

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09570

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞-血管内皮細胞相互作用を応用した新規歯周組織再生治療開発

研究課題名(英文) Novel strategy for periodontal regeneration using interactions between mesenchymal stem cells and endothelial cells

研究代表者

岩崎 剣吾 (IWASAKI, Kengo)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：40401351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は慢性炎症によって歯を支える組織が減少し最終的に抜歯へ至る疾患である。この失われた組織を再生する事は困難であり、近年では細胞などを用いた再生医療が期待されている。これまで細胞による組織再生は、目的組織を作る可能性のある種類の細胞を移植して行われてきたが、本研究では間葉系幹細胞と血管内皮細胞を組み合わせることで、それぞれの細胞の機能に影響があるのか否かについて検討した。その結果、間葉系幹細胞と血管内皮細胞は分泌する因子および直接的な細胞-細胞の接触によってそれぞれの細胞の分化を促進させていることが明らかとなった。血管内皮細胞との組み合わせにより歯周組織再生が增强する可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は抜歯理由の第一位となっており、失われた歯周組織を再生することを主眼においた歯周組織再生治療は、歯の寿命延長を介して国民の口腔機能維持に貢献する重要な治療法であると考えられる。本研究の結果は、これまで行われてきた間葉系幹細胞に加えて血管内皮細胞を組み合わせることで歯周組織再生の結果が增强する可能性を示しており、あらたな歯周組織再生についての方策を提案するものであり社会的にも大きな意義があると考えられる。さらに、間葉系幹細胞の機能の一つである血管新生のメカニズムについて説明する結果が得られている点においても学術的な重要性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease is characterized by the chronic inflammation of periodontal tissues and the diseased tooth are extracted due to the loss of tooth-supporting tissues. Increasing attentions have been paid to "cell-based regenerative treatment" to build up the lost periodontal tissues during the disease progression. So far, one specific type of cells with potential to form the desired tissues has been transplanted for the regenerative purpose such as mesenchymal stem cells. We utilized the combination of mesenchymal stem cells and endothelial cells and examined whether the combination of two types of cells change the characteristics of each cell. Our data demonstrated that through both the secreted factors and direct cell-cell contact, this combination culture induced the differentiation of each cell. New findings of this study suggested that the combination of mesenchymal stem cells and endothelial cells may enhance the regeneration of periodontal tissues.

研究分野：再生歯学

キーワード：歯周病 再生 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯の周囲に付着・増殖した歯周病菌を原因として、歯を支える組織に慢性炎症が生じる疾患である。この歯周病が進行すると、歯を支える歯周組織が大きく破壊されることにより、罹患歯は抜歯へ至る。現在、歯周病は日本の成人が歯を失う最大の抜歯理由となっており、大きな歯科領域の治療対象である。また、歯周病が糖尿病、心臓血管疾患、低体重児出産、骨粗鬆症など、全身疾患と関係することが示され、口腔のみならず、全身の健康維持のためにも歯周病治療の重要性が強調されるようになった。このような背景から、歯周病の治療、特に病気の進行によって失われてしまった歯を支える歯周組織を再生させる治療法に対するニーズは大きいと考えられる。

歯周組織を再生させる治療については、これまでも多くの治療法が研究・臨床応用されて来た。近年では、組織工学についての技術進歩や幹細胞に関する研究の進展によって、人間の体の外で培養した細胞を用いて、さまざまな機能不全に陥った組織あるいは臓器の治療を行う可能性が提唱されるようになってきている。歯周病の治療についても、患者さんから採取した細胞を想定した組織再生法が研究され、研究レベルでは組織の再生が誘導される事例が数多く報告されている。歯を支える歯周組織再生について、間葉系幹細胞(MSC)と呼ばれる組織幹細胞を用いた研究が多く行われ、歯周組織が再生されることが示されている。しかしながら、MSCを用いた歯周組織再生研究においても組織再生量については未だ改善の余地が残されており、より効果的かつ強力な組織再生法の開発が必要と考えられる。

これまでの細胞移植による組織再生の研究は、主にターゲットとなる組織を形成する能力を持つ単一の細胞種を培養し移植することがほとんどであった。しかし、近年、細胞-細胞間のシグナル、情報伝達、相互作用についての知見が蓄積され、複数の細胞種を組み合わせることで移植することによって組織再生の結果が強化される報告がなされるようになった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞移植による歯周組織再生を強化する方法を見出すこととし、具体的には血管と組織再生の関係に着目して、間葉系幹細胞移植と血管内皮細胞を組み合わせることによって歯周組織再生に関与する細胞の性質に変化が生じるのかについて検討することを目的とした。

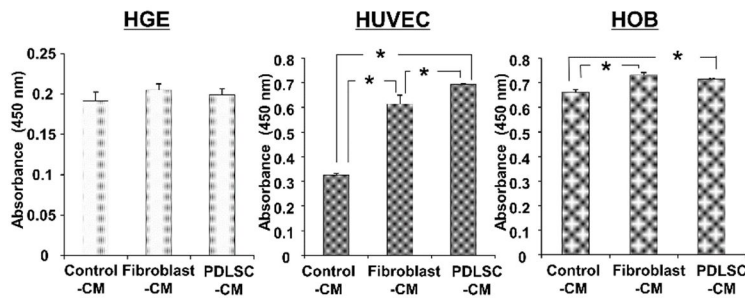
3. 研究の方法

間葉系幹細胞と血管内皮細胞の相互作用を検討するために培養細胞を用い、共培養を行う実験系を用いた。歯根膜由来の間葉系幹細胞(歯根膜幹細胞)の培養では、健全抜去歯から歯根膜組織を採取後、collagenase-dispaseを用いた酵素処理を施し、コロニーを形成しながら増殖するプラスチック培養皿接着性の細胞を用いた。培養された歯根膜幹細胞は骨芽細胞、脂肪細胞への分化能の確認を行い、実験に用いた。また、細胞表面の幹細胞マーカーの解析には flow cytometry 解析を用いた。各細胞における変化をモニターするために、遺伝子発現を定量的なリアルタイム PCR 法を用いて検討した。また、血管内皮細胞の血管形成に関する機能解析には、マトリゲル上における network-formation の実験系を用い、顕微鏡観察での mesh-like 構造の計測、数値化によって比較検討を行った。また、細胞から産生させる液性因子の影響を検討する実験では、培養細胞の培養液を回収し限外濾過を用いてタンパク分画の濃縮を行った。細胞のアポトーシスの検討では、細胞を 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) にて染色後の核の濃縮を蛍光顕微鏡下にて観察し同定した。細胞増殖活性の検討には、細胞の Ki67 による免疫染色を行い、Ki67 陽性細胞を増殖中の細胞として定量した。血管新生因子の定量には市販の ELISA kit を用いた。

4. 研究成果

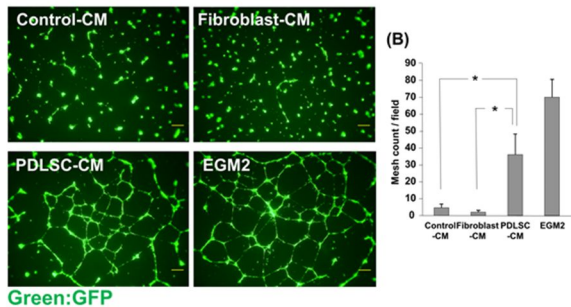
倫理委員会での実験プロトコルの承認後、矯正治療患者よりいただいた健全抜去歯から歯根膜組織を回収し、collagenase/dispase を用いた酵素処理法によって歯根膜幹細胞を培養した。Flow cytometry 解析および in vitro での骨芽細胞、脂肪細胞への分化誘導を用いて得られた歯根膜幹細胞が間葉系幹細胞様の表現型を持つことが確認された。

培養した口腔上皮細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞へ歯根膜幹細胞から得られた細胞培養上清を作用させたところ、歯根膜幹細胞由来培養上清は血管内皮細胞の viability を最も高く維持した。3種類の細胞のうち血管内皮細胞が歯根膜幹細胞培養上清への反応性が高い事が示唆される結果であった。また、血管内皮細胞を歯根膜幹細胞培養上清の存在下で培養すると、DAPI 染色で核濃縮の染色像を示すアポトーシス様細胞数が対照群に比べ有意に減少することが観察された。さらに増殖期の細胞に特異的に発現する Ki67 抗原の免疫染色を行ったところ、歯根膜幹細胞培養上清中で培養した血管内皮細胞は対照群と比較して Ki67 陽性細胞数が増加することが明らかとなった。

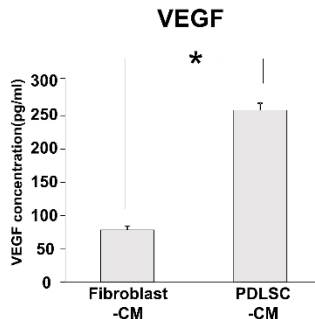


次に、血管内皮細胞の血管新生機能に対する影響を検討するため、血管内皮細胞をマトリゲル上で培養し network-formation の系を用いて検証した。その結果、歯根膜幹細胞培養上清が血管内皮細胞の capillary 様構造形成を増強する結果が得られた。

(A)

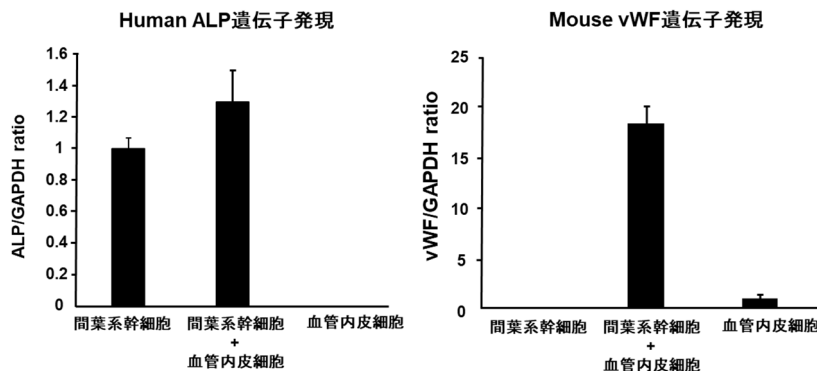


線維芽細胞から得られた培養上清は歯根膜幹細胞培養上清と比較して血管内皮細胞の増殖、血管新生機能において作用が小さい結果が得られたため、培養上清中の血管新生因子である VEGF のタンパク量を両培養上清で比較した所、歯根膜幹細胞培養上清は線維芽細胞培養上清と比較して多くの VEGF を含むことが明らかとなった。



これらの結果は、歯根膜幹細胞培養は血管内皮細胞へ液性因子を介して作用し、血管内皮細胞の生存、増殖を促し、血管新生に関与する機能を増強することが示された。さらにこの作用は VEGF を介している可能性が考えられる。

一方、間葉系幹細胞と血管内皮細胞の直接的な相互作用について共培養の系を用いて検証した。その結果、間葉系幹細胞と血管内皮細胞を直接共培養することによって、間葉系幹細胞上へ血管内皮細胞が直接接着進展し培養可能であることが明らかとなった。



マウス由来の血管内皮細胞株およびヒト由来間葉系間葉系幹細胞を用いて、共培養時の間葉系幹細胞および血管内皮細胞における遺伝子発現の変化について検討したところ、間葉系幹細胞において血管内皮細胞との接着によって骨芽細胞の初期の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)の遺伝子発現が亢進することが明らかとなった。一方、血管内皮細胞において

は von Willebrand factor (vWF)の発現が増強し、血管内皮細胞としての機能の向上を示唆する結果が得られた。これらの結果は間葉系幹細胞が血管内皮細胞との直接的な接触により、骨芽細胞様に分化すること、血管内皮細胞が間葉系幹細胞との接触により血管内皮細胞としての分化が進行する可能性を示すものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 3件）

1. 著者名 Iwasaki Kengo, Akazawa Keiko, Nagata Mizuki, Komaki Motohiro, Peng Yihao, Umeda Makoto, Watabe Tetsuro, Morita Ikuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Angiogenic Effects of Secreted Factors from Periodontal Ligament Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dentistry Journal	6. 最初と最後の頁 9～9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/dj9010009	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 岩崎 剣吾	4. 巻 4
2. 論文標題 幹細胞による歯周組織再生の試み	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 156～159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Iwasaki Kengo, Komaki Motohiro, Akazawa Keiko, Nagata Mizuki, Yokoyama Naoki, Watabe Tetsuro, Morita Ikuo	4. 巻 234
2. 論文標題 Spontaneous differentiation of periodontal ligament stem cells into myofibroblast during ex vivo expansion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 20377～20391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.28639	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 Iwasaki Kengo, Washio Kaoru, Meinzer Walter, Tsumanuma Yuka, Yano Kosei, Ishikawa Isao	4. 巻 5
2. 論文標題 Application of cell-sheet engineering for new formation of cementum around dental implants	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e01991～e01991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2019.e01991	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 Iwasaki Kengo, Akazawa Keiko, Nagata Mizuki, Komaki Motohiro, Honda Izumi, Morioka Chikako, Yokoyama Naoki, Ayame Hirohito, Yamaki Kazumasa, Tanaka Yuichi, Kimura Tsuyoshi, Kishida Akio, Watabe Tetsuro, Morita Ikuo	4. 巻 20
2. 論文標題 The Fate of Transplanted Periodontal Ligament Stem Cells in Surgically Created Periodontal Defects in Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 192 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20010192	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 Iwasaki Kengo, Nagata Mizuki, Akazawa Keiko, Watabe Tetsuro, Morita Ikuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Changes in characteristics of periodontal ligament stem cells in spheroid culture	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	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) 10.1111/jre.12637	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Iwasaki K, Watabe T, Morita I.
2. 発表標題 The effect of paracrine factors from periodontal ligament stem cells on endothelial cells.
3. 学会等名 13th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iwasaki K
2. 発表標題 Stem cell transplantation using cell transfer technology for periodontal regeneration and its regenerative mechanism.
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎 剣吾
2. 発表標題 Spheroid培養条件下での歯根膜幹細胞における変化
3. 学会等名 第8回臨床ゲノム医療学会
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

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