

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791613  
 研究課題名 (和文) 骨髄間葉系幹細胞の分化誘導シグナルとなる担体の研究  
 研究課題名 (英文) Development of carrier with induction signals to differentiate mesenchymal stem cells

研究代表者  
 林田 浩一 (Koichi Hayashida)  
 広島大学・病院・助教  
 研究者番号：10437585

## 研究成果の概要：

骨髄間葉系幹細胞を移植することによる歯周組織再生療法が有用であることは既に明らかとなっているが、硬組織の再生に関しては改善すべき点が残っていた。本研究の目的は、**骨髄間葉系幹細胞を用いて歯周組織再生を行う際に、より効率良く再生を誘導できる、シグナルの機能を有する担体を探索することである。**

平成 19 年度は、培養間葉系幹細胞 (以下 MSC) を用いて、**B-TCP が MSC の形質に及ぼす影響について、細胞接着と骨形成に関与する遺伝子発現およびタンパク発現について検討した。** MSC を培養する際、ディッシュ内に **B-TCP** を入れて培養を行ったところ、6 日間で細胞接着に関与する  $\alpha V \cdot \beta 3$  integrin の mRNA 発現の有意な上昇が確認できた。さらに骨形成に関与する細胞外基質である osteopontin の mRNA およびタンパク発現の促進も確認した。以上のことから、**B-TCP は、MSC の細胞接着および骨分化に影響している可能性を示唆できた。**

平成 20 年度は、実験動物を用いて、歯周組織再生により有用であるかを検討した。実験動物は雌性ビーグル犬とし、下顎臼歯の根分岐部にセメント質・歯周靭帯を含めた 3 級の歯槽骨欠損を作成した。その後、アルジネート印象財を填入し、炎症を惹起させる。その後、間葉系幹細胞・アテロコラーゲン複合体に加えて **B-TCP** を移植した群と複合体のみの移植および **B-TCP** のみ填入した群を作成し、経時的に比較検討した。その結果、複合体と **B-TCP** を併用した群では、歯槽骨骨頂が根分岐部まで到達するのは、複合体のみの群と比較して有意に早かった。これは、**B-TCP** の併用が、骨の形成に有利であったと推察できる。また、**B-TCP** のみ填入した群では、ほとんどの個体でアンキローシスが認められた。以上のことから、**B-TCP** のみでの使用では、アンキローシスを誘発しやすくなり、やはり、**MSC との併用が歯周組織再生により有用であることを明らかにできたと言える。**

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	540,000	3,740,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周外科学

## 1. 研究開始当初の背景

歯周組織は、歯根象牙質を覆うセメント質・歯を支える歯槽骨・セメント質と歯槽骨を連結する歯周靭帯・感染防御の最前線の役割を果たす歯肉の4つから構成されている。歯周炎は、この歯周組織が不可逆的に破壊され、歯牙の動揺をきたし、最終的には歯牙喪失の原因となる疾患である。歯周炎による炎症所見は消失しても、喪失した歯周組織が自然に再生することはない。よって、歯牙の喪失を防ぎ、さらには健全な状態に戻すには、歯周組織再生療法の開発は必要不可欠であった。研究代表者の研究グループでは、自己由来の未分化な細胞である「間葉系幹細胞」を用いた歯周組織再生療法の開発に取り組んでいる。ビーグル犬を用いた実験において、処置後8週間で、セメント質・歯周靭帯・歯槽骨の再生が確認できている。しかしながら、個体によっては、歯槽骨の再生が十分に起こっていないものもあった。幹細胞移植による歯周組織再生療法後の細菌感染防止・早期機能回復のためにも、骨再生を伴う堅固な結合組織性付着をより早期に、確実に達成する必要がある。

## 2. 研究の目的

骨髄間葉系幹細胞を用いて歯周組織再生を行う際に、より効率よく再生を誘導できる、シグナルの機能を有する担体を探索する。

今回は、主にβ-TCPについて評価した。人工材料β-TCPによる骨分化誘導の有効性について、*in vitro*および*in vivo*で検討し、早期に、そして確実な歯槽骨再生を目指した間葉系幹細胞移植による歯周組織再生療法を検討する。

## 3. 研究の方法

### ① *in vitro* (平成19年度)

十分な説明と同意の下で、腸骨骨髄より骨髄液を採取し、骨髄液より一定の条件下で分離・培養した細胞をヒト間葉系幹細胞(hMSC)と定義した。*in vitro*で用いた細胞はこのhMSCであり、2~6代のものを使用している。培養皿は24穴 non-coated dishを使用し、wellの中にβ-TCP diskを入れて、その上からhMSCを播種した。培地は10%ウシ胎児血清(FCS)を添加したDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)を使用し、6日間培養後、24時間無血清状態にし

た。細胞接着因子であるintegrinと、細胞外基質であるosteopontinについて評価した。遺伝子レベルの解析としては、total RNA回収後、Real-time PCR法にてmRNAの発現について評価した。タンパクレベルの解析は、タンパク回収後、ELISA法にて、発現タンパク量を評価した。

### ② *in vivo* (平成20年度)

実験動物は、体重10~15kgの雌性ビーグル犬を用いた。腸骨に骨髄穿刺し、骨髄液を採取した。hMSCの場合と同様に、一定の条件下で分離・培養を行いMSCとした。

実験部位は、下顎左右第1~3小臼歯(以下、P1,P2,P3)とし、根分岐部にセメント質・歯周靭帯を含めた骨欠損を作成した。歯周炎を再現するために、欠損部位にアルジネート印象剤を填入し、炎症を惹起させた。2週間後に印象剤を除去し、欠損部位を入念にスクーリングおよびルートプレーニングを施した。これは、炎症誘発物質を除去するとともに、既存の歯周靭帯およびセメント質を完全に除去するためでもある。さらに2週間後に、欠損部位にMSCを移植した。この時、以下の2つの実験群を作成した。

A. MSC・アテロコラーゲンゲル・β-TCPを移植した群

B. β-TCPのみを填入した群

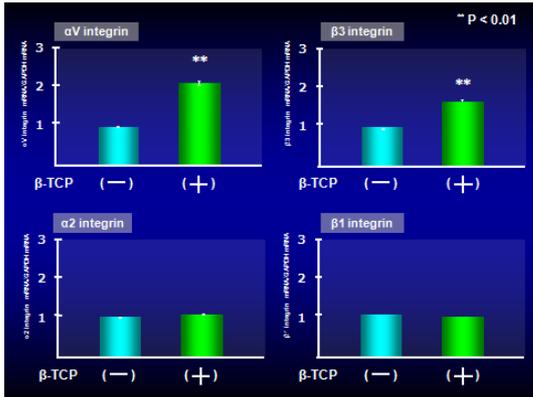
4週および8週間経過観察後、灌流固定を行い、10%EDTA溶液で十分に脱灰を行った。その後、通法に従ってパラフィンに包埋し、近遠心的な矢状断で切片を作成した。

HE染色で、組織観察及び組織計測を、AZAN染色で線維の分布を、TRAP染色で吸収系細胞の分布を、免疫染色でターゲットタンパクの発現について評価した。

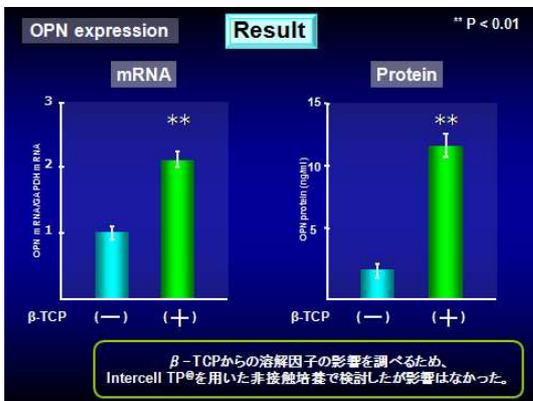
## 4. 研究成果

### ① *in vitro* (平成19年度)

β-TCP上で培養したhMSCは、接着分子αV・β3 integrinのmRNA発現の有意な上昇が確認できた。



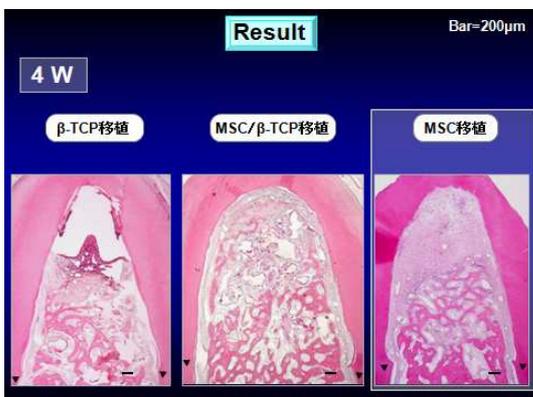
また、細胞外基質である osteopontin の mRNA、ならびにタンパク質発現の有意な上昇が確認できた。



② *in vivo* (平成 20 年度)

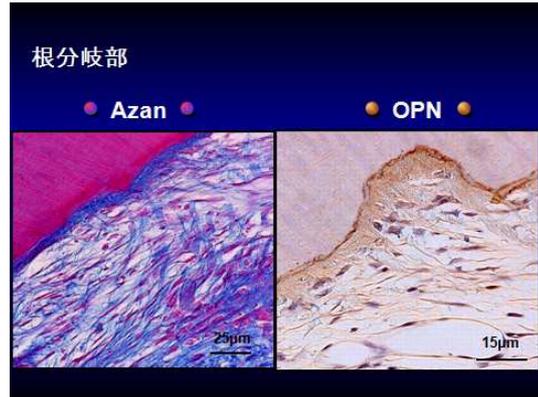
・移植後 4 週間

β-TCP のみを充填した群では、根尖方向への歯肉の侵入と若干の骨の新生が認められた。MSC と β-TCP を併用した群では、根分岐部直下に及ぶ、β-TCP を含めた新生骨が観察された。

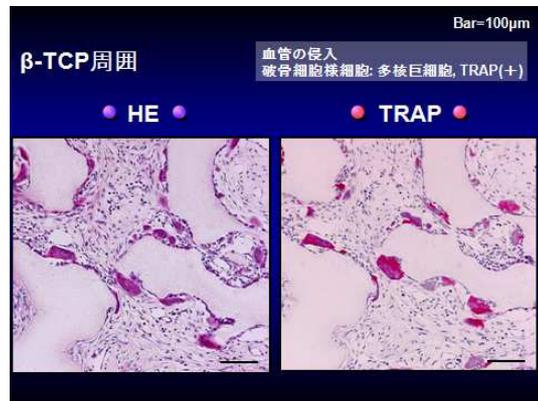


β-TCP 併用群では、根分岐部に新生セメント質が認められ、それにコラーゲン線維が埋入している像が観察された。さらに osteopontin 免疫染色では、新生セメント質

のと思われる基質に陽性反応が認められた。

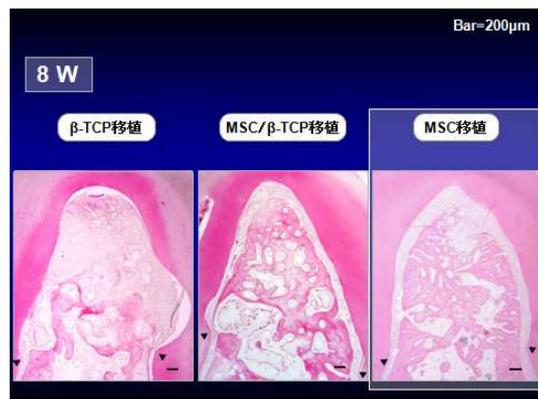


β-TCP の周辺には、TRAP 陽性の多核巨細胞が確認できた。



・移植後 8 週間

β-TCP との併用群において、欠損のほぼ全体で β-TCP を含めた歯周組織の再生が認められた。



しかしながら、4週・8週いずれにおいても、一部の個体ではアンキローシスが認められた。



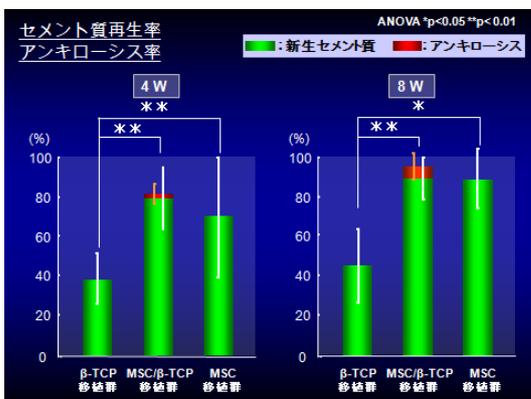
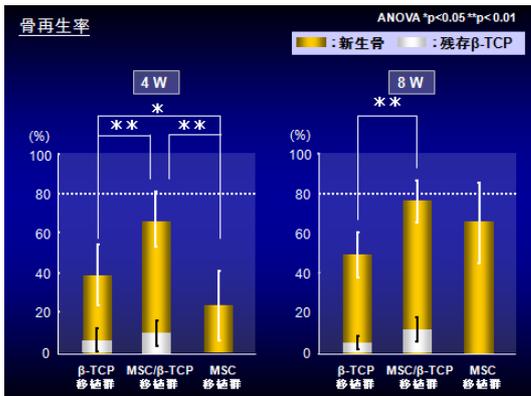
・組織計測

4Wでは、β-TCPとの併用群はMSC移植群と比較して、β-TCPとの併用群を含めた骨量が増加した。

4Wでは、β-TCPとの併用群はMSC移植群と比較して、β-TCPを除いた再生骨量においても約2倍に増加した。

4Wでは、β-TCPとの併用群はMSC移植群と比較して、β-TCPを除いた再生骨量においても約2倍に増加した。

4Wと8Wで、残存したβ-TCPの量は変化がなかった。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Irsogladine maleate abolishes the increase in interleukin-8 levels caused by outer membrane protein 29 from Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans through the ERK pathway in human gingival epithelial cells.

Kishimoto A, Fujita T, Shiba H, Komatsuzawa H, Takeda K, Kajiya M, Hayashida K, Kawaguchi H, Kurihara H.

Journal of Periodontal research

2008 Oct;43(5) 508-513

査読 有

[学会発表] (計 1 件)

①第21回日本歯科医学会 パシフィコ横浜  
平成20年11月14~16日

β-TCPによる骨髄間葉系幹細胞の骨分化誘導を併用した歯周組織再生療法の開発  
永原隆吉、林田浩一、河口浩之、栗原英見

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

林田 浩一 (Koichi Hayashida)

広島大学・病院・助教

研究者番号：10437585

(2)研究分担者

(3)連携研究者