

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893144

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞のTrophic因子が歯周組織に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of trophic factors released from mesenchymal stem cells on the periodontal tissue

研究代表者

沢田 啓吾 (Sawada, Keigo)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70733054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、間葉系幹細胞由来のTrophic因子が、歯周組織に及ぼす影響について解析を行った。まず、脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)由来のTrophic因子が培養ヒト歯根膜細胞(HPDL)の硬組織形成細胞への分化を促進させることが明らかになった。一方で、ADSCがIGFBP6を分泌していることが明らかとなった。さらに、IGFBP6の発現を抑制したADSC培養上清では、HPDLの硬組織形成細胞への分化促進作用が有意に抑制された。本研究結果から、歯周組織に移植されたADSCがIGFBP6を含むTrophic因子を産生することで、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, trophic factors released by mesenchymal stem cells were examined for their paracrine effect on human periodontal tissue-forming cells. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (ADSC) conditioned medium stimulates the differentiation of human periodontal ligament cell (HPDL) to mineralized tissue-forming cells. Besides, ADSC secreted insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP6). Furthermore, the positive effects of ADSC conditioned medium on HPDL differentiation were significantly suppressed by transfecting ADSCs with IGFBP6 siRNA. These results revealed the mechanism that ADSC transplanted into the periodontal tissue release trophic factors that can stimulate the differentiation of HPDLs to mineralized tissue-forming cells.

研究分野：歯周再生医学

キーワード：歯学 再生医学 間葉系幹細胞 歯周炎 Trophic因子

## 1. 研究開始当初の背景

現在、臨床応用されている歯周組織再生療法は、歯根膜などの歯周組織に内在する幹細胞を活性化することにより、歯周組織の再生を図る治療法である。しかしながら、このような組織幹細胞の数は加齢とともに減少し、増殖能や分化能も低下することが知られている。そこで、他の組織より採取した幹細胞を歯周組織欠損部へ移植することにより、歯周組織再生を誘導することが有用と考えられる。これまで申請者は、犬実験的歯周病モデルにおいて、フィブリンゲルを足場材として脂肪組織由来間葉系幹細胞を移植することで、歯周組織の再生誘導効果を明らかにしてきた。申請者らを含め、これまで、間葉系幹細胞移植による歯周組織再生誘導効果は、複数報告されているが、その分子メカニズムは未だ不明な点が多く残されている。これまでは、主に移植した間葉系幹細胞が組織を構成する各種細胞に直接分化することで、移植部位の組織再生に寄与する Repair 効果が中心的な役割を担うと考えられてきた。しかしながら、近年、Repair 効果に加えて、移植した間葉系幹細胞が成長因子やサイトカイン等の液性因子を分泌することにより、パラクライン的に周囲細胞を活性化し、移植部位の組織再生を促進する Trophic 効果の重要性が示唆されてきている。

Trophic 効果の中心的な役割を担う因子として、成長因子の影響が数多く報告されている。幹細胞から分泌される成長因子の具体例としては、マウス後肢虚血部への間葉系幹細胞の移植において VEGF と HGF が、ラット皮膚創傷部への同細胞の移植において VEGF と FGF-2 が、これらの組織の再生・修復作用を担っていることが示唆されている。VEGF は組織再生において、血管新生に関与する重要な因子であり、また、HGF は血管内皮細胞の増殖・遊走に関与することが報告されている。また、FGF-2 は、当研究室における臨床研究において、歯周組織欠損部位に局所投与することにより、その歯周組織再生誘導効果が確認されている成長因子である。以上のことから、歯周組織再生の場においても、間葉系幹細胞の産生する各種成長因子が歯周組織構成細胞を活性化し、細胞機能を賦活化することで、再生を促進的に制御していると推察されるが、これまで間葉系幹細胞が産生する成長因子が歯周組織構成細胞の細胞機能に影響を及ぼすか否かについては、ほとんど解析がなされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、間葉系幹細胞由来の Trophic 因子が歯周組織再生過程に及ぼす影響について検討する。すなわち、同細胞由来の Trophic 因子(特に成長因子に焦点を当てる)が、歯根膜細胞の細胞機能に及ぼす影響について解析する。なかでも、歯周組織再生誘導過程における重要な細胞機能と考え

られる増殖能・分化能に対して、同 Trophic 因子が及ぼす影響を及ぼすかについて明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ADSC 培養上清の回収

ADSC を 100 mm フィブロンectin ディッシュに播種し、培養を行い、サブコンフルエントになった時点で、10 %FCS および 60  $\mu$ g/ml KM 含有 DMEM-HG に培地交換を行い、3 日後に培養上清を回収し、これを ADSC-Conditioned Medium (以下、ADSC-CM と略す) とした。

### (2) 細胞増殖能の解析

HPDL の細胞増殖は、血球計算盤にて細胞数を計算することにより検討した。6 穴細胞培養プレートに HPDL を播種し、6 時間後に培地を吸引除去し、ADSC-CM あるいは DMEM-HG を 50 % の比率で  $\alpha$ -MEM と混和した培地にて培養し、播種後 4 日目まで毎日計測を行った。

### (3) HPDL の硬組織形成細胞への分化誘導

HPDL の硬組織形成細胞への分化誘導は、12 穴細胞培養プレートに HPDL を播種し、3 日後に 10 mM  $\beta$ -グリセロリン酸、50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸を添加した  $\alpha$ -MEM に交換し、以後 3 日ごとに培地交換することにより行った。

### (4) ADSC 培養上清中の成長因子の解析

ADSC 培養上清中の成長因子の解析は、まず Human growth factor array<sup>®</sup> を用いて、ADSC-CM 中の各成長因子のスクリーニングを行った。対照群としては、10 %FCS および 60  $\mu$ g/ml KM 含有 DMEM-HG を用いた。また、ADSC-CM 中の IGFBP6、HGF、VEGF 濃度は ELISA 法を用いて、定量的に解析を行った。

### (5) IGFBP6 siRNA の導入および培養上清の回収

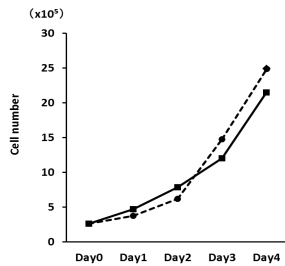
ADSC にリポトランスフェクション法により、IGFBP6 siRNA の導入を行った。Realtime-PCR 法および ELISA 法にて、IGFBP6 の発現抑制を確認した後、同条件で IGFBP6 siRNA の導入を行い、10 %FCS および 60  $\mu$ g/ml KM 含有 DMEM-HG にて 3 日間培養し、同培養上清を回収し、これを IGFBP6 siRNA transfection Conditioned Medium (以下、BP6 si-CM と略す) とした。

## 4. 研究成果

### (1) ADSC 培養上清が HPDL の細胞機能に及ぼす影響の解析

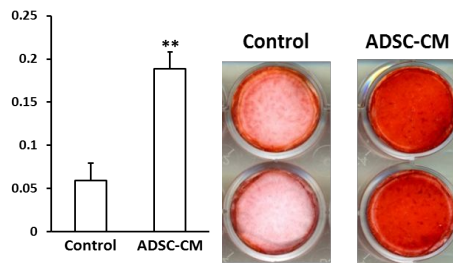
HPDL の培養培地に ADSC 培養上清を添加し、培養 4 日目までの細胞数を計測した結果、ADSC 培養上清の添加は、HPDL の増殖に顕著な影響を与えなかった (図 1)。

図 1. ADSC 培養上清が HPDL の増殖に与える影響 (Sawada K et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 より引用)



次に、HPDL を石灰化誘導時に ADSC 培養上清を添加することで、ADSC 培養上清が HPDL の硬組織形成細胞への分化に与える影響を解析した結果、ADSC-CM 添加群において、石灰化関連遺伝子発現の上昇とアルカリフォスファターゼ(ALP)活性の上昇ならびに石灰化ノジュール形成亢進が認められた(図2)。

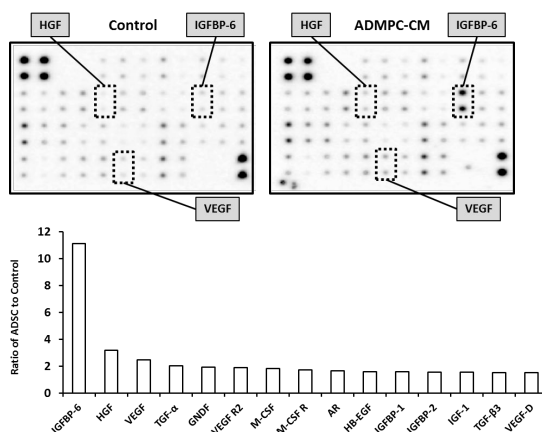
図2. ADSC 培養上清が HPDL の硬組織形成細胞への分化に与える影響 (Sawada K et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 より引用)



\*\*: $p < 0.01$  vs Control

(2) ADSC 培養上清中の成長因子の解析  
ADSC 培養上清に含まれる成長因子について Human growth factor array および ELISA 法にて解析した結果、ADSC 培養上清中に IGFBP6、HGF、VEGF が含まれることが明らかとなった(図3)。

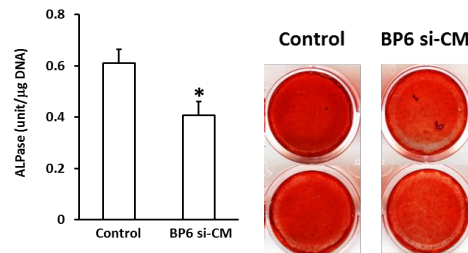
図3. ADSC 培養上清中の成長因子の解析 (Sawada K et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 より引用)



(3) ADSC 培養上清中の IGFBP6 が HPDL の細胞機能に与える影響の解析  
ADSC 培養上清中の IGFBP6 が HPDL の硬組織形成細胞への分化に影響を与えるか否かにつ

いて、HPDL の石灰化誘導時に BP6 si-CM を添加することで検討を行った結果、BP6 si-CM 群は、対照群と比較して、石灰化関連遺伝子の有意な発現低下が認められ、さらに ALPase 活性の有意な発現低下も認められた。また、アリザリン染色の結果より、石灰化ノジュール形成の抑制が認められた(図4)。

図4. ADSC 培養上清中の IGFBP6 が HPDL の細胞機能に与える影響 (Sawada K et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 より引用)



\*: $p < 0.05$  vs Control

### 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)

Keigo Sawada, Masahide Takedachi, Satomi Yamamoto, Chiaki Morimoto, Masao Ozasa, Tomoaki Iwayama, Chun Man Lee, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami: Trophic factors from adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells promote cytodifferentiation of periodontal ligament cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、464, 2015, 299-305. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.147.

[学会発表](計 3 件)

沢田 啓吾、竹立 匡秀、岩山 智明、山本 智美、森本 千晶、平井 麻絵、李 千萬、松山 晃文、大倉 華雪、佐野 夕子、野崎 剛徳、北村 正博、村上 伸也: 脂肪組織由来多系統前駆細胞の移植による新規歯周組織再生療法の開発、2016年3月17日、大阪国際会議場(大阪府 大阪市)

Keigo Sawada, Masahide Takedachi, Satomi Yamamoto, Chiaki Morimoto, Asea Hirai, Masao Ozasa, Tomoaki Iwayama, Yuko Sano, Masahiro Kitamura and Shinya Murakami: Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose-tissue derived multi-lineage progenitor cells, International Symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Diseases, 2015年12月10日、大阪大学(大阪府 吹田市)

Masahide Takedachi, Keigo Sawada,  
Satomi Yamamoto, Chiaki Morimoto, Asae  
Hirai, Masao Ozasa, Tomoaki Iwayama, Yuko  
Sano, Chun Man Lee, Hanayuki Okura,  
Akifumi Matsuyama, Masahiro Kitamura,  
Shinya Murakami: Periodontal tissue  
regeneration by transplantation of ADMPC、  
第 63 回国際歯科研究学会日本部会、2015 年  
10 月 30 日、福岡国際会議場（福岡県 福岡  
市）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

沢田 啓吾 (SAWADA, Keigo)  
大阪大学歯学部附属病院・医員  
研究者番号：70733054