

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11998

研究課題名(和文)細胞骨格再編機構を応用した新規骨再生医療技術の創生

研究課題名(英文) Development of the new regenerative medicine technique by applying the mechanism of the cytoskeleton reorganization.

研究代表者

西田 英作(Nishida, Eisaku)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：10512519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：中高年齢者に罹患率の高い歯周病が原因で欠損した歯周組織に対する再生療法は種々ある。歯周病のカテゴリーで細胞移植治療のニーズはあるが、現在その方法はほとんど確立されていない。本研究において着目した細胞移植治療に使用できる歯槽骨由来骨芽細胞の骨マーカー分子候補としてのNEBLが骨分化カスケードにおいてどのような機能を持っているかは、マウス、ラットにおいてはさらなる検討が必要であるといえる。また、老齢ラット歯槽骨由来骨芽細胞の培養方法の確立は、中高年齢者を想定した歯周病をはじめとする、骨欠損を伴う疾患におけるモデル動物として有用であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究で使用したヒト歯槽骨由来骨芽細胞(human alveolar bone osteoblastic cell; HAOBs)は倫理問題やサンプリングの限界もあり実験群を十分に確保することができない問題があったが、マウス歯槽骨由来骨芽細胞(mouse alveolar bone osteoblastic cell; MAOB)を使用したことで、歯周病をはじめとする、骨欠損を伴う疾患におけるモデル動物として有用である。

研究成果の概要(英文)：There are various regenerative therapies for periodontal disease, which is highly prevalent in middle-aged and elderly people. There is a need for cell transplantation therapy in the periodontal disease category, but the method is currently poorly established. The function of NEBL as a bone marker molecular candidate for alveolar bone-derived osteoblasts that can be used for cell transplantation therapy in this study in the bone differentiation cascade needs to be further investigated in mice and rats. . In addition, it was clarified that the establishment of a method for culturing osteoblasts derived from alveolar bone of old rat alveolar bone is useful as a model animal in diseases associated with bone defects such as periodontal disease assuming middle-aged and elderly people.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：歯槽骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病の進行によって歯の消失が生じると、口腔機能障害を引き起こし、全身の健康、QOL にも影響を及ぼす。歯周病は 60 歳以上の成人の 90%以上が罹患する慢性炎症性疾患であり、WHO によると世界人口の約 20%以上が罹患すると報告されている。この歯周病が原因で欠損した歯周組織に対する再生療法として骨移植術は、骨欠損部に骨移植材を充填する再生療法であり、用いられる移植材のうち、ゴールドスタンダードとして用いられるのは自家骨だが、採取部位も外科手術による侵襲があることや、広汎型重度慢性歯周炎および侵襲性歯周炎のような広範囲な骨欠損を伴う症例では、供給量に限界があることが知られている。近年では、ヒトの骨髄から採取した間葉系幹細胞移植と骨成分を模倣する生体材料とを組み合わせた骨組織工学が開発されてきている。しかし、現行の骨組織工学による再生医療の有用性は示されているものの、間葉系幹細胞は 中高年齢層から採取困難である、骨形成能力には個人差がある、細胞分裂を繰り返すことにより骨形成能力が喪失していく、前述のような症例の広範囲の欠損症例に応用できないなどの問題が指摘されている。これらの問題を解決するため、中高年齢層からも入手可能で、また高い骨再生能力を有する細胞製剤の開発が必要となっている。

申請者らはこれまでに、50 歳以上の中高年齢者の歯槽骨より採取したヒト歯槽骨由来骨芽細胞 (human alveolar bone osteoblastic cell ; HAOBs) を採取、開発することに成功した (Aino et al Expert Opin Biol Ther. 2014)。HAOB は歯科治療 (抜歯時やフラップ手術時) 中に、顎骨中の歯槽骨から比較的入手しやすく、中高年齢層から採取、分離・培養でき、間葉系幹細胞と比較して高い骨再生能力をもつ骨芽細胞であり、間葉系幹細胞における複数の問題点をクリアした、骨再生に非常に有用な細胞である。よって、HAOB を用いた細胞移植治療の技術開発は、今後の歯周組織再生療法を大きく変える可能性がある。この HAOB は、細胞分裂回数の増加に伴い骨分化能力が低下する。この原因を解析したところ、細胞分裂回数増加にともな NEBL 遺伝子の発現低下することを見いだした。さらにこの NEBL を HAOB においてノックダウンすると、骨マーカー遺伝子群の発現を劇的に抑制することから、HAOB の分化能力は NEBL に依存している可能性が示唆され、重要な分子であることが考えられる。

2. 研究の目的

Neublin family である NEBL は、心筋に特異的に発現し、内在性の NEBL の減少は心筋細胞において細いフィラメントの長さを減少させる。Neublin ノックアウトマウスの骨格筋で類似したような表現型が観察されることから NEBL はアクチンフィラメントを安定させる働きがあると考えられている。また、ヒト NEBL の遺伝子多型は拡張型心筋症 (DCM) に関係している。そこで申請者は心筋に特異的に発現し、筋原線維のアッセンブリーに参与する NEBL が骨分化カスケードにおいてどのような機能を持っているか、詳細な解析を行うことを目的とし、細胞移植治療を応用した再生療法のサプリメントになりうるか検討する為に本研究課題を申請した。

3. 研究の方法

(1) マウス歯槽骨由来骨芽細胞 (mouse alveolar bone osteoblastic cell ; MAOB) の採取、培養
MAOBC57BL/6J マウス 7 週齢をと殺後、下顎骨を採取し、切歯のアピカルバット (幹細胞が多く含まれていると言われている根尖部分) や臼歯部歯周組織を丁寧に除去し、ハンクス緩衝液中で洗浄後、PBS を用いて 3mg/ml の濃度に調整した細菌性のコラゲナーゼを用いて連続消化を行った。20 分間の連続消化を 5 回繰り返し 5 分画の細胞を採取した。1 分画と 2 分画目は廃棄した。その後 37℃、5%CO₂ 存在下にて MF スタート培地を用いて 35mm のディッシュで培養を行った。80%コンフルエントになるまで 0.25%EDTA を用いて細胞を継代し MAOB とした。MAOB は MF 初代培養スターティング培地 (東洋紡株式会社、大阪、日本) と MF 培地 (東洋紡株式会社、大阪、日本) を用いて 2 日おきに交換し培養を続けた。コントロールとしてマウス大腿骨由来骨芽細胞 (mouse tibia osteoblastic cell ; MT) を上述したコラゲナーゼ連続消化法で採取、MF 初代培養スターティング培地 (東洋紡株式会社、大阪、日本) と MF 培地 (東洋紡株式会社、大阪、日本) で培養した。また、骨芽細胞のコントロールとしてマウス歯肉由来線維芽細胞 (mouse gingival fibroblast cell ; MGF) は、マウス歯肉組織を骨膜が含まれないように慎重に採取し、細片後、組織片培養方法にて MF 初代培養スターティング培地 (東洋紡株式会社、大阪、日本) と MF 培地 (東洋紡株式会社、大阪、日本) で培養した。

(2) MAOB における NEBL の発現確認と骨分化カスケード関連因子の発現解析

コンフルエントに達した細胞の total RNA は NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) にて total RNA を抽出した。First-strand cDNA は RT2 First Strand Kit (Qiagen) を推奨方法に従い、合成した。Total RNA の純度および濃度評価は Fluorospectrometer (NanoDrop® ND-1000, NanoDrop Technologies Inc, デラウェア州、アメリカ) を用いて A230/A260、A260/280 比を測定して評価した。cDNA は通法にしたがい 1ug の total RNA を、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO、大阪、日本) を用いて総量を 20 µl に合成した。PCR は、StepOne Real-Time PCR System (Applied

Biosystems、カリフォルニア州、米国)を使用し、Taqman Universal Master Mix II (Applied Biosystems、カリフォルニア州、米国)および、TaqMan Gene Expression Assays Runx2 (Runt Related Transcription Factor 2): Mm00501584_m1、Osterix (Osx): Mm04209856_m1、Bone Sialoprotein(Bsp): Mm00492555_m1、Osteocalcin(Ocn): Mm03413826_mH、NEBL: NM_028757)を用い、94 で1分間、60 で30秒間、72 で30秒間の25サイクルで反応させた。データ解析はCt値の差から相対定量を行う Ct法を用いた。内在性コントロールとして18S rRNA 特異的プライマーを用い、Runx2、Osx、Bsp、Ocn、NEBLの遺伝子発現を次のように計算し解析した。fold change = 2^{-Ct} , where $Ct = (Ct_{target} - Ct_{18S\ rRNA})$ treated group - $(Ct_{target} - Ct_{18S\ rRNA})$ control group (Ct, cycle threshold).

4. 研究成果

(1)MAOBは間葉系幹細胞増殖培地で培養できる

MAOBを通常通り10%のウシ胎仔血清(ライフテクノロジーズジャパン)添加 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM、ライフテクノロジーズジャパン株式会社、東京)で培養すると、2継代もしくは3継代ほどで細胞増殖しなくなり、細胞死を迎えた。MF培地は東洋紡社から発売されている間葉系幹細胞専用培地であり、顎骨由来骨芽細胞がMF培地で培養できたのは、間葉系幹細胞から、まさに骨芽細胞に分化したフェノタイプを示していると考えられる。また、MTに関しては10%FBS添加DMEM然り、MF培地でも培養することすらできなかった。マウス1匹からコラゲナーゼ消化法に必要な骨片が採取できなかった可能性もある。いずれにしても、MAOBはマウス歯槽骨からコラゲナーゼ法にて分離でき、MF培地で培養できることがわかった。しかしながら、歯槽骨由来骨芽細胞と、同一個体の大腿骨からの骨芽細胞はマウスからでは採取、培養すること難しいことがわかり、以下に示すように実験動物をマウスからラットに移行するきっかけとなった。

(2)MOABにおけるNEBL遺伝子と骨関連遺伝子の発現について

7週齢マウスから採取した第3、4、5分画のMAOB、以下MAOBF3、MAOBF4、MAOBF5それぞれ今フルエントに達するまでプラスチックプレートにて培養し、それぞれRNAを抽出後、Runx2、Osx、Bsp、NEBL遺伝子発現を調べたところ、どの分画にもOsxの発現上昇が見られた。Huangらの研究では、骨芽細胞の分化培養時にRunx2とOsxが初期段階の骨芽細胞で高度に発現したことを報告しており、これと対照的に、BspとOcnは骨分化の後期の段階で発現することが報告されている。このことより、MAOBはプラスチックプレート上で培養することにより、骨分化は緩やかであることが明らかになった。また、MTを同様な条件で培養、遺伝子発現を比較すべきであると考えられる。また、残念なことにNEBL遺伝子の発現は検出することができなかった。MAOBの多種分画、多様の継代数で同様の実験を行わなければならない。ただし、上述したようにマウスでは1回で採取できるMAOB、MT、MGFサンプルの量が少ないことと、今後は同種移植実験にも応用したいがため、ラットに実験動物を変更する運びとなった。

(3)MAOBにおけるNEBLタンパクの発現について

NEBLは、マウスオルソログ、ラットオルソログが明らかになっており、qPCRのためのプライマー、siRNAは購入できる。添加実験にリコンビナントタンパクが手に入らなかったため、タンパクレベルでの解析を行うことができなかった。

(4)老齢ラット歯槽骨由来骨芽細胞(mouse alveolar bone osteoblastic cell; MAOB)の採取、培養の成功

7週齢SDラット、70週齢老齢SDラットそれぞれ1匹から、ラット歯槽骨由来骨芽細胞(rat alveolar bone osteoblastic cell; RAOB)、ラット大腿骨由来骨芽細胞(rat tibia osteoblastic cell; RT)、ラット歯肉由来線維芽細胞(rat gingival fibroblast cell; RGF)をマウスと同じ方法で分離培養することに成功した。ラット由来細胞はまた10%FBS添加DMEMで培養することが可能であり、コストダウンも行えた。また7週齢RAOBと70週齢RAOBを分化誘導培地で培養、コンフルエントに達し、Rat Osteogenesis PCR array (PARN-026ZA, Qiagen)にて、骨関連遺伝子の発現を比較したところ、7週齢ラット歯槽骨から採取したRAOBと、70週齢ラット歯槽骨から採取したRAOBの差はほとんどなかった。以上より、ラット歯槽骨の骨分化関連遺伝子には、年齢を問わないという、ヒト歯槽骨由来骨芽細胞の表現系と一致する可能性が示唆された。

(5)まとめ

歯槽骨由来骨芽細胞の骨マーカー分子としてのNEBL発現は、培養条件等、さらなる検討が必要であるといえる。また、老齢ラット歯槽骨由来骨芽細胞は、中高年齢者を想定した歯周病をはじめとする、骨欠損を伴う疾患におけるモデル動物に適しているといえる。

<参考文献>

Aino M, Nishida E, Fujieda Y, Orimoto A, Mitani A, Noguchi T, Makino H, Murakami S, Umezawa A, Yoneda T et al. Isolation and characterization of the human immature

osteoblast culture system from the alveolar bones of aged donors for bone regeneration therapy. *Expert opinion on biological therapy* 14(12):1731-1744, 2014

Huang X, Chen X, Chen H, Xu D, Lin C, Peng B: Rho/Rho-associated protein kinase signaling pathway-mediated downregulation of runt-related transcription factor 2 expression promotes the differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Exp Ther Med*, 15(5):4457-4464, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Higuchi Naoya, Hayashi Jun-ichiro, Fujita Masanori, Iwamura Yuki, Sasaki Yasuyuki, Goto Ryoma, Ohno Tasuku, Nishida Eisaku, Yamamoto Genta, Kikuchi Takeshi, Mitani Akio, Fukuda Mitsuo	4. 巻 22
2. 論文標題 Photodynamic Inactivation of an Endodontic Bacteria Using Diode Laser and Indocyanine Green-Loaded Nanosphere	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8384 ~ 8384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22168384	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 -

1. 著者名 Goto Ryoma, Nishida Eisaku, Kobayashi Shuichiro, Aino Makoto, Ohno Tasuku, Iwamura Yuki, Kikuchi Takeshi, Hayashi Jun-ichiro, Yamamoto Genta, Asakura Masaki, Mitani Akio	4. 巻 22
2. 論文標題 Gelatin Methacryloyl-Riboflavin (GelMA-RF) Hydrogels for Bone Regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1635-1635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22041635	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 -

1. 著者名 Ohno Tasuku, Yamamoto Genta, Hayashi Jun-ichiro, Nishida Eisaku, Goto Hisashi, Sasaki Yasuyuki, Kikuchi Takeshi, Fukuda Mitsuo, Hasegawa Yoshiaki, Mogi Makio, Mitani Akio	4. 巻 12
2. 論文標題 Angiopietin-like protein 2 regulates Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human gingival epithelial cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0184825	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 -

1. 著者名 Orimoto Ai, Kurokawa Misaki, Handa Keisuke, Ishikawa Masaki, Nishida Eisaku, Aino Makoto, Mitani Akio, Ogawa Miho, Tsuji Takashi, Saito Masahiro	4. 巻 79
2. 論文標題 F-spondin negatively regulates dental follicle differentiation through the inhibition of TGF-activity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 7 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2017.02.019	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 -

1. 著者名 Sasaki Yasuyuki, Hayashi Jun-ichiro, Fujimura Takeki, Iwamura Yuki, Yamamoto Genta, Nishida Eisaku, Ohno Tasuku, Okada Kosuke, Yamamoto Hiromitsu, Kikuchi Takeshi, Mitani Akio, Fukuda Mitsuo	4. 巻 18
2. 論文標題 New Irradiation Method with Indocyanine Green-Loaded Nanospheres for Inactivating Periodontal Pathogens	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 154 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18010154	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 後藤亮真, 西田英作, 小林周一郎, 相野 誠, 福田光男, 林 潤一郎, 山本弦太, 岩村侑樹, 大野 祐, 佐々木康行, 三谷章雄
2. 発表標題 GelMAを用いた再生治療における足場材料としての有用性について
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤亮真, 西田英作, 林 潤一郎, 山本弦太, 岩村侑樹, 大野 祐, 佐々木康行, 菊池 毅, 福田光男, 三谷章雄
2. 発表標題 再生治療におけるGelMA-RFの有用性について
3. 学会等名 愛知学院大学歯学会第95回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菱川敏光, 山本弦太, 林潤一郎, 山田章三, 相野 誠, 藤村岳樹, 西田英作, 神谷洋介, 稲垣幸司, 福田光男, 菊池 毅, 三谷章雄
2. 発表標題 Webアプリを利用した臨床実習学生意識調査結果 -愛知学院大学歯学部歯周病学ケースについて-
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤亮真, 西田英作, 小林周一郎, 相野 誠, 黒須康成, 三谷章雄
2. 発表標題 再生治療におけるGeIMA-RFの足場材料としての新たな可能性について
3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大野 祐, 山本弦太, 林潤一郎, 西田英作, 後藤久嗣, 佐々木康行, 菊池 毅, 福田光男, 長谷川義明, 三谷章雄
2. 発表標題 歯肉上皮細胞においてアンジオポエチン様タンパク2はPorphyromonas gingivalis菌由来LPSによる炎症反応に関与する
3. 学会等名 第13回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木康行, 林潤一郎, 藤村岳樹, 岩村侑樹, 山本弦太, 西田英作, 大野 祐, 岡田康佑, 真岡淳之, 菊池 毅, 三谷章雄, 福田光男
2. 発表標題 歯周ポケット外からのレーザー照射を想定したaPDTの基礎的検討
3. 学会等名 第13回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤亮真, 西田英作, 小林周一郎, 相野 誠, 三谷章雄
2. 発表標題 GeIMA-RFの足場材料としての可能性について
3. 学会等名 第16回日本再生歯科医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大野祐, 山本弦太, 林潤一郎, 西田英作, 後藤久嗣, 佐々木康行, 菊池毅, 長谷川義明, 茂木眞希雄, 福田光男, 三谷章雄
2. 発表標題 アンジオポエチン様タンパク2は歯肉上皮細胞において炎症反応を遷延化させる
3. 学会等名 日本歯周病学会60周年記念京都大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木康行, 林潤一郎, 岩村侑樹, 藤村岳樹, 岡田康佑, 大野祐, 後藤亮真, 相野誠, 西田英作, 山本弦太, 菊池毅, 三谷章雄, 福田光男
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisバイオフィルムに対するインドシアニングリーン封入ナノ粒子と半導体レーザー照射によるaPDTの殺菌効果について
3. 学会等名 第147回日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木康行, 林潤一郎, 岩村侑樹, 岡田康佑, 藤村岳樹, 西田英作, 相野誠, 菊池毅, 山本浩充, 三谷章雄, 福田光男
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisバイオフィルムに対してインドシアニンググリーン封入ナノ粒子への半導体レーザー照射がもたらすaPDT効果について
3. 学会等名 第29回日本レーザー歯学会学術大会
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	相野 誠 (Aino Makoto) (20572811)	愛知学院大学・歯学部・講師 (33902)	

6. 研究組織（つづき）

	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	神谷 洋介 (Kamiya Yosuke) (70572808)	愛知学院大学・歯学部・講師 (33902)	
研究分担者	後藤 久嗣 (Goto Hisashi) (10783037)	愛知学院大学・歯学部・助教 (33902)	
研究分担者	小林 周一郎 (Kobayashi Shuichiro) (80750190)	愛知学院大学・歯学部・非常勤講師 (33902)	
研究分担者	齋藤 正寛 (Saito Masahiro) (40215562)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関