

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593117

研究課題名(和文) 幹細胞由来パラクライン因子を応用した新規歯周組織再生治療の開発

研究課題名(英文) Nobel periodontal regenerative therapy using paracrine factors from stem cells

## 研究代表者

岩崎 剣吾 (Iwasaki, Kengo)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：40401351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は慢性炎症による歯周組織の破壊を特徴とする疾患である。本研究では歯根膜幹細胞(PDLSC)から得られる因子が歯周組織の再生を促すか否かを検討した。ラット歯周組織欠損を作製しコントロール液性因子、PDLSC液性因子(PDLSC-CM)および線維芽細胞液性因子を欠損内へ移植した。術後4週でPDLSC-CM移植は他の二群に比べて有意な歯槽骨の新生を示した。プロテインアレーの結果、PDLSC-CM中には多くの血管新生関連タンパク、成長因子、サイトカインが検出された。さらに再生中の歯周組織ではPDLSC-CM移植によりTNFαの発現が抑制されており、免疫反応の抑制と再生の関係が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is chronic inflammatory disease, which is characterized by the destruction of the tooth supporting tissues. In this study, we investigated our hypothesis that transplantation of paracrine factors from periodontal ligament stem cells (PDLSC) could induce the regeneration of lost periodontal tissues. We transplanted 3 different paracrine factor preparations (Control-CM, PDLSC-CM and Fibroblast-CM) into surgically created periodontal defects in rats. After 4 weeks of transplantation, PDLSC-CM demonstrated significant new bone formation under micro-CT observations compared with other 2 groups. It was also revealed that PDLSC-CM contained various growth factors, cytokines and angiogenic factors in protein array analysis. Moreover, we found that gene expression of TNF-alpha was reduced by the PDLSC-CM transplantation in regenerating rat periodontal tissue, suggesting the relationships between reduction of inflammation and tissue regeneration.

研究分野：再生

キーワード：歯周病 再生 幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

組織再生誘導法 (GTR) 法やエナメルマトリクス抽出物が歯周治療に用いられ、これらの方法により歯周病で破壊された歯周組織の再生が可能である事が明らかとなってきた。しかしその適応症は非常に狭く、また再生される歯周組織の量も限られているのが現状である。近年、幹細胞移植による組織再生が新たな再生医療として期待されている。間葉系幹細胞は骨・軟骨・脂肪細胞に分化する能力を有し、間葉系組織の再生に用いる細胞ソースとして注目されている。我々は歯根膜由来間葉系幹細胞を担体と共にラットの臼歯部歯周組織欠損へ移植し、歯周組織の再生を確認した。しかし、移植した細胞の生着は予想より低く、細胞の定着以外の再生メカニズムが働いていることが考えられた。そこで我々は移植した幹細胞から産生される液性因子が再生に寄与しているのではないかと仮定した。これまで間葉系幹細胞は様々な液性因子を産生し、創傷治癒過程に影響を及ぼすことが知られている。具体的には免疫抑制、抗アポトーシス作用、血管新生作用、細胞遊走作用、などが報告されている。しかしながら歯根膜幹細胞の液性因子の作用についてはほとんど情報が無い。

### 2. 研究の目的

歯根膜由来間葉系幹細胞 (PDLSC) 由来液性因子 (PDLSC-CM) の移植が歯周組織再生を促すか否かを動物実験モデルを用いて検証することを本研究の目的とした。また、再生が認められる場合には、その液性因子に含まれる因子の詳細な検討と、再生メカニズムについても明らかとする。

### 3. 研究の方法

PDLSC の培養は健全抜去歯から得られた歯根膜組織をコラゲナーゼ・ディスパーゼを用いた酵素処理によってコロニーを形成しつつ増殖する細胞群を回収、15%FBS 含有 aMEM 培地を用いて培養した。間葉系幹細胞は継代数を経ることにより幹細胞性が減弱することが知られているので細胞は全て継代数 5 以内で使用した。正常ヒト維芽細胞 (NHDF) は Lonza より購入し 10% の FBS を含む DMEM 培地中で培養した。細胞培養上清の回収には、PDLSC、NHDF を培養し sub-confluent の状態で、無血清 DMEM に交換し 48 時間培養した。その後、遠心・フィルトレーションを行い、限外濾過により濃縮した。

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) は EGM2 培地 (Lonza) を Type1 collagen コート培養皿上で培養した。

ラット外科的歯周組織欠損の作成においては King らの方法 (King GN, Hughes FJ. J Clin Periodontol. 2001. 28(5):465-75.) を修正して作成した。下顎第一臼歯から第二臼歯近心根近心隅角にわたる 2 mm x 3 mm の歯周組織欠損を、歯槽骨、歯根膜、セメント質、

象牙質の一部を歯科用バーを用いて削除し作製した。

培養上清 (CM) の移植はコラーゲンスポンジを担体として、CM を含浸させた後、フィブリン糊 (ポルヒール) にてその上をシールした。4 週後に動物をトサツシマイクロ CT を撮影し再生組織量を比較した。

CM に含まれるタンパク質の解析にはプロテインアレイ (R&D 社、Ray Bio 社) を用いた。

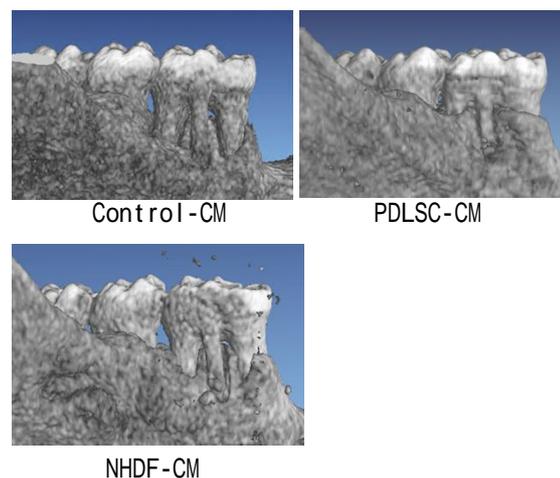
手術後 5 日目のラットの歯周組織を回収し、total RNA を回収後、cDNA を作製、qRT-PCR によって遺伝子発現量の比較を行った。

PDLSC-CM の血管新生への影響を検討する目的で、HUVEC をマトリゲル上で培養し、毛細血管様の network を形成する系へ PDLSC-CM, NHDF-CM, Control-CM を用いて HUVEC による network 様構造形成を蛍光顕微鏡下にて観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) PDLSC-CM 移植による歯周組織再生

術後 4 週間で撮影したマイクロ CT の結果では、PDLSC-CM は Control-CM (細胞を除いた培地をインキュベートした物)、NHDF-CM を移植した群と比べて有意な歯槽骨形成を示した。(下図) PDLSC-CM を移植した欠損においては、下顎第一臼歯遠心頬側根の大部分が新生したと考えられる歯槽骨に広く覆われ、また近心頬側根においても同様に歯根表面が歯槽骨に覆われている像が観察された。一方、Control-CM, NHDF-CM を移植したラットの欠損部歯根表面は若干の歯槽骨の新生が見られるが、PDLSC-CM を移植した動物に比べて術後 4 週での露出歯根表面積が広い結果となった。この結果は PDLSC-CM を歯周組織欠損へ移植することにより、歯周組織の再生が誘導される事を示唆していると考えられる。



#### (2) PDLSC-CM に含まれるタンパク質の解析

PDLSC-CM 移植による歯周組織再生において、PDLSC-CM 中の再生に寄与する因子の検索を目的として、血管新生関連因子、成長因子、サイトカインをプロテインアレイを用いて解析した。プロテインアレイの結果、

PDLSC-CM は Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1(TIMP-1) 、Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA)、Vascular Endothelial Growth (VEGF)、Pentraxin-3 などの血管新生関連因子を豊富に含むことが明らかとなった。また、Insulin-like Growth Factor Binding Protein (IGFBP)-6 、 IGFBP-2 、Platelet-Derived Growth Factor-AA、Insulin-like growth factors (IGF)-2 などの成長因子も同時に含まれていた。さらにサイトカインアレーでは Serpin-E1、Monocyte Chemoattractant Protein(MCP)-1、Macrophage Migration Inhibitory factor (MIF)などが含有されている結果が得られた。

#### (3)移植局所における遺伝子発現

PDLSC-CM 移植によって増強される歯周組織再生のメカニズムを解析する目的で、PDLSC-CM を移植した5日後のラット歯周組織欠損内の修復組織中における遺伝子発現を解析したところ、Control-CM 移植群と比較して、PDLSC-CM を移植したラットの修復組織内では有意に低いTNF- $\alpha$  の遺伝子発現が観察された。また IL-beta, COX-2 についても統計学的有意差は認めないものの減少傾向が見られた。

#### (4) HUVEC の network 形成への各種 CM の影響。

HUVEC はマトリゲル上で毛細血管様の network を形成したが、培養液を Control-CM あるいは NHDF-CM に交換したところ、その形成が劇的に減少した。しかし、PDLSC-CM を用いた場合 Control-CM, NHDF-CM に比べて有意にその形成が上昇した。PDLSC-CM 中に血管新生関連因子が含まれている結果と合わせて、PDLSC-CM の血管新生促進作用が示唆される結果となった。

(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3件)

1. Morita S, Iwasaki K, Maruoka Y, Okada Y, Ando T. Identification of periodontal bacteria from carotid artery plaque in chronic periodontitis patients. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 査読有 26, 2014, 450-455. doi:10.1016/j.ajoms.2013.05.001

2. Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, Tanaka Y, Taki A, Honda I, Kimura Y, Takeda M, Akazawa K, Oda S, Izumi Y, Morita I. Periodontal Regeneration Using Periodontal Ligament Stem Cell-Transferred Amnion. Tissue Eng Part A. 査読有 20, 2014, 693-704. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0017.

3. Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, Tanaka Y, Taki A, Kimura Y, Takeda M, Oda S, Izumi Y, Morita I. Periodontal Ligament Stem Cells Possess the Characteristics of Pericytes. J Periodontol. 査読有 84, 2013, 1425-1433. doi: 10.1902/jop.2012.120547.

[学会発表](計5件)

1. 岩崎剣吾、歯根膜幹細胞由来液性因子を用いた歯周組織再生、第56回秋季日本歯周病学会学術大会、平成25年9月22日、群馬(前橋)

2. 岩崎剣吾、歯根膜幹細胞培養上清を用いたラット歯周組織の再生、第34回日本炎症再生医学会、平成25年7月2日、京都(京都)

3. 岩崎剣吾、歯根膜幹細胞の培養過程における形態および分化能の変化について、第56回春季日本歯周病学会学術大会、平成25年5月31日、東京(東京)

4. 岩崎剣吾、歯根膜幹細胞転写羊膜移植によるラット歯周組織の再生、第33回日本炎症再生医学会、平成24年7月5日、福岡(福岡)

5. 岩崎剣吾、ラット臼歯部歯周組織欠損に対する歯根膜幹細胞転写羊膜を用いた歯周組織再生治療について、第55回春季日本歯周病学会学術大会、平成24年5月19日、北海道(札幌)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 剣吾 (IWASAKI Kengo)  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究  
科・寄付講座講師  
研究者番号：40401351

(2) 研究分担者

小牧 基浩 (KOMAKI Motohiro)  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究  
科・寄付講座准教授  
研究者番号：30401368

森田育男 (MORITA Ikuo)  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究  
科・教授  
研究者番号：60100129

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：