

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17346

研究課題名（和文）同種の歯根膜細胞移植治療に向けた優れた再生能を有する細胞予測

研究課題名（英文）Prediction of cells indicating superior regenerative potential for allogeneic transplantation of periodontal ligament cells

研究代表者

妻沼 有香 (Tsumanuma, Yuka)

東京医科歯科大学・大学院歯学総合研究科・プロジェクト助教

研究者番号：70726265

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：同種移植を臨床応用するには、より再生能の高い細胞を移植に用いることで、より良い治療効果が期待される。その際どのような細胞を選別すべきかを移植前に決定する必要がある。本研究では、ヒト歯根膜由来間葉系幹細胞のプライマリーカルチャーを行い、細胞の性質について比較検討を行った。結果、ドナーにより *in vitro* における性質の違いが明らかとなった。また細胞の蛍光染色により細胞形態のイメージングを行い、蛍光顕微鏡を用いた細胞質面積の計測を行ったところ、骨分化誘導の有無での違いが認められた。これらの結果から同種移植に使用するドナーをあらかじめ選別し、細胞の再生能を予測しうると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同種の細胞を用いた臨床研究が主流となりつつあり中で、どのような細胞を選択し、移植に用いればより再生能が高い結果が得られるかは不明な点が多い。本研究ではあらかじめ移植する前の歯根膜由来MSCの再生能を予測可能かどうかを明らかにすることに着目した。*in vitro* で計測可能な特性の検討を行い、その特性の組み合わせにより歯根膜由来MSC固有の再生能予測基準を決定することで、再生能が高い細胞と低い細胞に分別する事が可能となる。この結果、再生能が高い細胞をあらかじめ予測選択し、移植に用いることで、同種細胞移植治療の実現および普及に貢献可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using cells with high quality for the allogeneic transplantation might provide the superior tissue regeneration. It is need to decide what kind of cells should be selected before transplantation. In this study, we performed the primary culture of human periodontal ligament derived mesenchymal stromal cells (PDL-MSCs) and compared the cell property. The result is that the PDL-MSCs show the different property *in vitro* by donor. Cell morphology imaging of PDL-MSCs by cell florescence staining and analysis of the area of cytoplasm using florescence microscope showed the difference upon osteogenic induction. These results demonstrate that the cells using for the allogeneic transplantation can be selected and predict the regenerative potential of cells.

研究分野：歯周組織再生

キーワード：歯根膜由来間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSC) は組織再生療法の源として期待されている細胞種である。MSC を用いた多くの臨床研究が進行中であり、同種の細胞を用いた臨床研究が過半数を超えている。その中でも米国 Osiris Therapeutics 社が開発した骨髄 MSC 治療製剤 (Plochymal<sup>®</sup>) は、移植片対宿主病 (GVHD) の治療に有効であり、カナダやニュージーランドにおいてすでに使用が認可されている。我々の研究室ではこれまで、組織由来幹細胞の一種である歯根膜由来の MSC を用いた歯周組織再生研究を行ってきた。イヌモデルにおいて自己の歯根膜細胞シートを歯周組織欠損部に移植した際、歯周組織が顕著に再生されることを報告してきた。またイヌモデルにおいて、同種の歯根膜細胞シート移植実験を行い、コロニー形成能やアルカリフォスファターゼ活性が高い均一の細胞を移植した同種の歯根膜細胞シートは、自己の歯根膜細胞シート以上の再生能を示した。今後、同種移植を臨床応用する際には、より再生能の高い細胞を移植に用いることで、より良い治療効果が期待される。その際、どのような細胞を選別すべきかを決定する必要があると考えられる。これまで MSC の定義は画一化されていない部分もあり、必ずしも *in vitro* での性質が *in vivo* で反映されるとは限らないと言われている。また幹細胞マーカーにより分別したとしても、再生能に直結するとは限らないのが現状である。近年、骨髄由来のヒト MSC においては、*in vitro* での細胞回収技術や、細胞サイズ・コロニー形成能、細胞形態等の性質の違いを用いることで、より再生能の優れた性質を有する細胞の選択や、それを用いた基準が報告されつつある。しかしながら、歯根膜由来 MSC においては、若年者の細胞の方が老年者の細胞より再生能が高いことは報告されているが、その他の性質の違いによる再生能については不明な点が多い。そこで、本研究では同種のヒト歯根膜細胞移植治療を想定し、移植前にヒト歯根膜由来 MSC の再生能を予測可能かどうかを明らかにすることとした。

## 2. 研究の目的

上記の研究背景に基づき、歯根膜由来 MSC では未だ明らかとなっていない、移植前に再生能の高い細胞を分別予測することを目的として、以下のことを明らかとする。

- (1) ヒト歯根膜由来 MSC の再生能の違いを、CFA、分化能、増殖能等の性質の違いを用いて明らかにする。
- (2) ヒト歯根膜由来 MSC の再生能の違いを、細胞形態のイメージング技術を用いることで、明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) *in vitro* における細胞集団でのヒト歯根膜由来 MSC の再生能の予測を行う。

若年者 (ヘルシードナー) の抜歯適応歯の抜歯をし、歯根膜細胞を採取し、プライマリーカルチャーを行う。

これらの細胞の再生能に関与すると考えられる以下のアッセイを行う。

- ・コロニーフォーミングアッセイ (CFA)
- ・分化能 (骨分化能、脂肪分化能)
- ・アルカリフォスファターゼ活性 (ALP)
- ・細胞増殖能

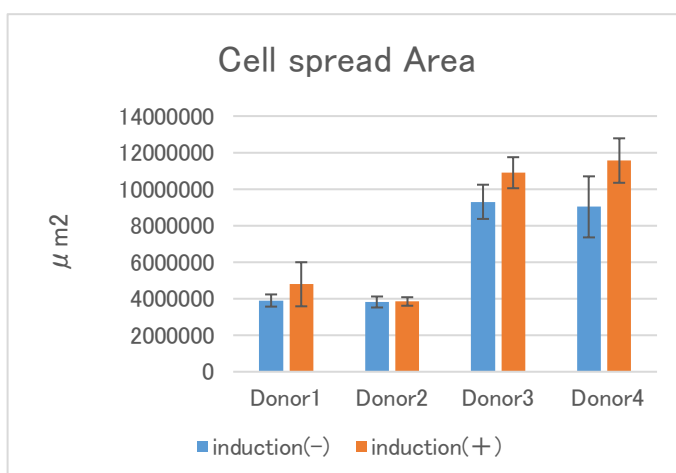
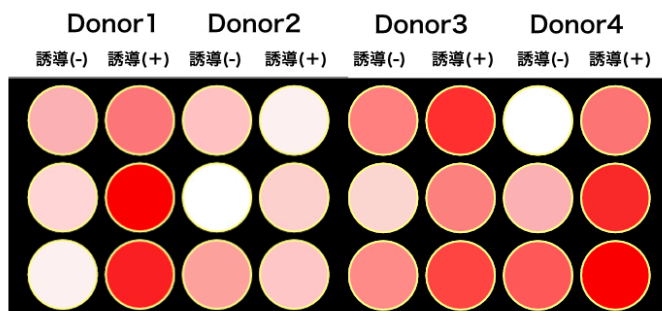
(2)細胞形態のイメージング技術を用いてヒト歯根膜由来 MSC の再生能の予測を行う。

(1)と同様のヒト歯根膜由来 MSC を用いて、短期間(4日)の培養での骨分化誘導、非誘導後に蛍光染色にて細胞形態の確認を行い、蛍光顕微鏡を用いて細胞質の面積を計測することで、その違いを明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1)ヘルシードナー由来のヒト歯根膜由来 MSC のプライマリーカルチャーを行い、細胞の性質について比較検討を行った。異なるドナー由来の MSC によりコロニーフォーミングアッセイ (CFA)、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、分化能 (骨分化誘導・脂肪分化誘導)、増殖能の違いが明らかとなった。過去のヒトの骨髄由来 MSC においては、増殖能の高い細胞ほど骨再生能が高いという報告があるが、本研究においては、増殖能が高い細胞が必ずしもコロニー形成能やアルカリフォスファターゼ活性、分化能が高くない結果となっており、細胞種ごとに違いがあることが明らかとなった。

(2)細胞の蛍光染色により細胞形態のイメージングを行い、蛍光顕微鏡を用いた細胞質面積の計測を行ったところ、骨分化誘導の有無により、細胞質面積の積算値に違いが認められた(下図)。これらの結果から同種移植に使用するドナーをあらかじめ選別し、分化能を予測しようと考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Washio K, Tsutsumi Y, Tsumanuma Y, Yano K, Srithanyarat Supreda S, Takagi R, Ichinose S, Meinzer W, Yamato M, Okano T, Hanawa T, Ishikawa I	4. 巻 24
2. 論文標題 In Vivo Periodontium Formation Around Titanium Implants Using Periodontal Ligament Cell Sheet.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 1273-1282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.tea.2017.0405	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwata T, Yamato M, Washio K, Yoshida T, Tsumanuma Y, Yamada A, Onizuka S, Izumi Y, Ando T, Okano T, Ishikawa I.	4. 巻 9
2. 論文標題 Periodontal regeneration with autologous periodontal ligament-derived cells sheets - A safety and efficacy study in ten patients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 38-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2018.07.002	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 Kaibuchi Nobuyuki, Iwata Takanori, Onizuka Satoru, Yano Kosei, Tsumanuma Yuka, Yamato Masayuki, Okano Teruo, Ando Tomohiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Allogeneic multipotent mesenchymal stromal cell sheet transplantation promotes healthy healing of wounds caused by zoledronate and dexamethasone in canine mandibular bones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 77～83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2018.10.008	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Iwata T, Onizuka S, Park S, Tsumanuma Y, Nakai K, Izumi Y, Ando T
2. 発表標題 The establishment of safety and efficacy evaluation for allogeneic periodontal ligament derived multipotent mesenchymal stromal cell sheet with next-generation sequencer
3. 学会等名 TERMIS World Congress 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田隆紀, 鬼塚理, 妻沼有香, 朴聖俊, 中井謙太, 安藤智博
2. 発表標題 同種歯根膜由来間葉系幹細胞シートによる歯周組織の再建
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田 隆紀, 鬼塚 理, 朴 聖俊, 妻沼 有香, 和泉 雄一, 中井 謙太, 安藤 智博
2. 発表標題 同種歯根膜細胞シートの安全性・有効性評価指標の確立と歯周組織の再建
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018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