

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05029

研究課題名(和文) 未分化間葉系幹細胞を用いた力を起因とする歯科疾患の超早期自律診断と予防治療の開発

研究課題名(英文) Autonomous diagnosis and preventive treatment of force-induced dental disease using mesenchymal stem cell

研究代表者

鮎川 保則 (AYUKAWA, Yasunori)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：50304697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は未分化間葉系幹細胞(MSC)を歯周病、インプラント周囲炎の超早期の診断および一次治療に利用することを目標とした。その結果、MSCを全身投与すると、健全天然歯周囲には集積しないが、炎症がある天然歯周囲に集積することや、インプラント周囲には明らかな炎症が見られなくてもMSCが集積することが確認された。抗菌、抗炎症能をもつディフェンシンはインプラント材料に吸着することが確認され、MSCからディフェンシンを分泌させることができれば局所での炎症治療に使用できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病やインプラント周囲炎は細菌感染と力の相互作用により病態が悪化していくことが広く知られている。これらの治療のスタートは、多くの場合患者あるいは医師が疾患に気づいてから開始されることが多いが、そのきっかけは出血、X線像など視覚に頼ったものか、患者の自覚によるものであり、より早期の診断が求められている。本研究では、炎症部位に速やかに集積する能力をもつ未分化間葉系幹細胞を超早期の診断および一次治療に利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to employ mesenchymal stem cells (MSCs) for the diagnosis and treatment of periodontitis and peri-implantitis. As a result, after the systemic administration, MSCs accumulated around the teeth with inflammation. MSCs also accumulated around the titanium implant, regardless of the presence or absence of the inflammation around the implant. Beta-defensin, which has anti-inflammation and antibacterial characteristics, could adsorb onto some kinds of implant material. These results suggest the possibility of in situ inflammation treatment by MSCs if they can secrete beta-defensin.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：未分化間葉細胞 バイオメカニクス 歯科補綴学

1. 研究開始当初の背景

インプラントは 50 年余の歴史をへて、歯科治療の中でも最も成功率の高い治療の一つになったといえる。インプラントは一度オッセオインテグレーションを獲得すると長期に安定的に機能する一方、インプラント周囲炎で喪失するケースも散見する。過去の研究では、患者の約 20% がインプラント周囲炎を発症しているとされている (Atieh ら 2012, Mombelli ら 2012)。



インプラント周囲炎の一例

インプラント周囲炎は患者の自覚的な訴えがあった場合は病態が進行していることが多く、医師が発見した場合でも、X線による骨破壊や出血・排膿がきっかけのことが多く、病態としては進行した状態で見つけられることが多い。しかも、特に前歯においては唇側の骨の吸収を来すケースが多いとされているが、右図のような骨吸収状態では、ある程度進行した病変でさえ、口内法やパノラマX線写真では診断が容易ではなく、CTによる診断はアーチファクトの多さや被曝の問題による困難さがある。特に近年のインプラントは最上部まで粗造面を有するものが多く、一度表面が汚染されると清浄化が困難であるため、できるだけ早期の発見が望ましいことは論をまたない。

これまでに我々が研究に取り組んでいる MSC は、右表に示すような種々の特色がある。なかでも 3 は他の幹細胞にない独特な特徴であり、全身投与から炎症局所に集積した MSC は局所の免疫能を調整していると考えられる。本研究では、力学的不利な状況に置かれている歯やインプラント周囲に対しては、感染による炎症増悪状態になる以前に、全身投与した MSC が速やかに集積することが考えられる。

MSC の特徴：

1. 種々の細胞に分化可能
2. 患者自身から得られ増殖能が高い
3. **全身投与にて炎症部位に集積するホーミング能 (Khakoo ら、2006)**

本研究では、ディフェンシンという分泌タンパクに注目して研究を進める。36 アミノ酸残基からなり、正電荷を有するこのタンパクは細菌の細胞膜に結合し、細胞膜に欠損 (孔) を作ることによる抗菌性を有している (Gursoy & Kononen, 2012)。歯周組織における役割としては、局所における感染防御を担っていると考えられる。また、免疫系に働きかけることによる抗炎症能をも有する (Yang ら、1999)。一方、低分化状態にある (歯の周囲の) 接合上皮やインプラント周囲上皮ではディフェンシンの発現はないかあっても弱く、これらによる防御機構はあまり期待できないと考えられている (安彦ら、2010; Shimono ら、2003)。

2. 研究の目的

本研究は、MSC の炎症局所へのホーミング能と、ディフェンシンの抗菌性を組み合わせた、新たな発想の、力を起因とする歯科疾患治療に対する超早期診断および一次治療法を開発することを目的とする。具体的には、ディフェンシンの遺伝子を導入した MSC を樹立し、全身投与することで、1. 疾患局所に集積した MSC がディフェンシンを産生するため、歯肉溝滲出液中のディフェンシンを計測することにより、MSC の集積の有無、つまり局所における疾患の有無を判断する診断系を確立すること、および 2. 局所で MSC が多量に産生したディフェンシンが炎症局所の一次治療を行う可能性について検討する。解明すべき点と本研究で取り組む点について簡潔に記載する。

本研究の学術的な特色・独創的な点として、まず MSC の最も広く知られている多分化能ではなく、疾患局所へのホーミング能および局所における治癒能に着目した点が特徴的である。その上で、MSC の局所集積状態を、標本作製などを避け非侵襲的に観察する目的で、歯肉溝滲出液を測定することとし、MSC にディフェンシンを過剰発現させ、それを測定する系を検討することとした点も独創的といえる。このディフェンシンは抗菌能、抗炎症能を有するため、炎症局所での治療的効果も期待できる上、正に荷電したタンパクであるため、インプラント表面への吸着および局所における長期の治癒効果も期待できる。そもそもこのタンパクは口腔粘膜で感染防御の一端を担っているタンパクであるため、口腔内に分泌されても安全性の点で問題がないところも優れた点である。

また、前述のようにインプラント周囲炎は、1. 疾患を医師が認知した時点である程度進行しているケースが多いこと、2. 感染が起こる前の力学的負荷の増大のみのときは客観的に診断する方法がないこと、3. 力学的に適正な状態 (咬合) であるかは、咬合紙や咬合診断装置を用いたマクロな方法しかないことが問題である。本研究の成果は、このような場合にも客観的

かつ鋭敏な評価方法を提供できる可能性がある。

本研究から予想される結果と意義として、本研究は、歯やインプラント周囲に起こりうる疾患を超早期に診断し、かつ同時に治療を開始できる可能性があること、前段で触れたように、感染はまだ起こっていないが力学的に問題がある状態を客観的かつ鋭敏に診断可能であることが特色である。これは、今後の歯科治療の進歩に大きな寄与を果たすと考えている。

3. 研究の方法

(概要)

力学的負荷が原因、あるいは増悪因子となる歯科疾患（歯周病、インプラント周囲炎）に対し、炎症局所に集積する性質がある MSC を全身投与し、局所に集積する様子を観察することによって自覚的、多角的炎症所見が現れる前の超早期の診断法の確立および疾患局所に集積した MSC から抗菌・抗炎症作用をもつタンパクを分泌させることによる一次的治療の可能性を模索する。具体的には ディフェンシンの遺伝子を導入した MSC を作製し、全身投与することによって力学的負荷が過剰に作用した部位に集積するか、簡便な歯肉溝滲出液測定法で超早期の診断が可能であるかを検討する。この計画を達成するために、組織（形態計測）学的手法、分子生物学的手法、生体工学的手法を用いる。

(方法)

< ディフェンシンのインプラント材料に対する吸着挙動の確認 >

抗菌・抗炎症作用 ディフェンシンを各種インプラント材料（上部構造材料）に吸着させることが可能であれば、インプラント周囲において感染に対する抵抗を示すことが期待できる。本実験では、ディフェンシン水溶液に一定時間チタン、ジルコニア、および陶材を浸漬し、その後抗ディフェンシン抗体と蛍光標識二次抗体を用いて蛍光強度測定によるディフェンシンの吸着量の差異を検討する。

< ディフェンシン遺伝子導入 MSC の作製 >

ラットから採取した骨髄細胞より、MSC を樹立する（既報）。樹立した MSC に対し、エレクトロポレーション法を用いてディフェンシン遺伝子を導入する。MSC はその後骨芽細胞、線維芽細胞、上皮細胞に分化させ、MSC そのもの、あるいは分化した細胞がディフェンシンの遺伝子発現やタンパク合成を行っているか RT-PCR 法や ELISA 法を用いて確認する。

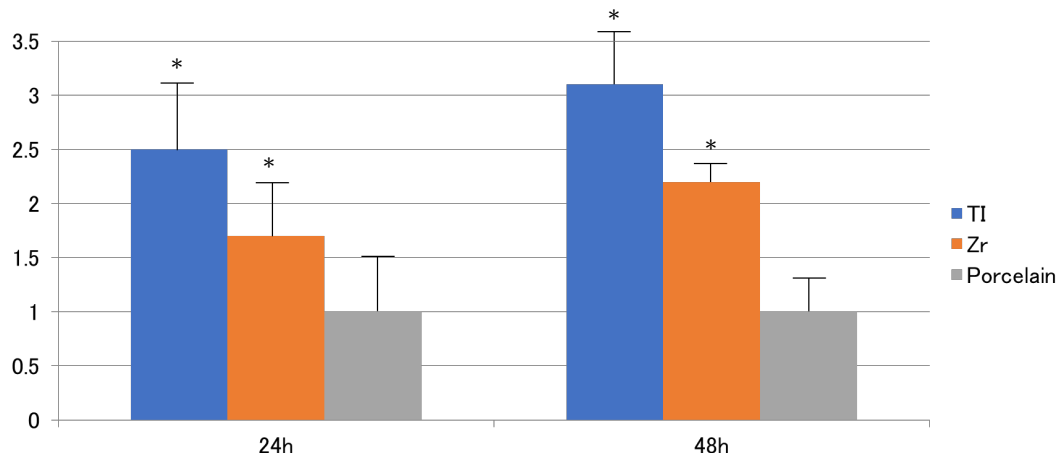
< 天然歯・インプラント周囲に力学的負荷を作用させた際の MSC の集積に関する検討 >

ラット臼歯にコンポジットレジンで咬合の過高状態を呈したモデルを作成する。あるいはラット脛骨にチタンインプラントを埋入し、インプラントに応力負荷装置を用いて過剰な応力を負荷する。それらの動物モデルに、ラット尾静脈から GFP で標識した MSC を投与する。比較対照（過高でないラット臼歯、あるいは過剰な応力を負荷させていない脛骨埋入チタンインプラント）周囲と実験群において、MSC の集積程度の差異が生じるかを観察する。

4. 研究成果

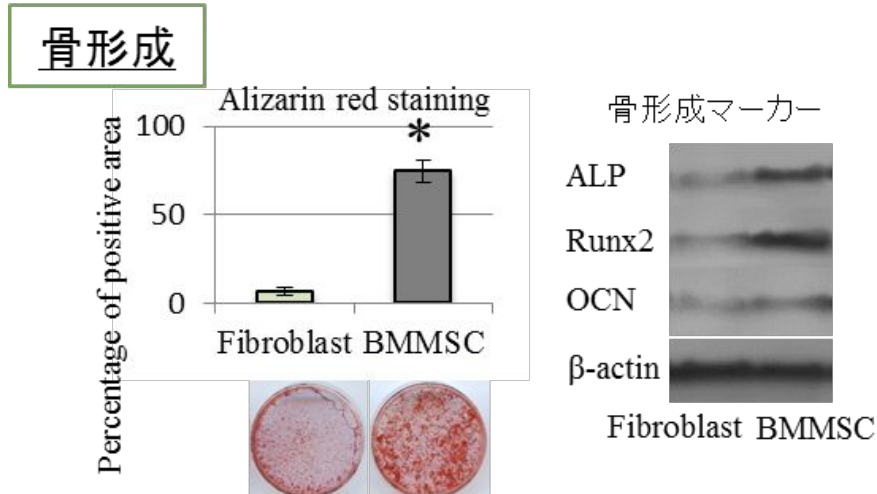
< ディフェンシンのインプラント材料に対する吸着挙動の確認 >

ディフェンシンを PBS に溶解し、純チタン、ジルコニア、陶材のプレートを溶液に浸漬した。24 または 48 時間後にプレートをとり出し、抗ディフェンシン抗体および FITC 標識二次抗体を作用させた。蛍光強度はマイクロプレートリーダー（Tecan Infinite 200Pro）で計測した。

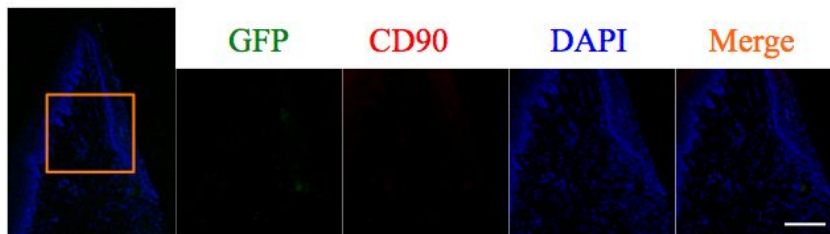


陶材（Porcelain）を 1 とした場合の蛍光強度の相対値 * : $P < 0.05$ (vs Porcelain)
Ti は Porcelain より 24 時間、48 時間いずれも高い蛍光強度を示した。

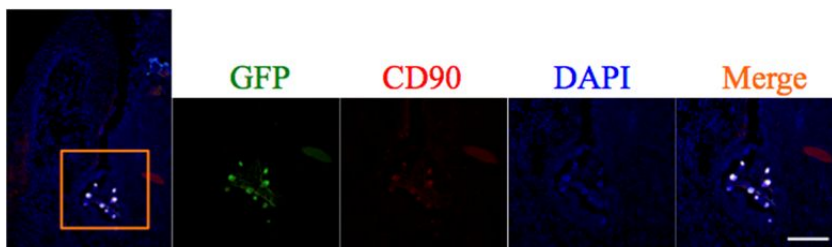
<天然歯・インプラント周囲に力学的負荷を作用させた際の MSC の集積に関する検討>



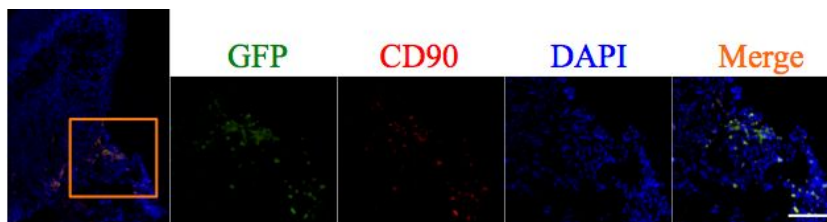
MSC に骨芽細胞へ分化するように誘導をかけたところ、図のように骨芽細胞に特有のマーカーが発現し、また硬組織を形成した。



GFP で標識した MSC をラット尾静脈に投与したが、MSC は健全天然歯周囲には集積しなかった。



一方で、負荷を作用させた天然歯の周囲には MSC が集積することが確認された。



インプラント周囲には、力学的負荷の有無にかかわらず MSC が集積することが確認された。これはインプラント周囲が常に若干の炎症状態にあることを示していると考えられる。

< ディフェンシン遺伝子導入 MSC の作製 >

エレクトロポレーション法を用いて ディフェンシン遺伝子の MSC への導入を試みたが、RT-PCR 法や ELISA 法で MSC による ディフェンシンの発現、産生を確認することはできなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：熱田 生

ローマ字氏名：(ATSUTA, iki ru)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 30423487

研究分担者氏名：古谷野 潔

ローマ字氏名：(KOYANO, kiyoshi)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学院歯学研究院

職名：教授

研究者番号(8桁): 50195872

研究分担者氏名：荻野 洋一郎

ローマ字氏名：(OGINO, yoichiro)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学院歯学研究院

職名：講師

研究者番号(8桁): 50380431

研究分担者氏名：松崎 達哉

ローマ字氏名：(MATSUZAKI, tatsuya)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 70736694