

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17091

研究課題名（和文）細胞シート工学にエピジェネティクスを応用した口腔外歯周組織再生ユニットの開発

研究課題名（英文）Development of extraoral periodontal tissue regeneration unit applying epigenetics to cell sheet engineering

研究代表者

吉田 光希（YOSHIDA, Koki）

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：30453260

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）：本研究では、抜歯に至った歯に口腔外で新たに歯周組織を作製することを試みた。まず、エピジェネティクス薬剤で歯根膜由来マラッセ上皮細胞から幹細胞様前駆細胞を作製し、歯髄細胞、臍帯静脈内皮細胞と1週間共培養した。その結果、歯根膜関連遺伝子および間葉系幹細胞関連遺伝子のmRNA発現上昇傾向を認め、メチル化レベルの有意な低下を認めた。以上から、エピジェネティクス薬剤で歯根膜に類似した細胞集団へ誘導可能なことが示唆された。これらの細胞集団から細胞シートを作製し、抜去歯根面へ生着させた。人工骨補填材ブロックへの結合を試みたが、良好な結果は得られなかった。今後の更なる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、歯周病で喪失される歯根膜を、歯髄細胞から作製する可能性を示した基礎的データであり、将来的に、治療困難な重度歯周炎の歯に対して、歯髄細胞を応用して新たな歯根膜を作製することで治療が可能になるかもしれないという、臨床に向けた学術的意義を有するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, the preparation of new periodontal tissue on the extracted tooth outside the oral cavity was attempted.

First, the progenitor stem-like cells were prepared from the epithelial cell rests of Malassez derived from the periodontal ligament by stimulation with epigenetic agents, and co-cultured with dental pulp cells and umbilical vein endothelial cells for 1 week. The tendency of increasing mRNA expression of periodontal ligament-related genes and mesenchymal stem cell-related genes was observed, and the significant decreased levels of methylation were observed. These results indicated that epigenetic agents might induce the cell population similar to the periodontal ligament. The cell sheet was prepared from these cell populations and engrafted on the extracted root surface. Attempts were made to bond to the artificial bone filling material block, but good results were not obtained. Further investigations are needed in the future.

研究分野：口腔再生医学

キーワード：エピジェネティクス 歯周組織再生 口腔外歯周組織再生ユニット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、医療の分野では臓器再生を目指した研究が進められている。歯科では大きく分けて、歯牙そのものの再生と歯根膜の再生を目指した研究が行われてきている。歯牙そのものの再生に関しては、3次元器官原基法を用いた歯の機能的再生が報告されて以降(文献)、歯胚を用いた歯の再生研究が進められている(文献)。

また、歯根膜の再生に関しては、GTR法やエムドゲインなどの歯周組織再生療法に加え、近年、歯根膜細胞シートを用いた歯根膜再生への研究が進められている(文献)。失われた歯根膜を再生させる歯周組織再生療法は、中等度歯周炎までの歯周組織が残存している状態でなければ困難であり、抜歯せざるを得ない程に進行した重度歯周炎症例において口腔内で歯根膜を再生させることは難しい。また、抜歯に至った場合には、現状では欠損補綴による治療法を選択せざるを得ない。近年、歯髄に存在する歯髄幹細胞は induced pluripotent stem (iPS) 細胞などの様に再生医療への応用可能性が示唆されている。歯髄は歯根膜と違い、抜歯に限らず抜髄処置によって採取することも可能であるため、再生医療への応用としては歯根膜より容易である。歯髄には、歯根膜の主体でもある線維芽細胞をはじめとして、血管内皮細胞や神経線維、骨芽細胞、象牙芽細胞など様々な細胞が混在することから、歯根膜に必要な脈管構造の再現構築に適していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、抜去歯を用いて口腔外における歯周組織の再生ユニットの作製を行うことを目的とした。

これまで、細胞シートを抜去歯根に巻きつけ、マウスに移植することで歯根面に歯根膜が作製されたという報告はある(文献)。しかしながら、実際に歯周病患者に移植するケースを想定すると、歯周病によって周囲の歯槽骨は破壊されている為、歯根膜の増殖に必要な間葉系組織が不十分な環境となっている。

そこで、口腔外において、抜去歯と人工骨、その間に歯髄細胞を用いて新たに形成する人工的な歯根膜細胞という歯周組織のユニットを作製し、これらを結合させることで、歯科用インプラントのように、患者自身の抜去歯を歯周組織ごと再び口腔内に埋入することが可能となる、新たな実験系を考案した。歯髄には歯根膜に必須の上皮成分であるマラッセ上皮細胞が存在しないことから、本研究では、歯髄細胞を主体として人工的な歯根膜様細胞を作製するために、歯根膜由来のマラッセ上皮細胞にエピジェネティクス技術を応用して上皮間葉相互作用を促進し、さらに脈管構造を増強するためのヒト臍帯静脈内皮細胞も応用することとした。

3. 研究の方法

(1)実験1. エピジェネティクス薬剤によるマラッセ上皮由来幹細胞様前駆細胞の作製

ブタ下顎臼歯から単離培養した歯根膜のマラッセ上皮細胞のエナメルマトリックス分泌能や幹細胞特性を増強するために、エピジェネティクス薬剤の1 μ M 5-Azacytidine (5Aza) と2 mM バルプロ酸で1週間処理することで、幹細胞に近い幹細胞様前駆細胞へ誘導した。

(2)実験2. 歯髄細胞と臍帯静脈内皮細胞、マラッセ上皮由来幹細胞様前駆細胞の上皮間葉細胞集団の作製による歯根膜様細胞への誘導

歯髄には歯根膜に必須の上皮成分であるマラッセ上皮細胞が存在しないことから、人工的な歯根膜様細胞を作製するために、ブタ下顎臼歯から培養した歯髄細胞と、実験1で作製したエナメルマトリックス分泌能や幹細胞特性を有した幹細胞様前駆細胞、さらに脈管構造を増強するためのヒト臍帯静脈内皮細胞を細胞比20:10:1で1週間共培養を行い(共培養群)、歯根膜様細胞への誘導を試みた。培養は、比較のために以下の各培養条件下で行った; 歯髄細胞単独培養群; 歯根膜細胞単独培養群; 共培養群。

(3)実験3. 歯根膜様細胞における mRNA 発現解析

歯根膜様細胞への誘導における mRNA 発現解析を、定量的 RT-PCR (quantitative real-time RT-PCR, qRT-PCR) 法により行なった。実験2の歯根膜様細胞への誘導において、1週間培養した各細胞群から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。得られた cDNA は、歯根膜関連遺伝子である *Msx1*, *Msx2*, *Ncam1*, *Periostin*, *S100a4*, 間葉系幹細胞関連陽性遺伝子である *Cd29*, *Cd90*, *Cd105*, および内在性 Control である *Gapdh* のプライマーを作製後、各 mRNA 発現レベルを定量的に検討した。

(4)実験4. 歯根膜様細胞における DNA メチル化解析

歯根膜様細胞への誘導において、5Aza のエピジェネティクス作用である DNA メチル化への影響を確認するために、定量的メチル化特異的 PCR (quantitative methylation-specific PCR, qMSP) 法による DNA メチル化解析を行った。qMSP 法を行うために、UCSC Genome Browser にて

CpG islands が存在した歯根膜関連遺伝子の *Msx1*, および間葉系幹細胞関連陽性遺伝子の *Cd29* について、Meth Primer による MSP プライマーを設計後、Bisulfite 処理された DNA を用いて qMSP 法による DNA メチル化解析を行った。

(5) 実験 5. 積層人工的歯根膜様細胞シートの作製

上皮-間葉相互作用を増強させるために、積層された人工的歯根膜様細胞シートを作製した。実験 2 で共培養した人工的歯根膜様細胞を細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材 (UpCell, セルシード) によって培養した。コンフルエントになったところで、吸水性膜 (CellShifter, セルシード) により細胞をシートとして回収した。回収された細胞シートを別に培養していた人工的歯根膜様細胞上に移し、『共培養細胞群の細胞シート』 + 『別の共培養細胞群の細胞シート』の共培養という培養形式にした。これを繰り返し、最終的に 3 層の『共培養細胞群の細胞シート』を作製した。

(6) 実験 6. 抜去歯根面への積層人工的歯根膜様細胞シートの貼り付け

抜去歯の採取は、北海道医療大学歯学倫理審査委員会の承認を得て行った。抜去歯の除菌処置として、抗菌薬溶液中で 2 分間の超音波洗浄後 20%EDTA により 10 分間処理し、-MEM 培地中に保管した。その後、積層人工的歯根膜様細胞シートを歯根面に貼り付け、12 時間以上培養を行った。

(7) 実験 7. 抜去歯と骨補填材ブロックとの共培養による歯根膜増生能・結合能の検討

細胞シート付着歯根をトリミングされた骨補填材ブロック (ネオボーン, Aimedic MMT) に埋入し、歯根膜様細胞の増殖・結合程度を観察した。

4. 研究成果

(1) 結果 1. 歯根膜様細胞における mRNA 発現解析 (図 1)

歯根膜様細胞における mRNA 発現解析の結果、共培養群では歯髓細胞単独培養群に比べ歯根膜関連遺伝子の *Msx1*, *Msx2*, *Ncam1*, *Periostin*, *S100a4*, 間葉系幹細胞関連陽性遺伝子の *Cd29*, *Cd90*, *Cd105* において mRNA の発現上昇傾向を認めた ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis 検定)。

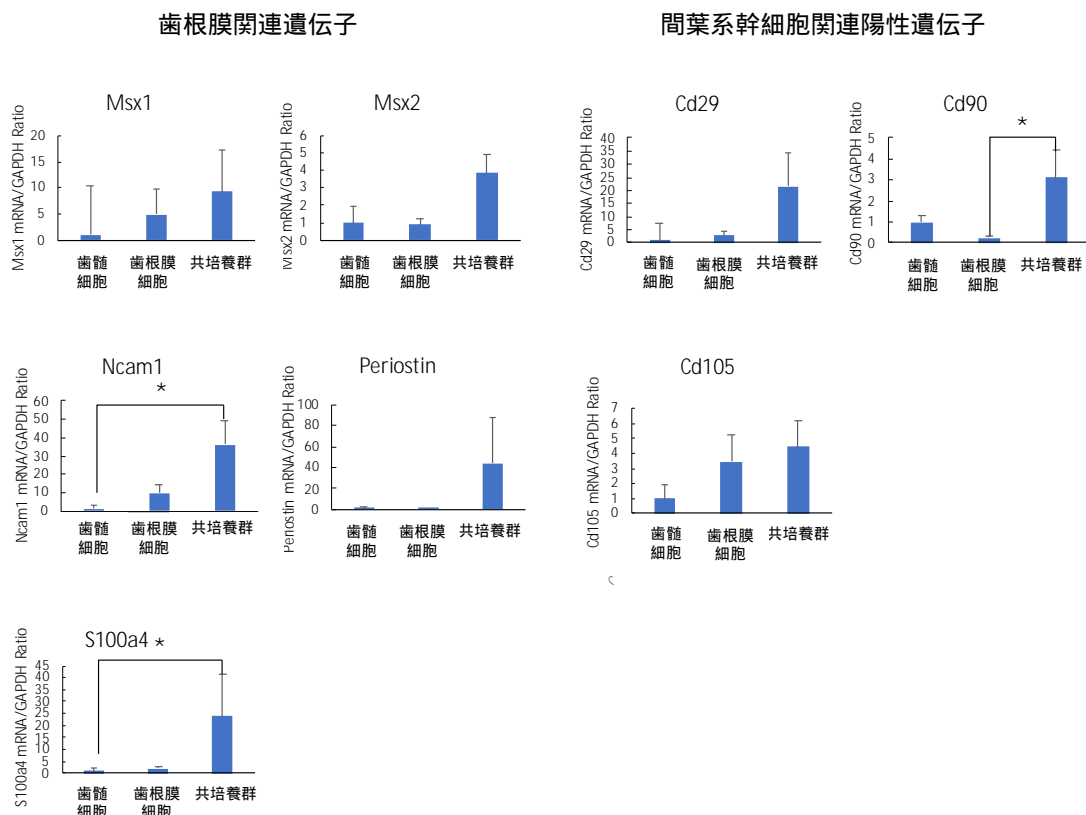


図 1. 歯根膜様細胞における mRNA 発現解析

(2)結果2. 歯根膜様細胞におけるDNAメチル化解析(図2)

qMSP法によるDNAメチル化解析の結果、歯根膜関連遺伝子の*Msx1*および間葉系幹細胞関連陽性遺伝子の*Cd29*は、共培養群では歯髄細胞単独培養群に比べメチル化レベルの有意な低下を認めた(** $p < 0.01$, カイ二乗検定)。このことから、共培養群における*Msx1*および*Cd29*の遺伝子発現変化には、5AzaによるDNAメチル化変化の効果が確認された。

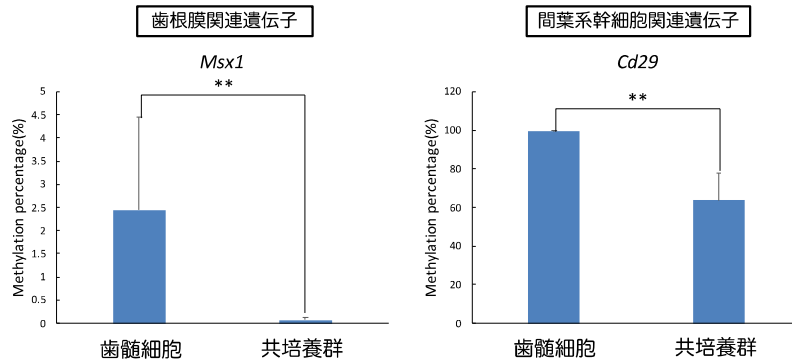


図2. 歯根膜様細胞におけるDNAメチル化解析

(3)結果3. 抜去歯と骨補填材ブロックとの共培養による歯根膜増生能・結合能の検討

細胞シート付着歯根と骨補填材ブロック(ネオボーン, Aimedica MMT)の結合程度を観察した結果、明らかな結合を確認することができなかった。

以上のことから、本研究では、エピジェネティクス技術を応用することで歯髄細胞を主体とした人工的な歯根膜様細胞を作製することが可能であることが示唆された。しかしながら、人工的歯根膜様細胞シート付着歯根と骨補填材ブロックとを結合させることはできなかった。このことから、実験条件などについて、今後の更なる改良・検討が必要であると考えられた。

<引用文献>

Ikeda et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. Proc Natl Acad Sci USA. 106: 13475-13480, 2009.

Yamamoto et al. Functional tooth restoration utilising split germs through re-regionalisation of the tooth-forming field. Sci Rep. 5: 18393, 2015.

Yoshida et al. Current status and future development of cell transplantation therapy for periodontal tissue regeneration. Int J Dent. 2012: 307024, 2012.

Panduwawala et al. In vivo periodontal tissue regeneration by periodontal ligament stem cells and endothelial cells in three-dimensional cell sheet constructs. J Periodontal Res. 52:408-418, 2017.

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 Koki Yoshida, Osamu Uehara, Yoshihito Kurashige, Durga Paudel, Aya Onishi, Puja Neopane, Daichi Hiraki, Tetsuro Morikawa, Fumiya Harada, Rie Takai, Jun Sato, Masato Saitoh, Yoshihiro Abiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Direct reprogramming of epithelial cell rests of malassez into mesenchymal-like cells by epigenetic agents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79426-4	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 0件）

1. 発表者名 大西 綾、吉田 光希、高橋 周平、Ariuntsetseg Khurelchuluun、Durga Paudel、平木 大地、森川 哲郎、原田 文也、植原 治、佐藤 惇、永易 裕樹、安彦 善裕
2. 発表標題 エピジェネティクスを応用した歯髄細胞の歯根膜様細胞への誘導
3. 学会等名 第33回日本口腔診断学会・第30回日本口腔内科学会・第13回日本口腔検査学会合同学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田光希、大西 綾、平木大地、Neopane Puja、Durga Paudel、Ariuntsetseg Khurelchuluun、森川哲郎、佐藤 惇、永易裕樹、安彦善裕
2. 発表標題 エピジェネティクスを応用したマラッセ上皮-間葉共培養システムの歯根膜特異的遺伝子の解析
3. 学会等名 第12回日本口腔検査学会・第30回日本臨床口腔病理学会・第29回日本口腔内科学会・第32回日本口腔診断学会 合同学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田光希、大西 綾、Paudel D、Neopane P、平木大地、Adhikari BR、森川哲郎、植原 治、佐藤 惇、西村学子、安彦善裕
2. 発表標題 エピジェネティクス修飾を応用したマラッセ上皮細胞の脱分化と骨分化誘導能の検討
3. 学会等名 第29回日本臨床口腔病理学会総会・第11回日本口腔検査学会総会共催学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野ホームページ
<http://www3.hoku-iryu-u.ac.jp/courses/2/013/index.html>

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
---------	---------