

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659917

研究課題名（和文）in silico 歯周組織再生医学の創出を目指した複雑系単細胞研究

研究課題名（英文）Complexity single cell analysis designed to create a new periodontal regenerative medicine in silico

研究代表者

村上 伸也（MURAKAMI SHINYA）

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70239490

研究成果の概要（和文）：ライブセルイメージングにより、FGF-2の細胞周期および細胞分裂促進作用を単細胞観察で明らかにした。また、in vitro 創傷治癒モデルの解析から、FGF-2の歯根膜細胞遊走促進作用を明らかにするとともに、VEGF添加がFGF-2単独刺激における細胞遊走を増強することを明らかにした。さらに、歯根膜細胞が血管内皮細胞の管腔様形態変化を補助し、さらにFGF-2はVEGF依存性にその作用を増強することが示唆された。以上の結果から、FGF-2による歯周組織再生のメカニズムの一端が明らかになったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Real-time live cell imaging revealed that FGF-2 promoted the cell cycle and the division of the cells. Furthermore, FGF-2 stimulated migration of periodontal ligament cells in a wound healing model. In this model, VEGF further enhanced the FGF-2-induced migration. It was also demonstrated that co-culture of endothelial cells with periodontal ligament cells stimulated the lumen formation of the endothelial cells and this effect was partially caused by VEGF produced by FGF-2-stimulated periodontal ligament cells. These results revealed, at least in part, the mechanisms of periodontal regeneration by FGF-2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯周組織再生、歯根膜組織、単細胞イメージング、複雑系単細胞研究

1. 研究開始当初の背景

いわゆる「歯根膜」は、幹細胞をはじめ分化段階の異なる様々な細胞亜集団から構成されている。我々がマウス歯根膜から多数のクローン細胞を樹立した際にも、形態学上全く相違を認めないがアルカリフォスファターゼ活性の異なる（つまり硬組織形成細胞への分化段階が異なる）細胞群により歯根膜細胞が構成されていることが確認されている（Yamada *et al.* *J. Biol. Chem.*, 2007）。しかしながら、従来の培養歯根膜細胞を用いた歯周組織再生に関わる基礎研究においては、

このような歯根膜細胞の多様性に注意が払われることはなく、機能や分化段階の異なる細胞群の共培養系における個々の細胞反応の総和を、歯根膜細胞の反応と捉えられてきた。近年、『複雑系生命科学』という新しい学問分野が注目されている。これは生体を分子-細胞-組織-個体という階層構造で捉えると、それぞれの階層内ネットワークが巧妙に相互制御あるいは自己制御して、その結果として生体システムが頑強かつ省エネで柔軟な環境対応を可能にしているという考えであ

る。そしてそのシステムのなかの『揺らぎ』という生体が元来もつノイズ調整機構により、各階層の機能や動態が決定されていくと考えられている (Eldar *et al. Nature*, 2010)。歯周組織再生をより深く理解し、将来、*in silico*での再生医療の予知性診断を可能にするには、数千から数万個の細胞を一塊として捉えてきた従来の *in vitro* 研究手法に加えて、一分子あるいは一細胞をターゲットにし、静的な解析に時間軸を加えた動的な解析を行い、多様な細胞群からなる組織を常時変化する『生き物』として捉えた研究が必要とされている。しかしながら、歯周組織再生医学の分野において、このような解析が試みられた前例はなかった。

2. 研究の目的

歯根膜細胞を対象として、その増殖・遊走・分化という歯周組織再生過程で重要な各細胞機能についてライブセルイメージングによりクローン化した細胞を用いて一細胞単位でリアルタイムにて詳細に観察し、細胞動態・挙動について解析する。その結果から、ヘテロな細胞群の中における単細胞の応答性を明らかにするとともに、多細胞の共生環境における一細胞の応答性を明らかにするための情報を得る。また、組織再生にとって極めて重要な生物学的イベントの一つである血管新生に着目し、共にクローン化された歯根膜細胞と血管内皮細胞の共培養系を確立し、ライブセルイメージングにより両細胞群の動態・挙動を解析する。

3. 研究の方法

(1) 細胞周期のライブセルイメージング解析

Hela 細胞をガラスボトムディッシュ上に播種し、細胞の培養面への接着を確認後、蛍光コビキチン化ベースのセルサイクルインディケーターである Premo™FUCCI Cell Cycle Sensor を添加した。細胞播種後、48 時間から 60 時間にかけてタイムラプスイメージング装置を用いて、シングルセル単位で細胞周期と細胞分裂について観察を行った。なお、細胞の培養には FGF-2 添加あるいは非添加の 10%FCS 含有 alpha-MEM を用いた。

(2) *in vitro* 創傷治癒モデルを用いた細胞遊走に関する解析

創傷治癒モデルを用いた細胞遊走能の解析には、CytoSelect™ 24-Well Wound Healing Assay kit を用いた。中央に Wound Healing Insert を設置し、0.9mm の無細胞部を作成した 24 穴プレートに本研究室にて樹立したマウス歯根膜細胞株 MPDL22 を Wound Healing Insert 上部より播種した。Over night の培養後、Wound Healing Insert を除去、培地を

吸引した。FGF-2 あるいは VEGF を添加あるいは非添加の FCS 非含有培地を加え、12 時間培養し無細胞スペースへの細胞遊走を観察した。

(3) 血管内皮細胞と歯根膜細胞の共培養における細胞相互作用に関する検討

細胞播種前日に CULTREX In Vitro Angiogenesis Assay Kit Tube Formation もしくは Matrigel を 4°C over night にて溶解させた。Micro-Slide Angiogenesis を用い、気相下にてゲル化させたものを足場材として使用した。血管内皮細胞株 b.End5 を CellTracker Orange CMTMR あるいは PKH26 Fluorescent Cell Linker Kit、MPDL22 を CellTracker Green CMFDA あるいは PKH67 Fluorescent Cell Linker Kit にてトレーシングした後、個々の細胞を単独あるいは共に播種し、FGF-2・VEGF 単独刺激あるいは共刺激を加えて培養を行い、Time Lapse (Bio Station IM:Nikon) にて観察を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞周期に関する解析

Premo™FUCCI Cell Cycle Sensor を Hela 細胞に作用させ、実験条件の検討を行った。細胞周期の調整因子である Cdt1 (G1 期) を GFP にて、geminin (S, G2, M 期) を赤色蛍光タンパク (RFP) にて標識し、ライブセルイメージングにより単細胞レベルでセルサイクルの進行を観察することに成功した。また、Hela 細胞に FGF-2 を作用させることにより、セルサイクルの進行促進を認めた。さらに、細胞分裂については、細胞播種後、48 時間から 60 時間の間に約 31% の細胞が分裂していることがリアルタイムで観察され、5ng/ml FGF-2 存在下では約 51% の細胞において細胞分裂を観察した。この結果は、FGF-2 が個々の Hela 細胞の細胞分裂を促進的に制御していることを明らかにした。

(2) *in vitro* 創傷治癒モデルを用いた細胞遊走に関する解析

マウス歯根膜細胞 MPDL22 を用いて 0.9mm 幅の無細胞エリアへの細胞の遊走について、5ng/ml FGF-2 存在、非存在下にて 12 時間培養し観察を行った。その結果、FGF-2 の添加により、細胞遊走の促進が観察された (図 1)。

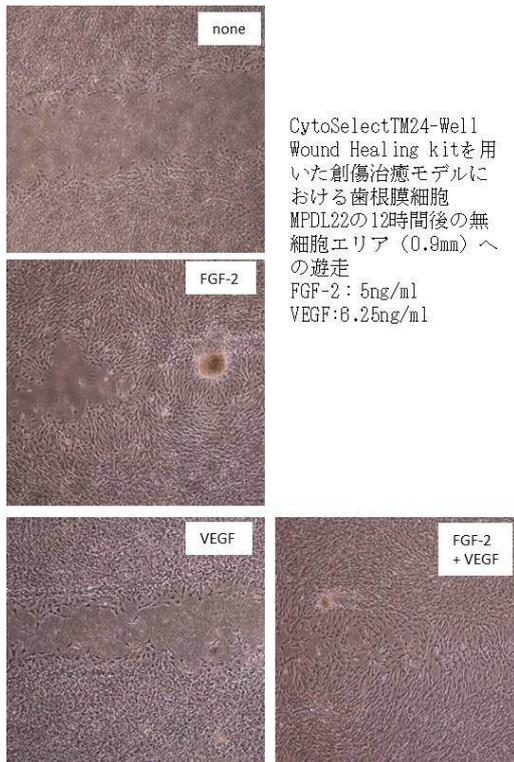


図1 創傷治癒モデルにおける歯根膜細胞の遊走

また、VEGF 存在下および FGF-2 と VEGF との共刺激における細胞遊走について解析を加えた。その結果、VEGF 単独刺激では、MPDL22 の遊走能に影響を与えなかった一方で、VEGF 添加は FGF-2 単独刺激における細胞遊走を著明に増強した (図1)。なお、マイトマイシンC 処理により、細胞増殖を阻害した際にも同様の結果が得られた。

(3) 血管内皮細胞と歯根膜細胞の共培養における細胞相互作用に関する検討

b. End5 と MPDL22 の共培養の結果、b. End5 の管腔様形態変化が誘導された。興味深いことに、管腔形態を示した b. End5 の周囲にペリサイト様に MPDL22 が近接して配置されていく像が観察された。またこの現象は FGF-2 存在下にて増強し (図2 および 3)、その効果は VEGF 中和抗体処理により阻害された。両細胞の共培養により培養上清中の VEGF 濃度が上昇すること、さらに FGF-2 刺激により歯根膜細胞からの VEGF 産生量が増加することから、FGF-2 により誘導される VEGF が歯根膜細胞と血管内皮細胞間の細胞間相互作用の一端を担っている可能性が示唆された。

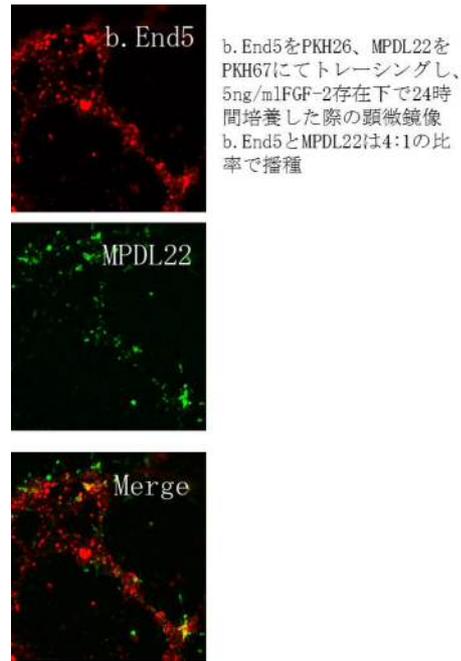


図2 血管内皮細胞 b. End5 (赤) と歯根膜細胞 MPDL22 (緑) の FGF-2 存在下での共培養時の顕微鏡像

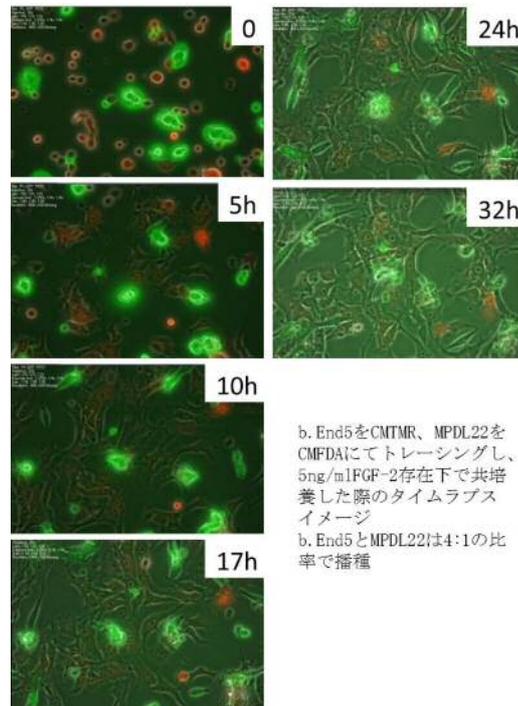


図3 血管内皮細胞 b. End5 (赤) と歯根膜細胞 MPDL22 (緑) の共培養におけるタイムラプスイメージ

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9件)

① Shinya Murakami: Periodontal Tissue Engineering - present status and future perspective-, 30th Annual academic session of Korean Association for Dental Research, 2012年12月1日、Seoul (Korea)

② Yuko Kojima, Manabu Yanagita, Satoru Yamada, Takenori Nozaki, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami: Cooperative Effects of FGF-2 and VEGF on Periodontal Ligament Cells, 2012 AAP-JSP joint meeting, 2012年9月29日~10月2日、Los Angeles (USA)

③ Yuko Kojima, Manabu Yanagita, Kenta Mori, Shinya Murakami: FGF-2 induces VEGF expression by periodontal ligament cells, 2012年6月22日、Iguacu Falls(Brazil)

④ 村上伸也: Periodontal Tissue Engineering の将来展望-サイトカイン療法と細胞移植治療の融合を目指して-, 第11回日本再生医療学会総会、2012年6月13日、横浜

⑤ 村上伸也: 歯周組織再生療法の現状と未来、第70回日本矯正歯科学会大会、2011年10月18日、名古屋

⑥ Yuko Kojima, Manabu Yanagita, Kenta Mori, Motozo Yamashita, Takenori Nozaki, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami: Cooperative effects of FGF-2 and VEGF in periodontal ligament cells, 第59回国際歯科研究学会日本部会学術大会、2011年10月8日、広島

⑦ Shinya Murakami: Periodontal regeneration by FGF-2: present status and future outlook, 9th General session of Asian Pacific Society of Periodontology, 2011年9月10日、Hong Kong

⑧ 兒嶋由子、柳田学、森健太、山下元三、山田聡、野崎剛徳、北村正博、村上伸也: FGF-2により誘導される血管新生への歯根膜細胞の関与、第32回日本炎症・再生医学会、2011年6月3日、京都

⑨ 兒嶋由子、柳田学、森健太、野崎剛徳、山田聡、北村正博、村上伸也: FGF-2による誘導される血管新生へのマウス歯根膜細胞の関与、第54回日本歯周病学会春季学術大会、2011年5月28日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 伸也 (MURAKAMI SHINYA)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：70239490

(2) 研究分担者

山田 聡 (YAMADA SATORU)
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：40359849

竹立 匡秀 (TAKEDACHI MASAHIDE)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60452447