

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592423

研究課題名（和文） パターニング技術によるマラッセ上皮遺残ネットワークの構築と歯周再生療法への応用

研究課題名（英文） Cell-patterning technology for epithelial rest of Malassez network and its application for periodontal regeneration

研究代表者

小牧 基浩 (KOMAKI MOTOHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：30401368

研究成果の概要（和文）：歯周疾患は細菌感染により生じる炎症性疾患であり、主な歯の喪失原因である。したがって、安全で効果的な治療法の開発は極めて重要な課題である。しかしながら、GTR 法やエナメルタンパクなどの従来法では完全な歯周組織の再生には至っていない。我々は歯根面への新生セメント質形成を伴う歯周組織再生法の確立を目的として基礎的検討を行い、細胞転写担体による骨組織再生の有効性を確認し、セメント芽細胞分化に関与する分子の機能を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A periodontal disease is an inflammatory disease due to bacterial infection and is a main cause of tooth loss. Therefore, development of the safe and effective regenerative therapy is an extremely important issue. However, conventional treatment such as the GTR method or the enamel protein does not lead to complete periodontal regeneration. We performed basic evaluation for the purpose of establishment of the periodontal regeneration with the new cementum formation to the root surface and confirmed the effectiveness of the bone regeneration with the cell equipped-carrier and clarified the function of the molecules that participated in cementoblast differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：歯周組織再生、細胞パターニング、セメント芽細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患は歯周病原性細菌の感染により発症する炎症性疾患であり、本邦では成人の約8割が罹患し、主な歯の喪失原因になっている。

現在、臨床では GTR 法やエナメルタンパクが歯周組織の再生療法として認可され用いられているが、歯周組織再生のキーとなるセ

メント質形成を自在に調節するまでには至っていない。したがって、セメント質形成の機構を理解し、より安全で効果的な治療法を開発することは社会的見地からも極めて重要な課題である。

歯の発生過程においてセメント質・歯根膜の形成には、マラッセの上皮遺残（ヘルドヴィッヒ上皮鞘の断烈）と神経堤由来間葉組織の

相互作用が関与すると考えられている。その後国内外の精力的な研究により、マラッセの上皮遺残が産生するアメリジェニンがセメント質形成に関与することが示唆され、組織再生治療にアメリジェニンを主成分とするエナメルタンパクが用いられるまでに至った。最近、マラッセの上皮遺残が歯の萌出後も歯根表面において歯根膜線維芽細胞を取り囲むような特徴的なパターンをもって認められ、また加齢に伴いそのパターンが失われることが報告された。しかしながら、マラッセの上皮遺残のセメント質形成について十分に理解されていない。また、セメント芽細胞の分化調節についても得意的なマーカーの報告が少なく十分に理解されていない。

これまでに我々は、細胞パターンニング技術の歯周組織再生治療への応用研究、歯根膜幹細胞研究、歯根膜細胞の石灰化調節機構に関する研究に取り組んできた(Biochem Biophys Res Commun. 2007;357(4):917-23, J Cell Biochem. 2007;100(2):303-14., J Periodontal Res. 2006 Aug;41(4):303-10., Biochem. Biophys Res Commun. 2005;326(1):147-53., J Cell Sci. 2004;117:1457-68.) そこで、これらの研究成果を踏まえてマラッセの上皮遺残の歯周組織再生過程ならびに歯根膜腔の恒常性維持における機能を明らかにすることが可能になれば、新生セメント質形成を伴うより安全で効果的な歯周再生治療の開発基盤になると考えた。

2. 研究の目的

(1) マラッセの上皮遺残細胞の単離：ヒト歯根膜よりマラッセの上皮遺残細胞を単離する。我々の報告した中・外胚葉系細胞に分化する歯根膜幹細胞を同様の方法で培養し、マラッセの上皮遺残細胞への誘導が可能かを検討し、そのための培養条件を確立する。

(2) マラッセ上皮遺残ネットワークの構築とマトリックスへの転写：マラッセ上皮遺残ネットワークを構築するためのパターン培養条件、パターン化された細胞のマトリックスへの転写条件を検討する。

(3) マラッセの上皮遺残細胞-間葉系細胞の相互作用の解析：パターン培養したマラッセの上皮遺残細胞の存在・非存在/接触・非接触下で、歯根膜幹細胞の共培養を行い、マラッセの上皮遺残細胞の歯根膜幹細胞分化に与える影響を詳細に検討し、機能を明らかにする。

(4) 歯周再生ならびに歯根膜の恒常性維持におけるマラッセ上皮遺残細胞の機能解析：大型動物の歯周組織欠損または再植モデ

ルを用いて、パターン化マラッセの上皮遺残細胞の歯周組織再生ならびに歯根膜の恒常性維持における機能を臨床的・組織学的に検討し明らかにする。

3. 研究の方法

新生セメント質形成を伴う安全でより効果的な歯周組織再生治療の開発基盤を作製するためにセメント芽細胞分化機構の解明と細胞パターンニング法の骨再生への応用を検討した。

(1) 歯根膜より歯根膜幹細胞を酵素処理法により消化抽出し、多分化能を検討する。

- ① FACSによる歯根膜幹細胞マーカー (CD44, CD73, CD90, CD146, CD166, and STRO1)を確認した。
- ② In vitro での軟骨芽細胞、骨芽細胞、脂肪細胞への分化確認：骨芽細胞、脂肪細胞は単層培養、軟骨細胞は遠心管培養でそれぞれ分化誘導培地にて2-3週間培養、細胞は固定後に von Kossa 染色 (石灰化), Oil Red O 染色 (脂肪滴), alcian blue 染色 (酸性ムコ多糖)にて確認した。

(2) セメントタンパク (CEMP1)の発現確認

- ① 磁気細胞分離システム (MACS)を用いて、歯根膜幹細胞を石灰化マーカーであるアルカリフォスファターゼ発現によりソートし、CEMP1発現との関連を免疫染色により検討した。
- ② Real time-PCRによる CEMP1発現確認：ヒトセメント芽細胞 HCEM2をポジティブコントロール、ヒト骨芽細胞 HCOをネガティブコントロールとして、ヒト歯根膜幹細胞における CEMP1発現を免疫染色により検討した。
- ③ BMP2処理ならびに骨芽細胞分化誘導培地 (Lonza: OIM)での骨芽細胞分化の CEMP1発現への影響確認：歯根膜幹細胞をそれぞれBMP2またはOIMにて6日、3週間処理し CEMP1発現を real time-PCRならびに免疫染色にて検討した。
- ④ In vivoにおける歯根膜幹細胞の分化と CEMP1発現を確認：ヒト歯根膜幹細胞をディフュージョンチャンバー内に挿入し、ヌードラット臍部皮下に移植、宿主由来細胞と非接触状態で0, 5, 10週間培養し、このときの骨芽細胞、軟骨芽細胞、セメント芽細胞への分化を real time-PCRならびに組織学的に検討した。

(3) CEMP1の機能解析

- ① ウィルスベクターの作製と歯根膜幹細胞

- 胞における CEMP1 の強制発現
- ② siRNA による CEMP1 の発現抑制
- ③ DNA マイクロアレイによる CEMP1 発現歯根膜幹細胞の網羅的解析

(4) 細胞パターンニング技術を応用した歯周組織再法確立のための基礎的検討
細胞パターンニングならびに担体 (ヒト羊膜) への細胞転写のための細胞培養条件を検討する。

- ① ヒト羊膜への細胞転写法の確立: 高压脱細胞処理したヒト羊膜への細胞の転写条件を検討する。
- ② 骨芽細胞転写羊膜を用いた骨再生能の *in vivo* 検討: ヌードマウスの頭頂骨に骨欠損を作製、未処置群、担体のみ群、細胞のみ群、細胞転写羊膜群に分け、骨再生効率について組織学的、マイクロ CT を用いて形態学的に評価する。

4. 研究成果

セメント質形成は、歯周組織再生において最も重要なプロセスと考えられている。しかしながら、これまでセメント形成の調節機構、特に出生後におけるセメント質新生については十分に理解されているとは言えない。この一つの原因として考えられるのが、セメント質形成に関与する細胞ならびにセメント質に対する特異的のマーカに関する報告がほとんどないことが挙げられる。実際、これまでに報告されたセメント質に関する論文のほとんどが、石灰化関連マーカである RUNX2t、アルカリフォスファターゼ (ALP)、I 型コラーゲン (COL1)、骨シアロプロテイン (BSP)、オステオカルシン (OCN) を用いて評価が行われており、これらは骨マーカ共通である。我々はヒトセメント芽細胞ならびにセメント芽細胞に対する特異的のマーカである cementum derived attachment protein (CAP) と cementum protein1 (CEMP1) を報告した二つのグループとの共同研究によりセメント芽細胞分化調節について検討を行い以下の成果を得た。

1) CEMP1 は骨芽細胞でなく、セメント芽細胞に発現することを、骨芽細胞とセメント芽細胞への分化能を有する歯根膜幹細胞を用いて検討した結果、歯根膜幹細胞を骨芽細胞へ分化させると CEMP1 発現が低下することを明らかにした (J Cell Physiol, 2011)。

2) CEMP1 はセメント芽細胞の分化を誘導することを、CEMP1 強制発現しこんまく幹細胞ならびに siRNA を用いた CEMP1 ノックダウンを用いて検討した結果、CEMP1 強制発現歯根膜幹細胞では歯根膜細胞マーカ並びに骨芽細胞マーカが低下し、セメント芽細胞マ

ーカ-CAP ならびに BSP が上昇することを示した (J Cell Physiol, 2011)。

以上の結果は、CEMP1 がセメント芽細胞ならびに前駆細胞のマーカとしてだけでなく、セメント芽細胞分化に関与することを示した世界で最初の論文であり、今後の国内外で行われるセメント芽細胞分化ならびにセメント質形成に関する研究の発展に寄与すると思われる。

3) 骨芽細胞転写羊膜が骨再生を促進するか否かについてヌードマウス頭頂骨骨欠損モデルを用いて組織学的、マイクロ CT で形態学的に検討した結果、

①細胞パターンニング基板を用いることで骨芽細胞を担体である羊膜に短時間で効率的に転写し、骨再生に必要な細胞-担体複合体を作製できることを示した (J Tissue Eng Regen Med, 2011)。

②上記①で作製した骨芽細胞-担体 (羊膜) 複合体を実験的骨欠損に移植し、骨再生に対する効果をマイクロ CT と免疫組織学的に、対照である未処置群、担体 (羊膜) 群、細胞移植群と比較検討した結果、骨芽細胞-担体複合体は移植後 2 週から有意に骨再生を促進することが示された (J Tissue Eng Regen Med, 2011)。

本研究より得られた成果は、組織適合性が高く、抗炎症作用を有する胎児由来組織である羊膜を骨再生に用いた報告であり、今後セメント質形成能を有する細胞への応用と、これによる新たな歯周組織再生法の確立の基盤となると思われる。

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 5 件)

1) Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells.

Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Sampath Narayanan A, Izumi Y, Morita I.

J Cell Physiol. 2011 in press.

PMID:21465469

2) Cell-printing and transfer technology applications for bone defects in mice.

Tsugawa J, Komaki M, Yoshida T, Nakahama KI, Amagasa T, Morita I.

J Tissue Eng Regen Med. 2011 in press.

PMID:21218471

3) Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme-digested culture methods.

Tanaka K, Iwasaki K, Feghali KE, Komaki M,
Ishikawa I, Izumi Y.
Arch Oral Biol. 2011 Apr;56(4):380-8.
PMID:21144495

4) Therapeutic angiogenesis by
implantation of a capillary structure
constituted of human adipose tissue
microvascular endothelial cells.

Yoshida T, Komaki M, Hattori H, Negishi J,
Kishida A, Morita I, Abe M.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010
Jul;30(7):1300-6.
PMID:20431071

5) Implantation of capillary structure
engineered by optical lithography
improves hind limb ischemia in mice.

Akahori T, Kobayashi A, Komaki M, Hattori
H, Nakahama K, Ichinose S, Abe M, Takeda
S, Morita I.
Tissue Eng Part A. 2010 Mar;16(3):953-9.
PMID:19947885

6) A comparison of the tube forming
potentials of early and late endothelial
progenitor cells.

Mukai N, Akahori T, Komaki M, Li Q,
Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A,
Kobayashi A, Yamaguchi T, Abe M, Amagasa
T, Morita I.
Exp Cell Res. 2008 1;314(3):430-40. Epub
2007 Nov 29.
PMID:18083163

[学会発表] (計 6 件)

1) 小牧基浩、岩崎劍吾、森田育男
歯根膜細胞分化における cementum protein
(CEMP)1 発現と機能解析
第 31 回日本炎症再生医学会
平成 22 年 8 月 5-6 日
京王プラザホテル、東京

2) 岩崎劍吾、木村康之、小牧基浩
歯根膜幹細胞の pericyte としての機能解析
第 53 回秋期日本歯周病学会
平成 22 年 9 月 18-19 日
サンポートホール高松、香川県

3) 小牧基浩、森田育男、和泉雄一、安部ま
ゆみ
歯根膜細胞の骨芽細胞分化における CP-23
発現の検討
第 51 回春期日本歯周病学会
平成 21 年 5 月 15-16 日
岡山コンベンションセンター、岡山

4) 小牧基浩、津川順一、中浜健一、森田育
男
歯根膜細胞の骨芽細胞分化における CP-23
発現の検討
第 26 回日本骨代謝学会
平成 20 年 10 月 29-31 日

大阪国際会議場、大阪

5) 津川順一、小牧基浩、天笠光雄、森田育
男
印刷技術を用いて羊膜に転写した骨芽細胞
による骨再生療法
第 26 回日本骨代謝学会
平成 20 年 10 月 29-31 日
大阪国際会議場、大阪

6) Motohiro Komaki, Kengo Iwasaki, A.
Sampath Narayanan, Higinio Arzate,
Yuichi Izumi, Mayumi Abe
Cementum protein-23 expression in
osteoblastic differentiation of periodontal
ligament cells
94th Annual Meeting of the American
Academy of Periodontology's
September 7-9th, 2008
The Washington State Convention &
Trade Center, Seattle, WA, USA

6. 研究組織
(1) 研究代表者
小牧 基浩 (MOTOHIRO KOMAKI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・准教授
研究者番号：30401368

(2) 連携研究者
森田 育男 (IKUO MORITA)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：60100129

安部 まゆみ (MAYUMI ABE)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：80271980

和泉 雄一 (YUICHI IZUMI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：60159803

(3) 研究協力者
岩崎 劍吾 (KENGO IWASAKI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号：40401351