

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893221

研究課題名(和文) 高度な骨分化能と抗炎症作用を有する幹細胞を利用した新規歯周組織再生療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel periodontal tissue regeneration using mesenchymal stem cells with high osteodifferentiation capacity

研究代表者

澤田 俊輔 (Sawada, Shunsuke)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：60711075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内感染症である慢性歯周炎は、罹患率の高さから国民を悩ます口腔疾患である。重度の慢性歯周炎では骨吸収により抜歯を余儀なくされるケースも少なくない。炎症を効率的に抑制するとともに、歯槽骨再生を積極的に促す新規治療法の確立は重要な課題となっている。我々は複数の炎症性サイトカインの抑制作用を持つ融合タンパク質発現ベクターを構築した。また、抗炎症作用だけでなく、組織修復能の観点から、in vivo実験に有効な骨分化能に優れたGFPマウス骨髄由来間葉系幹細胞株を樹立した。より効果的な抗炎症作用を有し、組織修復能に長ける幹細胞を用いた新たな治療法開発の基盤となることが予想される。

研究成果の概要(英文)：Chronic periodontitis is an intraoral infectious disease that affects the nation with high prevalence. We see a lot of patients being forced to extract their teeth because of inflammatory bone resorption. To promote fundamental research of novel cell therapy using mesenchymal stem cells, we established stem cell lines from the bone marrow of GFP transgenic mice and constructed a new expression vector targeting inhibition of several inflammatory cytokines. We expect that those new tools promote novel cell therapy in periodontal research.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：MSC サイトカイン 歯周病 IL-1 IL-6 再生医学 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性歯周炎は、罹患率の高さから国民を悩ます炎症性疾患である。重度の慢性歯周炎では炎症性骨吸収により抜歯を余儀なくされるケースも少なくない。現在、歯周炎の病態コントロールを目指した研究が多く行われているが、いまだ病態の完全な抑制制御法は確立されていない。炎症を効率的に抑制するとともに、歯槽骨再生を積極的に促す新規治療法の確立は重要な課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、炎症を効率的に抑制するとともに、歯槽骨再生を積極的に促す新規治療法の確立を目的としている。

3. 研究の方法

本研究の概要は緑色蛍光タンパク (GFP) 強発現トランスジェニックマウス由来間葉系幹細胞 (GFP-MSC) に抗炎症作用を持つタンパク発現ベクターをトランスフェクションし、より効果的な炎症抑制タンパクと MSC を用いたより効率的な歯槽骨再生を組み合わせることである。

GFP マウスの頸骨より細胞を採取し、接着性細胞のみを MSC 増殖培地にて培養して MSC 様細胞を選択的に増殖させた。細胞に hTERT および SV40 遺伝子のプラスミドベクターを導入し、薬剤耐性選択後、限界希釈法にて単一細胞由来細胞株を樹立した。細胞株間の分化能の検討を行った後、サイトカイン関連分子の mRNA 発現や各種細胞内シグナル検討を行った。抗炎症サイトカイン融合タンパクに関しては、IL-1 および IL-6/sIL-6R 作用の抑制効果を持つ IL-1ra および sgp130 を pFLAG-CMV-5a (SIGMA) に組み込み、融合蛋白発現ベクターを構築した (図 1)。その後、FreeStyle293F 細胞 (invitrogen) に遺伝子導入を行い、発現させた融合蛋白をアフィニティーカラムによって精製した。標的細胞はヒト健常歯肉由来歯肉線維芽細胞とし、融合蛋白の細胞障害性は細胞の形態観察および MTT 法によって調べた。

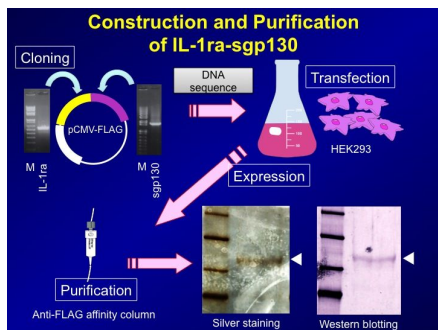


図 1. 複数の炎症サイトカインをターゲットとした抗炎症融合タンパクベクターの構築

4. 研究成果

我々は複数の炎症性サイトカインの抑制作用を持つ融合タンパク発現ベクターを構築し、抗炎症作用を確認した。また、抗炎症作用だけでなく、組織修復能の観点から、in vivo 実験に有効な骨分化能に優れた GFP マウス骨髄由来間葉系幹細胞株を樹立した (図 2)。樹立した細胞株の特徴は、SG-2 がバランスよく脂肪、骨に分化する一方、SG-5 は骨分化能に長けていることが分かった。

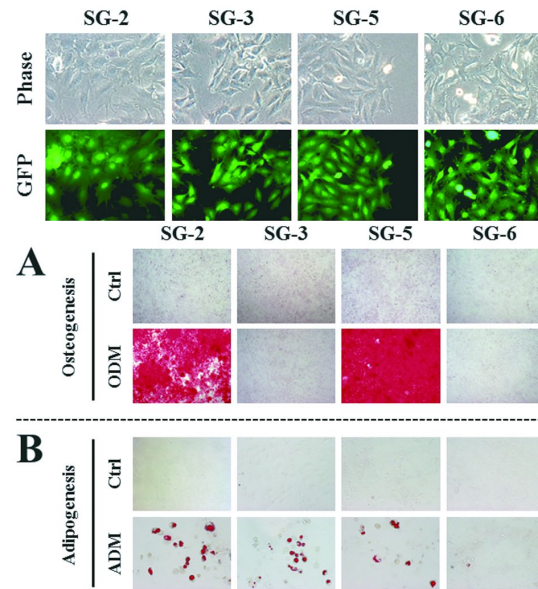


図 2. single cell cloning より得られた SG-5 細胞株は骨分化能に優れていた。

今後、融合タンパク発現ベクターを SG5 にトランスフェクションし検討を続ける予定である (図 3)。より効果的な抗炎症作用を有し、組織修復能に長ける幹細胞を用いた新たな治療法開発の基盤となることが予想される。

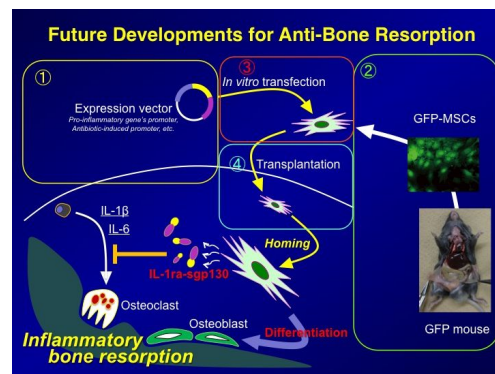


図 3. 今後の展開

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3件)

Sawada S, Chosa N, Takizawa N,
Yokota J, Igarashi Y, Tomoda K, Kondo H,
Yaegashi T, Ishisaki A.
“Establishment of mesenchymal stem cell
lines derived from the bone marrow of
GFP-transgenic mice exhibiting diversity
in intracellular TGF- β and BMP signaling”.
Molecular Medicine Reports, in press, 2015.
査読有

Aomatsu E, Takahashi N, Sawada S,
Okubo N, Hasegawa T, Taira M, Miura H,
Ishisaki A, Chosa N. “Novel SCRG1/BST1
axis regulates self-renewal, migration, and
osteogenic differentiation potential in
mesenchymal stem cells”. Scientific
Reports, 4:3652, 2014. doi:
10.1038/srep03652. 査読有

Yokota J, Chosa N, Sawada S, Okubo N,
Takahashi N, Hasegawa T, Kondo H,
Ishisaki A. “PDGF-induced PI3K-mediated
signal enhances TGF- β -induced osteogenic
differentiation of human mesenchymal
stem cells in the TGF- β -activated
MEK-dependent manner”. International
Journal of Molecular Medicine, 33:534-542,
2014. doi: 10.3892/ijmm.2013.1606. 査読有

[学会発表](計7件)

澤田俊輔、兒島由佳、友田幸一:GFP マウス
骨髄由来間葉系幹細胞の分化能と網羅的遺
伝子解析, 第59回日本口腔外科学会総
会・学術大会, 2014年6月17日、幕張メッ
セ 国際会議場・国際展示場(千葉県千葉
市)。

滝沢尚希、澤田俊輔、伊東俊太郎、佐々木
大輔、帖佐直幸、石崎明、八重柏隆:GFP マウ

ス骨髄由来間葉系幹細胞の分化能とサイト
カイン受容体の発現, 第140回日本歯科保存
学会春期学術大会, 2014年6月20日、滋賀
県立芸術劇場びわ湖ホール(滋賀県大津市)。

河合崇普、村井治、金澤智美、澤田俊輔、
相羽健太郎、藤原英明、水城まさみ、菊池善
博、八重柏隆:口腔ケア処置前後による口腔
内細菌数の変動について, 第57回日本歯周
病学会春期学術大会, 2014年5月23日、長
良川国際会議場(岐阜県岐阜市)。

澤田俊輔、伊東俊太郎、佐々木大輔、藤原
英明、村井治、八重柏隆:GFP マウス骨髄由
来間葉系幹細胞の株化とサイトカイン関連
遺伝子群の発現解析, 第57回日本歯周病学
会春期学術大会, 2014年5月23日、長良川
国際会議場(岐阜県岐阜市)。

Shunsuke Sawada: Development of
Novel Cell Therapy Using Mesenchymal
Stem Cells in Periodontitis. Harvard
University school of dentistry iwate
medical university school of dentistry
exchanging program, International
Student Forum, memorial heart center bld
9F lecture room#1 Iwatemedical
University, 2013年12月16日、岩手医科学
大学(岩手県盛岡市)。

Shunsuke Sawada, Takashi Yaegashi:
Establishment of a novel cell therapy for
periodontitis using MSCs enhanced
osteogenic differentiation and anti-
inflammation capacities. 招待講演 2014

IADR Hatton Awards国内二次選考会、
2013年11月18日、東京医科歯科大学(東京)。

藤原英明、澤田俊輔、伊東俊太郎、金澤智
美、大川義人、佐々木大輔、村井治、八重柏
隆:培養歯髄細胞におけるIL-6刺激伝達経路,
第139回日本歯科保存学会秋期学術大会,
2013年10月16日、17日、秋田県総合生活
文化会館アトリオン(秋田県秋田市)。

[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

澤田 俊輔（SAWADA SHUNSUKE）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：60711075

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：