

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12693

研究課題名(和文) 血管新生を起点とする歯周組織再生技術の構築

研究課題名(英文) Establishment of periodontal tissue regeneration technology based on angiogenesis

研究代表者

本田 みちよ (HONDA, MICHIO)

明治大学・理工学部・専任教授

研究者番号：20384175

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)：歯周病や事故などで失われた歯周組織の再建を目的とし、本研究では、歯周組織の恒常性の維持に大きく関与する歯根膜に着目し、生体に類似した構造を有する人工歯根膜の創製を試みた。歯根膜の主要な細胞成分である歯根膜線維芽細胞と血管を構成する細胞である血管内皮細胞を適切な比率で共培養することによる、細胞間の直接的な相互作用と細胞が分泌する増殖因子による間接的な作用が、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを豊富に含み、緻密な血管網を持つ人工歯根膜様シートの作製に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織の再生を目的とし、歯根膜線維芽細胞と血管内皮細胞を共培養することにより、1) 線維芽細胞が産生するコラーゲンが内皮細胞の増殖の足場となること、2) 線維芽細胞が分泌する種々のサイトカインが内皮細胞の遊走性を高め、緻密な血管網の形成に寄与すること、3) 内皮細胞が分泌するサイトカインが線維芽細胞の活性やコラーゲン産生能を向上させることにより、歯根膜様の構造体を作出した。組織再生においては、種々のサイトカインが足場となる細胞外マトリックスの構築、それに続く血管新生が効率的に行われることが重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：This study was undertaken with the objective of restoring periodontal tissue lost as a result of periodontal disease or traumatic incidents. It concentrated on the periodontal ligament, a pivotal component responsible for maintaining periodontal tissue homeostasis, and endeavored to fabricate an artificial periodontal ligament mirroring the structural characteristics inherent in living organisms. We have shown that direct cell-cell interaction between periodontal ligament fibroblasts and vascular endothelial cells co-cultured in optimal ratios and indirect interaction by growth factors secreted by these cells are essential for the formation of artificial periodontal ligament-like sheets.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：幹細胞 血管新生 歯根膜 歯周組織 共培養

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は細菌によって引き起こされる炎症性組織破壊疾患であり、世界でも罹患率の高い疾患である。近年、歯周病は糖尿病や誤嚥性肺炎、循環器疾患などとの関連性が指摘され、歯周病が全身の健康を脅かす疾患であることが明らかになりつつある。歯周病の治療には、歯周病原菌の増殖の抑制と同時に、失われた歯周組織の再建が求められる。

歯周病進行におけるメカニズムの解明や組織再生技術の発展に伴い、歯周組織再生に関する研究は飛躍的な進歩を遂げている。しかしながら、高度に破壊が進行した歯周組織を完全に再生させることは困難であるのが現状である。また、世界的にも歯周健康に対する政策提言が行われているにもかかわらず、歯周病の罹患率は未だに高いままである。

口腔内環境の改善は全身の健康につながることから、人々の生活の質(QOL)を向上させるためにも、歯根膜を中心とした歯周組織再生を実現させることは重要な課題であると考えられる。

他方、組織再生技術に着目すると、「幹細胞」を利用した組織の作製は実現されつつある。しかし、複数の細胞から成る三次元的な大きな組織や臓器の作出には未だ成功していない。これは、成熟した機能的な血管系を構築することが難しく、酸素の拡散範囲が制限されてしまうことに起因する。すなわち、組織再生の成功の一つに、「成熟した機能的な血管ネットワークを構築する技術」を確立することが挙げられる。そこで、本研究では、成熟した機能的な血管ネットワークを構築するためのアプローチを検証し、歯周組織の再建に寄与する技術を提案し、人工歯根膜様構造体を作製することを目指した。

## 2. 研究の目的

生体機能を発現するための組織再生には、酸素や栄養素を供給できる「成熟した機能的な血管ネットワークの構築」と「生体内環境に類似し、細胞間相互作用を促進する三次元培養環境」を提供する必要がある。本研究では、血管新生を起点とした組織再生を実現するために、間葉系幹細胞(MSC)の分泌する因子に注目し、MSCの持つ細胞特性を外部環境から制御し、優れた血管新生能を有する分泌因子を回収することを目的とした。そのために、効率的に血管新生を促進させる細胞培養の方法を探索することとした。さらに、再生を目指す歯周組織を構成する細胞については、歯根膜線維芽細胞と血管内皮細胞を最適な比率で共培養し、コラーゲンが豊富に存在し、緻密な血管様構造をもつ生体に類似した人工歯根膜の創製を試みることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3 - 1. 外部環境制御によるMSCの培養

本項では、未分化状態を維持し、細胞が本来持つ機能を発現し得る環境でMSCを培養するために、MSCの中でも脂肪由来間葉系幹細胞(AdMSC)を模擬微小重力環境下で培養した。具体的には、AdMSCを3D-Clinostatを用いることで、模擬微小重力環境下( $10^{-3}$  G)で一定期間培養した。培養後の細胞の幹細胞性を通常重力環境下で培養した細胞と比較することで評価するとともに、馴化培地を回収し、血管新生能等を調査した。

### 3 - 2. 増殖因子過剰発現細胞の作製とその評価

本項では、より血管新生能を亢進させるための手法の一つとして、線維芽細胞増殖因子(FGF2)をAdMSCに過剰発現させた細胞を作製した。得られた細胞の特性評価を実施した後、馴化培地を回収し、血管新生能等を調査した。

### 3 - 3. 歯根膜線維芽細胞と血管内皮細胞の共培養

本項では、歯根膜に豊富に存在する歯根膜線維芽細胞と血管内皮細胞を様々な割合で共培養し、コラーゲン産生量、血管新生能、各種遺伝子発現量、サイトカイン産生量などを調査した。これにより、歯根膜に特有な性質を保持している細胞構造体を決定した。

### 3 - 4. 三次元培養環境下における人工歯根膜の創製

本項では、生体に類似した、移植可能な人工歯根膜の創製を目的とし、三次元培養可能なリン酸カルシウムとポリ(乳酸-グリコール酸)共重合体からなる生体吸収性マイクロファイバーストリートを利用し、3 - 3で決定した培養条件に基づき、歯根膜線維芽細胞と血管内皮細胞を共培養した。得られた三次元構造体の歯根膜としての機能について血管新生能を含め調査した。

## 4. 研究成果

### 4 - 1. 外部環境制御によるMSCの応答性

細胞を通常重力環境で1日間接着させた上で3D-Clinostatによる模擬微小重力環境で7日間培養を行い、模擬微小重力曝露開始後7日目に細胞を回収し、幹細胞マーカーの一つである*Nanog* 遺伝子発現量を測定した。その結果、通常重力環境下と比べ微小重力環境下では、*Nanog* の発現量がおよそ1.4倍増加することが分かった。一方、血管新生を促進させる血管内皮細胞増

殖因子(VEGF)に関しては、重力変化がその遺伝子発現に影響を与えないことを確認した。また、MSCによる管腔形成能の評価においても重力条件の違いが管腔形成能に大きな影響を与えることはなかった。これらの結果は、重力という外部環境を制御しても、MSCの血管新生に関連する因子に著しい変化をもたらすことはなく、血管新生能を向上させることに繋がらないということがわかった。

#### 4 - 2 . FGF2 過剰発現細胞の作製とその評価

レンチウイルスベクターを利用し AdMSC において FGF2 遺伝子を過剰発現させた。その結果、FGF2 の遺伝子発現量はコントロール細胞に比べ、約 55 倍に増加していることを確認した。また、ELISA 法により FGF2 の分泌量を測定した結果、コントロール細胞より 10 倍程度多く FGF2 を分泌していることが分かった。さらに、血管新生に関与する VEGF についても調査したところ、遺伝子発現量、分泌量はいずれも 1.6 倍程度に増加していることが明らかになった。そこで、FGF2 過剰発現細胞の馴化培地を利用し、血管内皮細胞の管腔形成能を評価したところ、総血管長と総分岐数が著しく増加しており、MSC における FGF2 の過剰発現は、組織再生において重要な血管新生を効率的に誘導させるための有効な手段の一つとなることが明らかになった。また、FGF2 過剰発現細胞において、血管新生に関連する遺伝子を網羅的に調査した結果、多数の遺伝子発現変動が認められた。より詳細な解析を実施することにより、積極的に血管新生を誘導するためのアプローチを見出すことができると考えられる。

#### 4 - 3 . 歯根膜線維芽細胞と血管内皮細胞の共培養

再生を目的とする歯根膜はコラーゲンが豊富に存在し、緻密な血管網を保持する。そこで、より生体に類似した構造を有する歯根膜様組織を構築するために、様々な比率で歯根膜線維芽細胞と血管内皮細胞を共培養した。その結果、共培養比 1:1 の条件下でコラーゲン産生量が有意に増加した。また、管腔形成能評価においても 1:1 で培養した際に最も管腔の分岐数が多いことが分かった。これらの結果は、歯根膜線維芽細胞と血管内皮細胞の相互作用を介し、コラーゲン合成を促進、コラーゲンを足場として管腔形成が促進したと考えられる。そこで、分泌されたサイトカインに注目し、ELISA 法により測定したところ、共培養条件下においては、FGF2、VEGF 共に濃度が減少していることが明らかになった。これは、共培養によって産生されたサイトカインがコラーゲンなどの細胞外マトリックスに捕捉(貯蔵)されたと考えられる。細胞外マトリックスの合成と分解と共に、サイトカインの吸着と放出が生じることにより、血管新生を起点とする組織再生が継続的に行われていることが推察される。

なお、歯根膜様構造の構築においては、MSC による血管新生促進作用よりも、線維芽細胞と血管内皮細胞との直接的な相互作用の方が、より緻密な血管網を作製する上では、有効な手法となり得ると推察された。

#### 4 - 4 . 三次元培養環境下における人工歯根膜の創製

4 - 3 で決定した共培養比 1:1 の条件で、生体吸収性マイクロファイバーシートに細胞を播種した。その結果、培養日数に関わらず、管腔の形成を確認した。しかし、その管腔構造は二次元培養環境で観察された緻密なものとは異なり、貧弱で未熟な血管様構造であることが観察された。これは、三次元培養環境において、二次元培養環境より増殖性が低下したことで、共培養条件下においてもコラーゲン産生量の増加が見込まれなかったことに起因すると考えられる。また、その増殖性の低下は、基材への初期接着によって制御されている可能性がある。さらに管腔形成の足場として機能する細胞外マトリックスは可溶性分子の貯蔵場である。したがって、細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲンの産生量と管腔形成は、単に足場となるだけでなく、管腔形成に必要な FGF2 や VEGF といった可溶性分子の貯蔵と提供にも大きく関与していることを示した。細胞成分のみで作製した人工歯根膜は機能性には優れるが、移植を目的とする場合には、その強度などに課題が残る。したがって、細胞がより積極的に接着し、増殖、細胞外マトリックス合成を促進可能な生体材料の開発が必要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujita Tatsuwo, Yuki Taigo, Honda Michiyo	4. 巻 25
2. 論文標題 The construction of a microenvironment with the vascular network by co-culturing fibroblasts and endothelial cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 138 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2023.12.004	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 Iizumi Ryoya, Honda Michiyo	4. 巻 7
2. 論文標題 Wnt/ -Catenin Signaling Inhibits Osteogenic Differentiation in Human Periodontal Ligament Fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomimetics	6. 最初と最後の頁 224 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomimetics7040224	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 Inomata Kouki, Honda Michiyo	4. 巻 1
2. 論文標題 Moderate Hypothermia Has the Potential to Reveal the Dominant/Submissive Relationship in a Co-Culture System Consisting of Osteoblasts and Endothelial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Micro	6. 最初と最後の頁 181 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/micro1020014	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 SUZUKI Kitaru, HONDA Michiyo, MATSUURA Tomokazu, AIZAWA Mamoru	4. 巻 130
2. 論文標題 Living reactions of tissue-engineered bone derived from apatite-fiber scaffold in rat subcutaneous tissues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Ceramic Society of Japan	6. 最初と最後の頁 65 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2109/jcersj2.21108	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 Suzuki Kitaru, Fukasawa Jun, Miura Maiko, Lim Poon Nian, Honda Michiyo, Matsuura Tomokazu, Aizawa Mamoru	4. 巻 22
2. 論文標題 Influence of Culture Period on Osteoblast Differentiation of Tissue-Engineered Bone Constructed by Apatite-Fiber Scaffolds Using Radial-Flow Bioreactor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13080 ~ 13080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222313080	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 本田みちよ	4. 巻 40-1
2. 論文標題 培養細胞を利用した生体反応観察	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Society for Biomaterials	6. 最初と最後の頁 64-69
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 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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 関大輔, 本田みちよ
2. 発表標題 骨再生におけるFGF-2過剰発現間葉系幹細胞を用いた血管新生の促進
3. 学会等名 第 46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田龍生, 飯泉諒哉, 本田みちよ
2. 発表標題 人工歯根膜様組織構築を指向した歯根膜線維芽細胞と血管内皮細胞の共培養
3. 学会等名 第 35 回 日本セラミックス協会秋季シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊東祐里菜, 本田みちよ
2. 発表標題 ヒト歯根膜線維芽細胞の骨分化へのWnt/beta-Cateninシグナルの関与
3. 学会等名 第 95 回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丹羽信崇, 本田みちよ
2. 発表標題 三次元培養環境におけるヒト乳歯歯髓由来間葉系幹細胞の細胞機能
3. 学会等名 第 44 回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯泉諒哉, 本田みちよ
2. 発表標題 ヒト歯根膜由来線維芽細胞の骨分化にWnt/beta-Cateninシグナルが与える影響
3. 学会等名 第 44 回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柚木司, 本田みちよ
2. 発表標題 PeriostinとFGF-2の共処理による骨組織再生への影響
3. 学会等名 第 44 回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------