

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861631

研究課題名(和文)メカニカルストレスを利用した高機能化歯根膜細胞シートの開発

研究課題名(英文)Development of periodontal ligament-derived cell sheet

研究代表者

加来 咲子(Kaku, Sakiko)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：60584589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：繰返しの伸展刺激により歯根膜由来細胞における1型コラーゲンおよびその修飾酵素の発現は変化した。したがって繰返し伸展刺激は歯根膜由来細胞によって産生されるマトリックスの主成分である1型コラーゲンの量と質を共に変化させる可能性が強く示唆された。今後の課題としては繰返し伸展刺激の更なる至適化と、長期培養に耐える培養基質の改良が必要である。

研究成果の概要(英文)：In the present study, cyclic mechanical loading affect the gene expression of type I collagen and collagen-modifying enzymes on mouse periodontal ligament-derived cells. These results indicate that optimization of loading regimen may enhance the quantity and quality of type I collagen matrix produced by periodontal ligament-derived cells.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯根膜細胞

## 1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯を歯槽骨と結合させている支持組織であり、咬合機能を支える組織として、その重要性は非常に高い。歯根膜を構成する細胞は多岐にわたり、大部分を占める歯根膜線維芽細胞の他に、隣接する歯槽骨の恒常性を維持する骨芽細胞、破骨細胞、更には免疫系の細胞を多数含んでいる。また、歯根膜組織の代謝回転は極めて早く、多くの幹細胞を含んでいる。実際、培養条件化の歯根膜細胞の増殖能は非常に高いだけでなく、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋芽細胞、血管内皮細胞等への多分化能が報告されていることから、組織再生に応用する細胞源として非常に有用であると考えられている。歯根膜細胞は一定の培養条件下において、自身が産生する細胞外基質とともに細胞/マトリックスシート(細胞シート)を生成する。この細胞シートは特に歯周組織再生に有効であるとされ、動物実験モデルにおいては歯根膜組織のみならず、一部の細胞は骨芽細胞へも分化することが報告されている(Tsumanuma et al. 2011)。つまり細胞シートの機能はスペースメイキングの為にスキャフォールドとしてだけでなく、組織再生に必要な細胞源としても有効であることが示唆されている。歯根膜由来細胞による歯周組織の再生療法は既に臨床試験が開始されており、良好な成績が報告されている。

機械的刺激が歯根膜組織の維持機構に大きく寄与していることは議論を待たない。歯科臨床の場に於いて、過剰な咬合力は歯根膜腔の拡大に始まる歯周組織の崩壊を惹起するばかりでなく、咬合の負荷を喪失した歯根膜が廃用性萎縮を起こすことや、矯正力によって歯の移動が可能な事実はその代表的な例である。つまり機械的刺激は歯根膜細胞によって感知され、歯根膜線維や歯槽骨のリモデリングを制御するメカニズムが存在する。培養条件下の歯根膜細胞においても、機械的刺激はその増殖能や骨芽細胞分化能に影響を及ぼすことが多数報告されている(Tang et al. 2012; Wang et al. 2011)。

歯根膜由来細胞による細胞シートは歯周組織再生に有用なツールとなる可能性を有しているものの、限られた細胞源から十分な細胞数を得ることが必要であり、現時点ではセルプロセッシングセンター(CPC)における長期の培養期間が必要である。CPCにおける長期間の培養は、再生療法に至るまでの患者

の待ち時間の増加、経費の増大、細胞特性の変化、培養期間中の感染リスクの増加等、患者負担の増大のみならず治療の成否に影響を及ぼす大きな要因となっている。

## 2. 研究の目的

一般に歯根膜細胞シートは静置状態において培養、作製されるが、この状態は歯根膜組織に置き換えると咬合状態の付与されていない、いわゆる廃用性萎縮を呈している状態に他ならない。ここに一定のメカニカルストレスを付与することによって、より強固で活性の高い高機能な歯根膜細胞シートを作製できる可能性があると考えている。本研究計画では、培養状態において異なる条件のメカニカルストレスを与えて細胞シートを作製し、その機能を解析することによって、より機能性の高い歯根膜細胞シート開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

7週齢のC56BL/6マウスから上下臼歯を抜歯し、酵素溶液(Liberase DL, Roche)にて細胞を遊離させた後、遠心分離(100rpm, 5分)にて回収し、alpha-MEM(含10%Fetal Bovine Serum, 1% antibiotics)にて培養する。培養には専用のシリコンチャンバーをFibronectinにてコーティングしたものを基質として用いた。伸展装置(ShellPa, メニコン・ライフサイエンス社製 Fig.1)により8%の伸展刺激を1Hzで1日3時間付与した。伸展開始から24、48、72時間後にTRIZOL(Invitrogen)を用いてサンプルを回

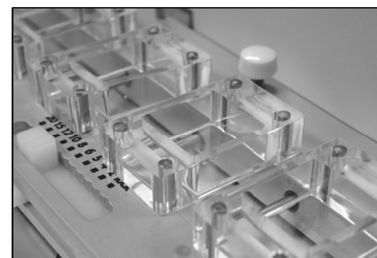
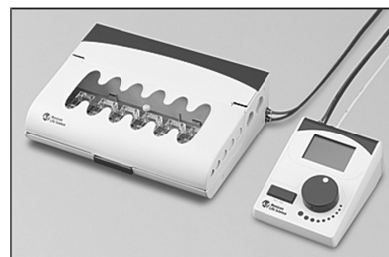


Fig. 1 繰返し伸展装置

収し、Total RNA の調整後、TaqMan Fast *Virus* 1-Step Master Mix (ABI) を使用して Real time PCR にて遺伝子発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

72 時間の伸展刺激により細胞の形態は変化した(Fig. 2)。

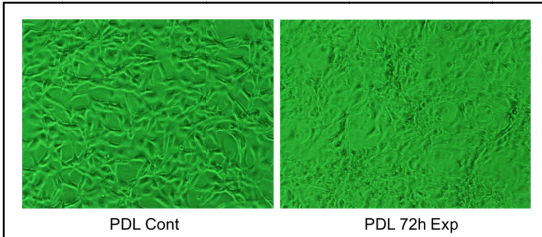


Fig. 2 繰返し伸展によるマウス歯根膜由来細胞の形態変化

遺伝子発現解析は力学的刺激において発現が上がるとされている Runx2/Cbfa1 ならびに Spp1 を用いた。また 1 型コラーゲン自身

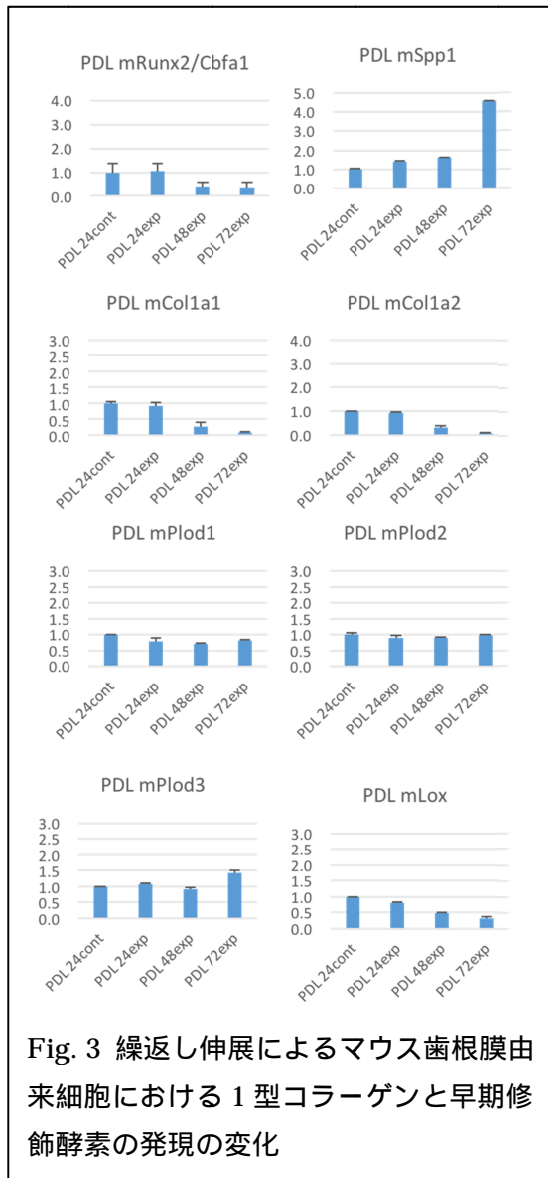


Fig. 3 繰返し伸展によるマウス歯根膜由来細胞における 1 型コラーゲンと早期修飾酵素の発現の変化

をコードする Col1a1, Col1a2 について、コラーゲン修飾酵素の Plod1-3, Lox について行った。

Spp1 については伸展開始 72 時間後に約 4.5 倍の発現上昇が見られ、Col1a1, Col1a2 は経時的に減少傾向を示した。Plod 遺伝子については Plod3 においてのみ 72 時間後に約 1.4 倍の発現上昇を認め、Lox は経時的に減少した(Fig. 3)

コラーゲンの後期修飾酵素においては Serpinh1, Fkbp10, Bmp1 は減少傾向を示したが減少傾向を示したが、Colgalt2 は 72 時間後に約 10 倍の発現上昇を認めた(Fig. 4)。

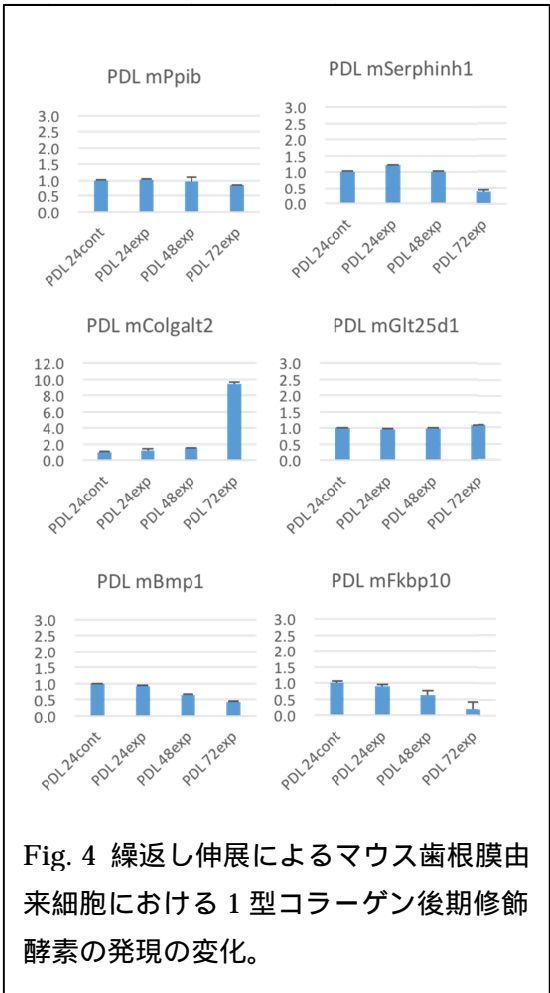


Fig. 4 繰返し伸展によるマウス歯根膜由来細胞における 1 型コラーゲン後期修飾酵素の発現の変化。

以上の結果よりこの研究で用いた伸展条件においては 1 型コラーゲン自体をコードする遺伝子の発現は減少したものの、一部の修飾酵素の発現は顕著に増加した。1 型コラーゲンの生合成においては遺伝子の発現量は必ずしもタンパクの産生量と正の相関を示すとは限らず、修飾酵素の発現がその質と量に大きく影響を及ぼすことが知られている(Kaku and Yamauchi 2014)。したがって細胞の伸展条件の更なる至適化は今後の課題のひとつであろう。さらに培養したマトリックスは今回用いたシリコン膜からは容易に剥

がれてしまうため長期培養には適さなかった。今後の臨床的な応用のためには培養基質、または接着材料の改善も必要とされる。

#### 参考文献

1. Kaku M, Yamauchi M. 2014. Mechano-regulation of collagen biosynthesis in periodontal ligament. Journal of prosthodontic research. 58(4):193-207.
2. Tang N, Zhao Z, Zhang L, Yu Q, Li J, Xu Z, Li X. 2012. Up-regulated osteogenic transcription factors during early response of human periodontal ligament stem cells to cyclic tensile strain. Archives of Medical Science : AMS. 8(3):422-430.
3. Tsumanuma Y, Iwata T, Washio K, Yoshida T, Yamada A, Takagi R, Ohno T, Lin K, Yamato M, Ishikawa I et al. 2011. Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. Biomaterials. 32(25):5819-5825.
4. Wang Y, Li Y, Fan X, Zhang Y, Wu J, Zhao Z. 2011. Early proliferation alteration and differential gene expression in human periodontal ligament cells subjected to cyclic tensile stress. Archives of oral biology. 56(2):177-186.

#### 5 . 主な発表論文等

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

加来 咲子 (KAKU Sakiko)

新潟大学 / 医歯学総合病院/ 医員

研究者番号 : 60584589