

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月22日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592315

研究課題名（和文） 歯周再生治療に有用な多層性幹細胞シート移植材の開発

研究課題名（英文） Development of multi-layered stem cell sheet transplant material for periodontal regenerative therapy

研究代表者

安部 達也（ABE TATSUYA）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員

研究者番号：80271112

研究成果の概要（和文）：本研究では、歯周組織欠損部への移植を目的に多層性幹細胞シート移植材の作製法を開発した。通常の培養では間葉系幹細胞はコンフルエントになると増殖を停止するが、TGF-β1 とアスコルビン酸を添加すると、細胞は多層化した。さらに ROCK 阻害剤 Y-27632 を添加すると、TGF-β1 による細胞シートの収縮は抑制され、シートは剥離しなくなった。多層化細胞シートは間葉系細胞の表面マーカーを保持しており、多分化能も有していた。このことから本多層化シートは歯周治療における細胞治療法に有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a multi-layered stem cell sheet transplant material with the aim to establish a new method for periodontal regenerative therapy. In the conventional culture medium, the proliferation of the mesenchymal stem cells stopped after forming confluent monolayer. However, the cells continued to grow and formed multi-layer sheets in the presence of TGF-β1 and ascorbic acid. Further addition of ROCK inhibitor Y-27632 to the medium containing TGF-β1 and ascorbic acid prevented the contraction of the cell sheets caused by TGF-β1. The cells in the multi-layered sheets expressed the same surface markers with those of the original mesenchymal stem cells and had the potential to differentiate into many cell lineages. These results indicated that this multi-layered stem cell sheet transplant material is useful for periodontal regenerative therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

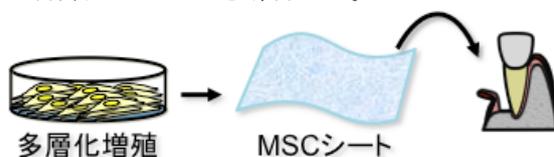
キーワード：移植・再生医療、再生医学、細胞・組織、歯学、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

歯周組織の再生は歯周治療の大きな目標の1つである。国内外の多くの施設で歯周組織再生のための研究が行われているが、それらの治療は歯周組織の全ての構成要素の再生を伴う歯周組織再生を未だ達成していない。間葉系幹細胞 (MSC) の移植は、MSC の持つ自己複製能と多分化能から、次世代の歯周再生療法として期待されている。MSC の移植の成功率は、使用する MSC の細胞数が増えると増加する。そして細胞シートは浮遊細胞の注入より移植の効果が高い。つまり高密度の多層性 MSC シートを移植することが望まれる。いくつかのグループによって多層性 MSC シートが開発されているが、いずれも骨芽細胞分化用培地を用いて培養が行われている。様々な細胞によって構成されている歯周組織の再生には、多分化能をもったシートの方がより有効と考えられ、この点が問題として残されている。また、もう1つの問題点として、MSC は、通常の培養においてコンフルエントになると増殖を停止する。即ち、MSC の保有する増殖能を維持したままの多層性 MSC シートを作製する方法を考案することが必要である。transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) はアスコルビン酸と牛胎仔血清 (FBS) 存在下で、コンフルエントな線維芽細胞の増殖を刺激し、細胞の層化を導く。我々はこれまでに、この培地を発展させて、線維芽細胞を多層化増殖させ細胞シートを作製し、この培地を multilayer formation medium (MFM) と名付けた。しかしながら、MSC における MFM の効果はわかっていなかった。そこで、我々は、この MFM を応用して、多層性 MSC シートの作製を試みることにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MSC を用いた新たな歯周組織再生療法を目指して、多分化能を保有した高密度多層化 MSC シートの作製法を確立することである。このために、われわれがこれまでに線維芽細胞の多層化シート作製のために開発した MFM を MSC の培養に応用した。線維芽細胞の多層化には接着斑の形成と接着斑依存性収縮性フォースが影響していることが予想されたため、接着斑が MSC の多層化にどのような役割を果たすのか、また、その制御法についても解析した。



3. 研究の方法

MSC として、正常ヒト骨髄由来未分化間葉系幹細胞を Lonza 社より購入し、実験に使用した。この細胞は、CD29、CD44、CD105、CD166 陽性で、CD14、CD34、CD45 陰性であり、間葉系幹細胞のマーカーを発現していた。

MSC は、我々が以前に開発した MFM で培養された。この培地は、EIDIA 社の S-Clone を基礎培地とし、TGF- β 1 (1 ng/ml)、アスコルビン酸 2 リン酸 (0.15 mM)、FBS (10%) を含む。実験によっては、MSC の接着斑の形成を抑制する目的で、ROCK 阻害剤 Y-27632 (10 μ M) が、MFM に添加された。

MSC 培養後の細胞シートは、Coomassie brilliant blue で染色し、画像に取り込んで面積を計測した。細胞増殖率は、BrdU の取り込み量により計測した。細胞数は、DNA 量の測定により解析した。接着斑の誘導と ROCK 阻害剤によるその抑制については、接着斑の構成要素であるピンキュリンとパキシリンの免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察することで解析した。

培養後の細胞シートに含まれる細胞の分化マーカー CD29、CD44、CD105、CD166、CD14、CD34、CD45 の発現は、フローサイトメトリーで解析した。

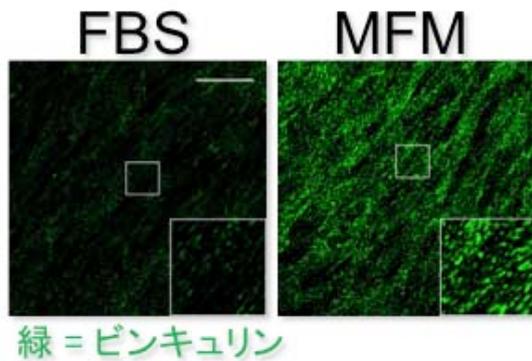
培養後の細胞シートに含まれる細胞の分化能については、シート形成後の細胞を Lonza 社製の骨芽細胞誘導培地、脂肪細胞誘導培地で培養し、アルカリフォスファターゼ染色および alizarin Red S 染色することにより骨芽細胞への分化を、Oil Red O 染色することにより脂肪細胞への分化を確認した。

4. 研究成果

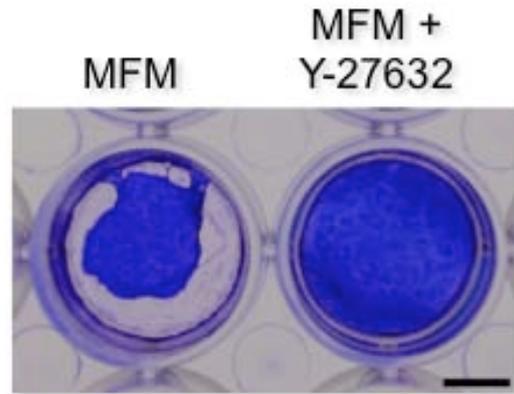
コンフルエントとなり増殖を停止した MSC を、TGF- β 1、アスコルビン酸、FBS の3つの因子を含む MFM で培養すると、MSC は再び増殖を開始し多層化した。そして BrdU 取り込み解析において、MFM を用いた場合の増殖率は、TGF- β 1、アスコルビン酸、FBS のうち1つまたは2つを欠いた培地よりも有意に高かった。

しかしながら、MSC を MNM で培養して3~4日目において細胞シートの剥離が観察された。コンフルエントな細胞の増殖を MFM で刺激すると、TGF- β 1 の刺激により ROCK (または Rho kinase) と呼ばれる酵素が活性化され、アクチンが収縮して細胞内に収縮性フォースが発生する。これと同時に接着斑も形成される。接着斑は、インテグリン、ピンキュリンやパキシリンなどの膜内アダプタータンパク、シグナル分子を含んだ大きなタンパクユニットで構成され、ストレスファイバーと呼ばれる細胞骨格のアクチン線維束

と連結する (Pellegrin and Mellor, 2007)。この接着斑も、ROCK 依存性収縮性フォースの発生に関与する。これらの収縮性フォースによる細胞シートの収縮の増強が起こり、細胞シートが剥離したと思われる。MFM で培養後の細胞シートの細胞内フォースの指標として、接着斑に含まれるパキシリンとピンキュリンをモニターした結果、MSC の細胞底部の至る所に接着斑が観察された。剥離した細胞シートは代謝活性が低下し、増殖停止の方向に進む。今回の研究において、MFM で4日間培養したMSCシート辺縁の約40%が培養プレートから剥離し、剥離した収縮部の BrdU 標識細胞数は剥離していない非収縮部の BrdU 標識細胞数よりも明らかに少なかった。そこで我々は細胞高密度型MSCシートの作製には、接着斑と細胞内フォースの抑止が重要ではないかと考えた。



高い選択的 ROCK 阻害剤であり細胞収縮を解放し幹細胞の多分化能を維持するとされる Y-27632 は、接着斑と細胞内フォースの抑止に有用であると考えた。MFM に Y-27632 を添加して培養した結果、細胞シートの剥離は抑制された。パキシリンとピンキュリンを観察した結果、接着斑が形成されていなかったことから、収縮性フォースが抑制され、細胞シートの剥離が起きなくなったと考えられる。また、Y-27632 添加 MFM で培養した MSC の増殖率は Y-27632 非添加 MFM で培養した MSC の非収縮部の増殖率と差がなく、両者ともに多層化していた。このことから、Y-27632 は、接着斑の形成と収縮性フォースを抑制し MSC シートの剥離を回避させるが、細胞増殖と細胞シートの多層化は抑制しないことが明らかとなった。



Y-27632 添加 MFM で培養した MSC の間葉系幹細胞表面マーカーをフローサイトメトリーで解析したところ、培養前の MSC と同様のマーカーを発現していた。また、この細胞を分化誘導培地で培養したところ、骨芽細胞系と脂肪細胞系の2つの系統の細胞に分化させることができた。このことから今回我々の作成した多層化シートに存在する細胞は、多分化能を維持していたと考えられる。

歯周組織再生において ROCK 阻害剤 Y-27632 の影響は過去に報告がない。しかしながら、Emre らはこの薬品は多くのアプリケーションに有用で多くの種類の細胞に安全だと報告している。我々は Y-27632 を直接移植部位に投与しないので、将来の移植実験においてこの薬品は歯周組織再生に影響がないと考えている。今後、本研究で開発した多層性幹細胞シートを歯周組織欠損動物モデルに移植し、移植部位の歯周組織の再生への有効性と安全性について、さらに検討していきたいと考えている。

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)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 「幹細胞シートの作製に関する研究」
中村康平、安部達也、原宜興
第 53 回秋季日本歯周病学会学術大会、高松、9 月、2010

(日歯周誌、52 (秋季特別号)、94、2010)

(2) 「幹細胞シートの作製」
中村康平、安部達也、原宜興
2010 年度日本臨床歯周病学会九州支部・日本歯周病学会九州 5 大学合同研修会、福岡、11 月、2010

(プログラム集、22、2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 達也 (ABE TATSUYA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
客員研究員
研究者番号：80271112

(2) 研究分担者

原 宜興 (HARA YOSHITAKA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：60159100

(3) 連携研究者

該当なし