

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861670

研究課題名(和文)同種の歯根膜細胞移植における免疫応答メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of immunoreaction mechanism in allogeneic periodontal ligament cell transplantation

研究代表者

妻沼 有香(Tsumanuma, Yuka)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70726265

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):本研究では間葉系幹細胞(MSC)の特徴をもつ歯根膜由来幹細胞の同種移植を行った際、著大な炎症反応なしに歯周組織再生が促されることをイヌモデルにおいて見いだした。その際、末梢血における炎症性サイトカインの上昇が同種移植群に認められなかったため、免疫調節機構が関与していると考えられた。しかしながら、その詳細な免疫応答メカニズムについては不明な点も多いため、歯根膜由来組織幹細胞と免疫応答細胞の相互作用を明らかにすることとした。ヒト歯根膜由来幹細胞と同種のヒト血球系由来T細胞の共培養系で実験を行った結果、ヒト歯根膜由来幹細胞に免疫を調節する可能性があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): In this study we found that the allogeneic periodontal ligament-derived multipotent MSCs (PDL-MSCs) regenerated periodontal tissue without an intense inflammatory reaction in the dog model. Serum levels of inflammatory markers from peripheral blood sera showed little difference between the autologous and allogeneic groups. PDL-MSCs may regulate the immunoreaction. However the mechanism of the immunomodulatory properties of PDL-MSCs is not well understood. Therefore, second purpose of this study was to elucidate the interaction between PDL-MSCs and the immune cells. The result showed that the human PDL-MSCs might regulate the immune reaction in the co-culture experiment.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯根膜幹細胞 免疫調節機構

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSC) は組織再生療法の源として注目を集めている。米国 Osiris 社が開発した MSC 細胞治療製剤は臨床試験が進行中であり、移植片対宿主病 (GVHD) に対する治療法として効果をあげている。ここで用いられる MSC は自己のものではないため、同種移植となる。同種の組織臓器細胞を移植した際には同種免疫応答、すなわち拒絶反応が生じると考えられる。しかしながら一方で、MSC には免疫調節作用があることが知られている。これまでに T 細胞、NK 細胞、樹状細胞に対する影響など、様々な調節機構が *in vitro* の系で報告されてきている。しかしながら、詳細な分子メカニズムなど不明な点も多く、さらに間葉系幹細胞を含むといわれる組織幹細胞については明らかとなっていないのが現状である。我々の研究室ではこれまで、間葉系幹細胞 (MSC) の特徴をもつ歯根膜由来の細胞を用いた歯周組織再生研究に取り組んできた。温度応答性培養皿を用いて作成した自己の歯根膜細胞シートをイヌの歯周組織欠損部に移植した際、歯周組織が顕著に再生されることを報告してきた。また同様にイヌモデルを用いて同種の歯根膜細胞シート移植実験を行い、均一な細胞を移植した同種の歯根膜細胞シートは自己の歯根膜細胞シート以上の効果を示した。しかしながら、実際に移植された歯根膜細胞に対して、生体内でどのような免疫応答がなされているかは定かではない。また過去の報告によると歯根膜由来細胞は免疫寛容の働きをもち、T 細胞および B 細胞の増殖抑制作用があることが知られている。しかしながら、その詳細な機序やその他免疫細胞 (樹状細胞やナチュラルキラー細胞など) に対する影響は不明である。従って同種の移植細胞に対する免疫応答メカニズムについて、明らかにする必要があると考える。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、間葉系幹細胞 (MSC) の特徴をもつ歯根膜由来組織幹細胞の同種移植が歯周組織再生を顕著に促すことをイヌの歯周組織欠損モデルにおいて見いだした。同種の MSC 移植については組織再生に効果的であり、かつ MSC 自体が免疫抑制作用も持つことが知られている。一方で、その詳細な免疫応答メカニズムについては不明な点も多いのが現状である。そこで、まず動物モデルにおいて移植による免疫反応が生じているか否かを明らかにすること。また次に、ヒト歯根膜由来組織幹細胞と免疫応答細胞の相互作用を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物モデルでの実験

イヌの水平性骨欠損モデルを作成し、同種の歯根膜細胞シートおよび自己の歯根膜細胞シートを歯周組織欠損部に移植した。4 匹は同種の歯根膜細胞シート移植群、別の 4 匹は自己の歯根膜細胞シート移植群とした。移植直前 (0 週)、抜糸時 (2 週)、屠殺時 (8 週) に、すべての個体から末梢血を採取した。各末梢血より血清を分離したものをサンプルとして用い、血清中の CRP、CD30、IFN- $\gamma$ 、IL-10 の濃度をイヌ特異的な ELISA キットを用いて測定した。

### (2) ヒト細胞での実験

ヒト歯根膜由来組織幹細胞と同種のヒト血球系由来 T 細胞の共培養を行った。本研究では CD4 陽性、CD8 陽性、CD3 陽性 T 細胞を用いる事とした。共培養後に各 T 細胞の増殖について測定した。

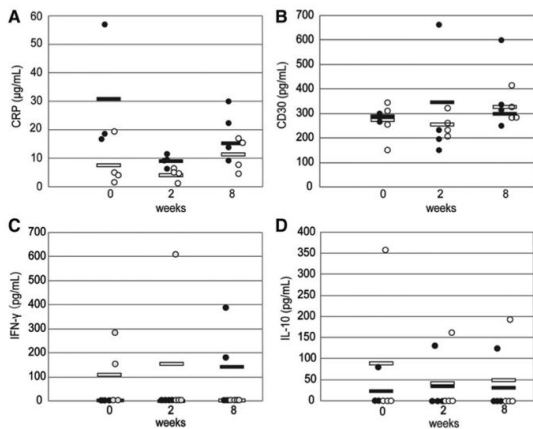
次にヒト樹状細胞により免疫を惹起させたヒト血球系由来 CD4 陽性、CD8 陽性、CD3 陽性 T 細胞をヒト歯根膜由来幹細胞と共培養した。その後各 T 細胞数を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 動物モデルでの実験結果

組織学的に観察した結果、自己の歯根膜細胞シート移植群および同種の歯根膜細胞シート移植群ともに著名な炎症所見は認められなかった。

血清中のタンパク量についてELIZA法にて検討した結果、血清中のCRP、CD30、IFN- $\gamma$ 、IL-10の濃度について、自己の歯根膜細胞シートと同種の歯根膜細胞シート移植群では有意な差は各タイムポイントで認められなかった。



白丸と白バー：自己の歯根膜細胞シート移植群

黒丸と黒バー：同種の歯根膜細胞シート移植群

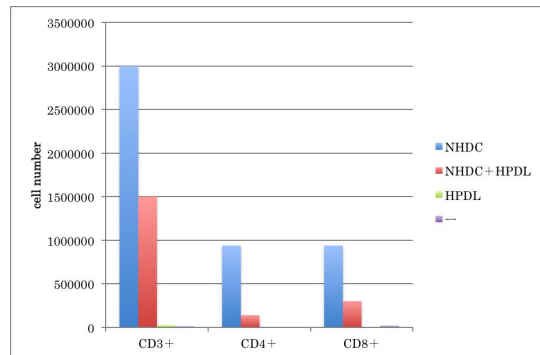
本結果より、同種の移植細胞が炎症を惹起しなかったといえる。本研究では免疫抑制剤を使用していないため、免疫反応を生じなかったことは、歯根膜由来の間葉系幹細胞の免疫抑制効果による可能性がある。

研究期間内に、これらの成果の論文発表を行った (Bioreserach Open Access. 2016,5.22-36)。

##### (2) ヒト細胞での実験結果

ヒト歯根膜由来幹細胞と同種のヒト血球系由来T細胞の共培養系で実験を行った結果、T細胞の増殖は見られなかった。従って、ヒト歯根膜由来幹細胞はヒト血球系由来T細胞の免疫応答を直接的に活性化しないことが明らかとなった。

ヒト樹状細胞(NHDC)により免疫を惹起させたT細胞(ヒト樹状細胞とT細胞の共培養によりアロ反応を生じる)をヒト歯根膜由来幹細胞(HPDL)と共培養することで、各T細胞の増殖を抑制する傾向が見られた。(下図)



本結果より、ヒト歯根膜細胞に免疫を調節する可能性があるといえる。今後さらに詳細なメカニズムについて検討予定である。

#### 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)

[雑誌論文](計 1 件)

Yuka Tsumanuma, Takanori Iwata, Atsuhiko Kinoshita, Kaoru Washio, Toshiyuki Yoshida, Azusa Yamada, Ryo Takagi, Masayuki Yamato, Teruo Okano, and Yuichi Izumi, Allogeneic Transplantation of Periodontal Ligament-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Sheets in Canine Critical-Size Supra-Alveolar Periodontal Defect Model, BioResearch Open Access, 査読有り, 5巻, 2016, pp22-36, DOI:10.1089/biores.2015.0043

〔学会発表〕(計 1 件)

Yuka Tsumanuma, Takanori Iwata, Kaoru Washio, Hozue Kuroda, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Yuichi Izumi, Comparison of canine multipotent mesenchymal stromal cells from various mesenchymal tissues, Europerio8(国際学会), 2015年06月05日, London, UK

〔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：  
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

妻沼 有香 (Tsumanuma Yuka)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究

科・医員

研究者番号：70726265

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：