイド(細胞凝集塊)は細胞が凝集し、3次元構造を有したもので、一般的な培養である単層培養細胞に比較して、細胞分化などの生理的機能が向上しており、再生医療への応用が期待されている。一方で、スフェロイド粒径が大きくなると内部に栄養・酸素が供給されないという問題を抱えている。本研究では、幹細胞を有し、多分化能を有する歯根膜細胞を用いてスフェロイドを形成し、血管新生因子として知られる VEGF とともに、骨組織欠損・歯周組織欠損に移植し、その組織再生能について検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯根膜細胞の単離および細胞培養

健康な患者にインフォームドコンセントを得た後、抜去した第3大臼歯の歯根膜(hPDL)から酵素法を用いて hPDLMSC を単離した。10% ウシ胎児血清(FBS)(Biosera, Nuaille, France)、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン(Wako)を添加した -MEM にて、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養し、4日ごとに培地交換を行った。5継代数以下の hPDLMSC を最初の実験で使用した。HUVEC は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入した。細胞は内皮細胞増殖培地 2 (EGM-2)(Lonza, Basel, Switzerland) にて、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養し、3日ごとに培地交換した。

#### (2) 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、堺らの方法に従い行った。共培養スフェロイドを作製するために、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、-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。

#### (3) 定量的リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1、1 : 2、2 : 1)、hPDLMSC スフェロイド、単層培養細胞 (hPDLMSC、HUVEC) から RNA を抽出した。得られた cDNA を、StepOnePlus™ Real-time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) と FAST SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いて定量的リアルタイム PCR を行った。サンプル間の cDNA 量を GAPDH 遺伝子に特異的なプライマーを用いて

標準化した。

#### (4) 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、 $\alpha$ -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 7、10、13、17、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。

#### (5) 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 Sprague-Dawley (SD) ラット (7 週齢、オス; CLEA Japan, Tokyo, Japan) に 3 種混合麻酔 (メトミジン塩酸塩 (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 1.0 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。

#### (6) 3次元マイクロ X 線 CT 解析

移植 4 週間あるいは 8 週間後には屠殺を行ない、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、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。

#### (7) 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、シャープピー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。

#### (8) 統計学的分析

データは平均値  $\pm$  標準偏差で表示し、全ての実験は少なくとも 3 回実施した。有意差検定は Student's *t*-test もしくは Bonferroni 法を行い、 $p < 0.05$  を統計学的に有意とした。

## 4. 研究成果

### (1) 共培養スフェロイド形成と幹細胞性の解析

以前の報告と同様に、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。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。一方、HUVEC スフェロイドは形成されたが外形が不整であり、ピペティングにより崩壊したため以降の研究に用いることはできなかった。共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1、1 : 2、2 : 1)、hPDLMSC スフェロイドの直径の平均値はそれぞれ、102.2  $\mu$ m、105.9  $\mu$ m、116.2  $\mu$ m、134.9  $\mu$ m であり、大きさに有意な差は見られなかった。

我々は次に、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解析

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。

共培養スフェロイドが、OIM 刺激による骨関連遺伝子発現に影響を与えるか否かを検証するために、リアルタイム RT-PCR 法により骨関連遺伝子の mRNA 発現を測定した。培養 7 日後において、共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 1 : 2) および hPDLMSC スフェロイドにおける *ALP* の mRNA 発現は、単層培養 hPDLMSC と比べて有意に増加した。*RUNX2* の mRNA 発現において、培養 14 日後の共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 2) は hPDLMSC スフェロイドと比べて有意な発現増加を認めた。培養 10 日後の共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 2, 2 : 1) および hPDLMSC スフェロイドにおける *COL1* の mRNA 発現は、単層培養 hPDLMSC に比較して、増加していた。*BSP* 遺伝子発現は、培養 14 日目の共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 2) において hPDLMSC スフェロイドと比べて発現が増加した。これらのデータから、共培養スフェロイドは、骨関連遺伝子の発現上昇を介して骨分化を高め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解析

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解析

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ピー線維が認められた。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、シャーピー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。

共培養スフェロイドは hPDLMSC スフェロイドと比べて新生骨形成には有意差を認めないが、hPDLMSC スフェロイドと比べて多くのセメント質を形成したメカニズムを解明するために、共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1, 1 : 2, 2 : 1)、hPDLMSC スフェロイド、単層培養群 (hPDLMSC, HUVEC) における *VEGF* の発現をリアルタイム RT-PCR 法で分析した。*VEGF* 遺伝子

の発現は、共培養スフェロイド (hPDLMSC : HUVEC = 1 : 1、2 : 1) において hPDLMSC スフェロイドと比べて有意に高かった。以上のデータより、共培養スフェロイド移植によるセメント質新生には VEGF が関与している可能性が示唆された。

#### 引用文献

( 1 ) Murakami S. Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol 2000*. **56**, 188-208 (2011).

( 2 ) Van Dyke T. E. *et al.* Proresolving nanomedicines activate bone regeneration in periodontitis. *J Dent Res*. **94**, 148-156 (2015).

( 3 ) Kitamura M. *et al.* Randomized Placebo-Controlled and Controlled Non-Inferiority Phase III Trials Comparing Trafermin, a Recombinant Human Fibroblast Growth Factor 2, and Enamel Matrix Derivative in Periodontal Regeneration in Intra-bony Defects. *J Bone Miner Res*. **31**, 806-814 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kotaro Sano, Michihiko Usui, Yuki Moritani, Kohji Nakazawa, Tomoya Hanatani, Hisataka Kondo, Mitsushiro Nakatomi, Satoru Onizuka, Takanori Iwata, Tsuyoshi Sato, Akifumi Togari, Wataru Ariyoshi, Tatsuji Nishihara, Keisuke Nakashima	4. 巻 14
2. 論文標題 歯根膜幹細胞-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	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 59-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.12.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐野 孝太郎, 臼井 通彦, 花谷 智哉, 森谷 友貴, 西原 達次, 中島 啓介
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第60回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	臼井 通彦  (Usui Michihiko)  (10453630)	九州歯科大学・歯学部・准教授   (27102)	