

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893244

研究課題名(和文) 歯髄及び骨に生じた炎症に対するグリア細胞神経栄養因子GDNFによる制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of glial cell neurotrophic factor GDNF by the control mechanism for the inflammation that occurs in the pulp and bone

研究代表者

西藤 法子 (SAITO, NORIKO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40735099

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)： グリア細胞神経栄養因子(GDNF)を恒常的に分泌するデバイス内には遺伝子導入によってGDNFを恒常的に分泌するよう組み替えられたヒト網膜色素上皮細胞(ARPE19)を封入している。デバイスのGDNFの長期分泌はELISA法で確認した。そしてデバイスを浸漬している培地を用いて、低濃度の血清下で象牙芽細胞様細胞(KN-3細胞)を培養しTrypan Blue染色した結果、細胞生存と増殖に影響があることを確認した。

以上の結果から、GDNF分泌デバイスから分泌されたGDNFを含めた因子が細胞生存、増殖に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We report the effect of GDNF-secreting ECB device, which allows constitutive secretion of glial cell neurotrophic factor (GDNF). These devices were provided by Nsgene, which is our collaborative company. Our result of ELISA assay indicate that GDNF continued secreting it from those devices for 12 months, and it was revealed that we could maintain those devices. We found that maintenance medium that was derived from those devices raised cell viability of odontoblast like cell (KN-3 cell) under 0.1% serum.

These data suggest that GDNF-secreting ECB device are available to maintain odontoblast viability and proliferation.

研究分野：歯内療法学

キーワード：象牙芽細胞様細胞 GDNF 細胞生存 再生医学

1. 研究開始当初の背景

近年、歯髄炎や根尖性歯周炎等に対する歯内治療は、歯科用顕微鏡、コーンビームCT、及びニッケル・チタン製ファイル等の器材が登場したことで格段に進歩したと言われている。しかしながらこれらは治療手技に関する進歩であり、歯髄や根尖歯周組織に生じた「炎症の制御」については全く進歩が見られないのが現状である。歯科医師は、炎症状態を判断できず歯髄保存の可否に悩んだ時には、疼痛発症を回避し患者に苦痛を与えないようにするために抜髄を積極的に選択してしまっている。根尖性歯周炎の治療では、可及的に感染物質を除去した後は、歯科医師は貼薬を繰り返して生体の自然治癒による炎症制御を待つみの治療に終始するのがほとんどである。

一方、歯髄・根尖歯周組織の再生を目的に、iPS細胞をはじめとする再生医療研究を応用した数多くの研究が国内外で進められている。しかしながら、組織に生じた炎症を制御しなければ目的とする再生が十分に誘導できないことは明らかになっており、組織再生誘導を目指した新しい歯内治療法を開発するには、組織に生じた炎症を積極的に制御する方法を同時に開発する必要がある。

私が所属するグループでは、これまで歯髄の局所的再生誘導を目的とした研究を行ってきており、局所的に炎症制御に働く因子の探索が、歯髄・根尖歯周組織の炎症制御と、それに続く再生療法の確立に向けた重要な課題と考えている。

グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) は神経組織における強力な栄養因子として神経細胞生存・分化誘導に重要な役割を果たしていることが知られているが、神経組織以外においてもその発現が確認されている。我々は共同研究者から既にアルツハイマー

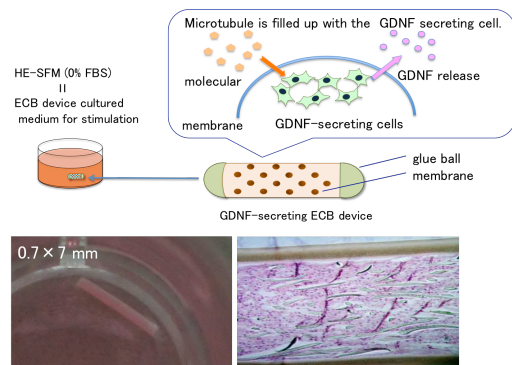
病患者の治療として臨床治験に入っている GDNF 分泌カプセルの供与を受けており、これを利用した局所的再生療法を目標として *in vitro* の実験系を行っている。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、歯髄・根尖歯周組織に生じた炎症を積極的に制御することで組織再生を効果的に誘導する治療法を確立することにある。歯の発生段階における GDNF の関与、ラット初代培養歯髄細胞や骨芽細胞の炎症応答との関与が明らかにされていることから、歯髄・根尖歯周組織の効果的な再生を誘導するための炎症制御物質として GDNF 分泌カプセルを応用するための研究を *in vitro* 及び *in vivo* 実験系で行い解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)各 GDNF 分泌カプセルは 24 well tissue culture plates に一本ずつ静置し、1 ml の無血清 Human Endothelial SFM (HE-SFM, Invitrogen) を入れて 5 % CO₂, 37°C で管理した。培地は毎週交換した。各カプセルを一定期間浸漬した培地の GDNF の分泌の確認を ELISA 法によって経時的に確認した。

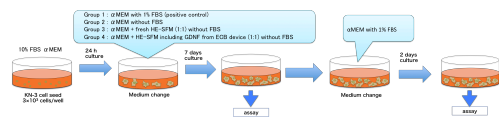


(2)刺激に使用する象牙芽細胞様細胞 (KN-3細胞)はラット歯髄由来の株化細胞であり、アルカリフォスファターゼ活性も有している細胞である。KN-3細胞の培養、細胞播種

および付着は 10 %FBS 含有 α -MEM 培地で行った。24 時間付着させた後、無血清の刺激培地で、KN-3 細胞を 7 日間培養した。ポジティブコントロールとして 1 %FBS 含有 α -MEM 培地 (Group1) で培養し、ネガティブコントロールとして 0 %FBS α -MEM 培地のみ (Group2) での刺激、また 0 %FBS α -MEM 培地に無血清 Human Endothelial SFM (HE-SFM, Invitrogen) を等量加えた培地 (Group3) で培養した。そして、0 %FBS α -MEM 培地にカプセルを浸漬した培地を等量加えた培地 (Group4) で刺激を行った。刺激期間中は 2 日間おきに培地交換を行った。

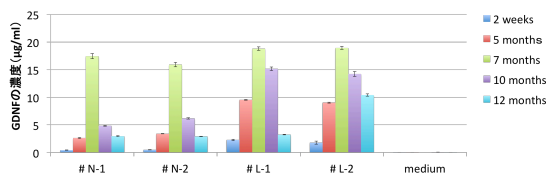
培養後の細胞の死細胞をトリパンブルー染色で検出し、総細胞数と生存細胞数を算出した。

(3) 生存細胞の回復能を検討するため、(2)と同様に KN-3 細胞を 7 日間無血清状態で培養した後、2 日間 1 %FBS 含有培地で培養した。その後 KN-3 細胞増殖状態を確認した。



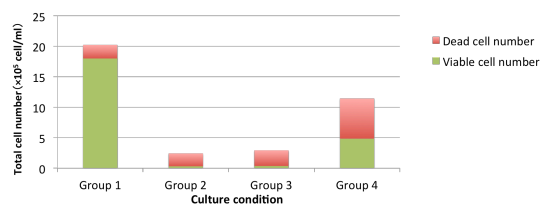
4. 研究成果

(1) 各カプセルを一定期間浸漬した培地への GDNF の持続的分泌を ELISA 法によって経時的に確認した。その結果、12 ヶ月以上カプセルから GDNF 分泌が持続していることを確認した。

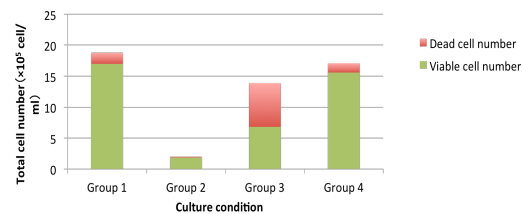


(2) カプセルから産出した GDNF の効果を検討するため、浸漬培地を用いて KN-3 細胞の細胞生存・増殖への影響を検討することと

した。無血清下の環境で、カプセルから分泌された GDNF を含む Human Endothelial SFM 培地を、無血清の α -MEM 培地に添加し、ラット象牙芽細胞様細胞 (KN-3 細胞) を 7 日間培養した。培養後の細胞に対してトリパンブルー染色を用いて、死細胞数を検出した結果、GDNF 分泌カプセルの浸漬培地で刺激した Group4 では、浸漬培地の非存在下・無血清下で培養した細胞と比較して明らかに細胞生存率が高いことが認められた。



(3) 7 日間各刺激培地で培養した後、生存細胞の増殖能を検討するため 1% FBS 含有培地に戻した結果、カプセルの浸漬培地で刺激した後の細胞はポジティブコントロール同様まで細胞増殖してすることが確認できた。この結果から、刺激後生存していた細胞は増殖能を十分有していることが示唆された。



以上より、カプセルから分泌された GDNF を含めた因子が象牙芽細胞様細胞の生存維持と細胞増殖能を有していることを示唆された。

しかしながら今回の結果は、カプセルから分泌された GDNF のみに起因しているかは不明である。そのため、今後は GDNF を分泌しないコントロールカプセルやカプセル内に封入されている株化細胞を使用して検討していくことを予定している。

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)

[学会発表] (計3件)

①西藤法子, 諸富孝彦, 鷺尾絢子, 花田可緒理, 平田-土屋志津, Wahlberg Lars, Emerich Dwaine, 北村知昭: Effects of GDNF-secreting Device on the Viability of Odontoblast-like Cells. 特定比営利活動法人 日本歯科保存学会 2015年度春季学術大会 (第142回), 北九州市 (6月25日, 26日), 2015.

②西藤法子, 諸富孝彦, 鷺尾絢子, 平田-土屋志津, 北村知昭: カプセル化された細胞から分泌されるグリア細胞神経栄養因子の効果. 第13回 日本再生歯科医学会学術大会・総会, 新潟県 (8月29日), 2015.

③西藤法子, 諸富孝彦, 鷺尾絢子, 平田-土屋志津, 北村知昭: カプセル化細胞から分泌された GDNF の象牙芽細胞様細胞生存能及びその影響. 第37回 日本バイオマテリアル学会大会, 京都府 (11月9日, 10日) 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西藤 法子 (SAITO NORIKO)

九州歯科大学・歯学部歯学科・助教

研究者番号: 40735099

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: