

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04392

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の機能低下から見た歯周病やインプラント周囲炎発症の新規理解と対策

研究課題名(英文) Understanding of periodontal disease and peri-implantitis with stem cell disfunction

研究代表者

秋山 謙太郎 (AKIYAMA, Kentaro)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：70423291

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、骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)の機能が、宿主の加齢変化によってどのように影響を受けるのかを解明するとともに、MSCsの機能低下が、歯周病やインプラント周囲炎などの歯周組織における感染性・炎症性疾患の発症や病状の進行にどのように関与するのかを解明することを目的としている。その結果、週齢の異なるマウスに実験的歯周病を誘導すると、週齢が上がるに連れて、歯周病による骨吸収が進行した。そこで、5週、50週齢マウス由来MSCsの機能を分析したところ、50週齢では細胞増殖、骨芽細胞分化能力が明らかに低下する一方で、脂肪細胞への分化能力が亢進するとともに、免疫調節能の低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究の成果は、宿主の加齢によりMSCs機能の低下、特に、骨芽細胞分化能と免疫調整機能の低下は、炎症性疾患に対する、抵抗力ならびに組織再生力の低下を意味し、病態の形成、進行に大きく影響することを明らかにした。MSCs機能低下をもたらす詳細なメカニズムはさらなる検討が必要ではあるものの、MSCs機能の低下を阻止することで疾患の重症化に歯止めをかける新規治療法開発につながる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated how the bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) function is affected by host aging. And then, how the suppressed MSCs function contributes to the development of inflammatory diseases in periodontal tissues such as periodontal disease and peri-implantitis. As a result, in the experimentally induced periodontal disease model mice, increased bone resorption was observed in aged mice. Moreover, the function of MSCs derived from 50-week-old mice showed lower cell proliferation and osteoblast differentiation ability with higher adipocyte differentiation ability. More interestingly, MSCs from aged mice showed decreased immunoregulatory capacity.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：再生医療 間葉系幹細胞 加齢

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

補綴装置が長期間機能するためには、歯周病やインプラント周囲炎による顎骨の破壊を未然に予測し、それを阻止することが肝要である。これまで、歯周病やインプラント周囲炎の発症は、攻撃因子(細菌感染、メカニカルストレス等)が生体の防御機能を上回った際に発症するというホスト・パラサイト相互作用モデルにより理解されて来たが、生体の防御機能の本質については、老化や一部の薬剤性、遺伝性等の免疫異常が関わることを除いては、十分解明されていない。

これまでも、歯周病やインプラント周囲炎の病態拡大においては、自己免疫反応が関与することが知られてきた。我々は、自己免疫疾患の一つである強皮症モデルマウスにおいて、深刻な骨粗鬆症を発症するだけでなく、疾患マウス由来間葉系幹細胞(MSCs)は、骨芽細胞分化能が顕著に低下すること(Chen and Akiyama et al., 2014)や、全身性エリテマトーデス患者や全身性強皮症患者から採取した MSCs が、健常者由来の MSCs と比較して、その分化能や免疫調節能が明らかに低下していること(Sun and Akiyama et al., 2009, Akiyama and Chen et al., 2012)などを明らかにしてきた。つまり、自己免疫疾患の要素を持つ歯周病やインプラント周囲炎の発症や悪化においては、ホスト MSCs の分化能や免疫調節能の低下が関与する可能性が十分に考えられる。

ところで、この MSCs の機能低下を引き起こす重要な因子の一つとして、宿主の老化があげられている(Kretlow et al., 2008, Wilson et al., 2010, Zaim et al., 2011)。すなわち、老化による MSCs 機能低下は、骨芽細胞分化や免疫調節能の低下を介して、歯周病やインプラント周囲炎の歯槽骨破壊に繋がる可能性がある。これが正しいとすると、歯周病やインプラント周囲炎への対応は、これまでの細菌学、遺伝学的なものに加えて、MSCs を中心にしたホストの機能保全へと歴史的な転換点を迎えることになる。

2. 研究の目的

本申請研究では、歯周病やインプラント周囲炎の病態形成・進行を、老化に関連した間葉系幹細胞の機能低下に着目して理解し、その解決策を開発する。すなわち、**①老化が、間葉系幹細胞の分化や免疫調節能に及ぼす影響**、またそのメカニズムを明らかにする、**②老齢マウスに、若齢マウス由来間葉系幹細胞を移植することにより、歯周病やインプラント周囲炎の発症・進行を抑制できるかどうかを検討する**。さらに、**③間葉系幹細胞の機能の賦活化を図ることで、老齢になっても歯周病やインプラント周囲炎の発症や進行を抑制できる方法を開発すること**を目的とする。

3. 研究の方法

(1)老化が MSCs 機能の低下に及ぼす影響を明らかにする。

週齢の異なるマウス(C57BL/6, 5週 vs 50週)の骨髄由来 MSCs の機能を比較する。
コロニー形成能, 表面抗原発現, 多分化能, 免疫調節能。

(2)歯周病の病態形成が、宿所の加齢によって影響されるか検討する。

週齢の異なるマウス(C57BL/6, 5週 vs 50週)において、実験的歯周病を誘導し、歯槽骨破壊などの病態形成を比較検討する。

また、若齢マウス由来 MSCs を全身性に移植することで、歯槽骨破壊の進行具合が変化するか検討する。

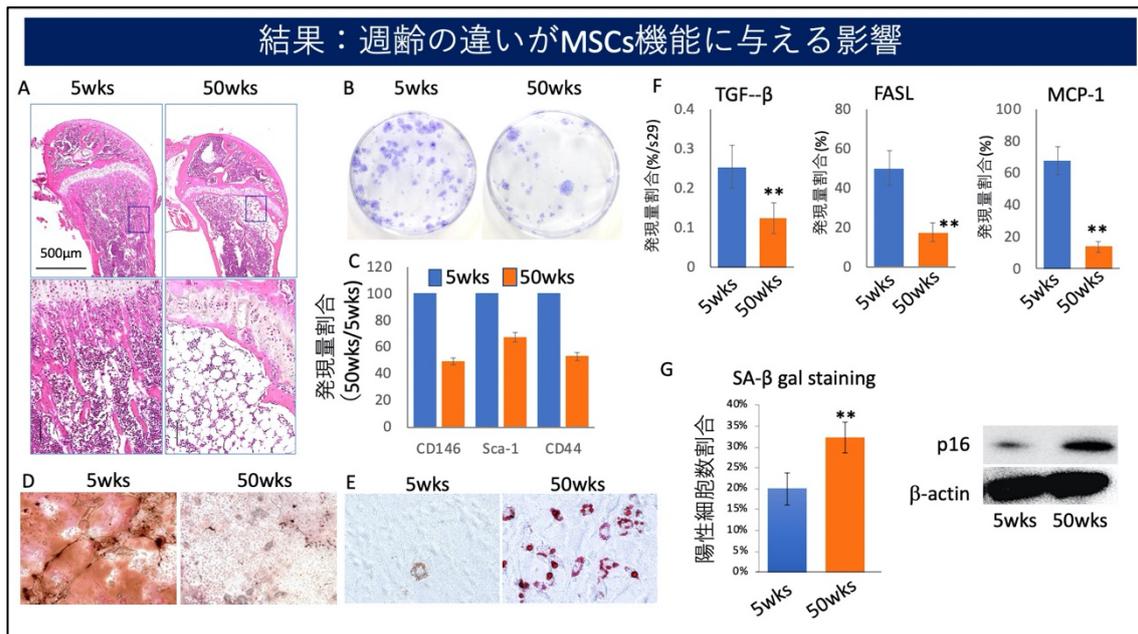
(3)老化による MSCs 機能低下をもたらす因子を探索する。

上記で得られた結果をもとに、骨髄中のどのような因子が MSCs 機能に影響を及ぼすのかについて、網羅的に比較検討する。

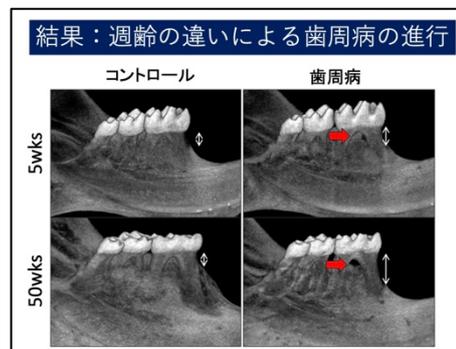
4. 研究成果

(1) 週齢の異なるマウスの比較として、まず、大腿骨の組織学的検討を行ったところ、50週齢では骨梁の著しい低下と、骨髄の脂肪組織化が顕著に観察された。(結果図 A)。それぞれの週齢由来 MSCs の具体的な機能について評価したところ、幹細胞の自己複製能の評価方法の一つとして用いられるコロニー形成能が低下し(結果図 B)、幹細胞性を示す細胞表面抗原の発現が明らかに低下していた(結果図 C)。さらに、多分化能については、50週齢 MSCs において、骨芽細胞分化能が低下する一方で、脂肪細胞分化能が大きく上昇していた(結果図 D および E)。免疫調節能の評価として発現を検討した TGF- β , FASL, MCP-1 はいずれも 50週齢 MSCs で低下してい

ることがわかった（結果図 F）. 老化関連として、50 週齢 MSCs では SA- β Gal 染色陽性細胞割合が増加し、p-16 の発現も上昇していた（結果図 G）. これらの結果から、宿主の加齢によって、ホスト MSCs は、脂肪分化しやすいものの、それ以外の自己複製能、骨芽細胞分化能、免疫調節能が低下しており、細胞老化していることが明らかとなった.



(2) 週齢の異なるマウスにおいて実験的歯周病を誘導した場合、5 週齢と比較して 50 週齢で著明な歯槽骨破壊の進行が観察された。また、大変興味深いことに、50 週齢では、歯根周囲の間葉系幹細胞マーカー (PDGFR α) 陽性細胞が減少しており、歯周病を誘導した場合においても、5 週齢と比較して、MSCs の集積は低かった。これに呼応するように、5 週齢では炎症性の T 細胞浸潤は、50 週齢と比較して少なく、破骨細胞の形成も少ない像が組織学的観察で明らかになった。さらに、50 週齢マウス歯周病モデルに、5 週齢由来 MSCs を尾静脈より全身性に移植すると、歯槽骨破壊が抑制された結果となった。



(3) 老化による MSCs 機能低下をもたらす候補因子群の探索として、骨髄中で発現しているタンパク質の網羅的比較を実施した (iTRAQ) . その結果、総タンパク質として 2413 のタンパク質が検出され、5 週齢、50 週齢共に発現しており、発現の倍数変化が 1.2 倍より大きいもしくは 0.8 倍より小さいもので、発現量に有意な差を認めたタンパク質として 27 タンパク質を同定した。このうち、50 週齢で発現が減少しているものが 16、逆に発現が上昇しているものが 11 であった。

以上の結果から、宿主の加齢によって MSCs の多くの機能が低下し、特に免疫調節能の低下は、歯周病による炎症性細胞の浸潤を阻止することができず、その結果、破骨細胞の形成・活性化による歯槽骨破壊を招いた可能性が考えられる。さらには、骨芽細胞分化能が低下しているため、骨芽細胞/破骨細胞の骨代謝バランスも崩壊し、一掃の骨破壊進行プロセスを辿った可能性が考えられる。このことは、MSCs 機能が低下している 50 週齢に 5 週齢 MSCs を移植し、機能の低下していない MSCs の供給により、病態の形成進行を抑制できた事実からも裏付けられる。しかしながら、加齢による MSCs 機能の低下メカニズムの詳細は解明に至らず、ニッチを形成する骨髄由来タンパク質の網羅的解析によって得られた 27 タンパク質の機能を詳細に検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kyaw Thu Aung, Kentaro Akiyama, Kenji Maekawa, Takuo Kuboki.
2. 発表標題 Comparison of bone defects and mesenchymal stem cells population in ligature induced young and old aged periodontitis mice models
3. 学会等名 JADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kyaw thu Aung, Kentaro Akiyama, Kenji Maekawa, Takuo Kuboki
2. 発表標題 Older periodontitis model mice showed severer bone defects and sparse mesenchymal stem cells distribution in the periodontal defects.
3. 学会等名 JADR (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	窪木 拓男 (KUBOKI Takuo) (00225195)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	大島 正充 (OSHIMA Masamitsu) (00548307)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	大野 充昭 (ONO Mitsuaki) (60613156)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301)	
研究 協力者	宝田 剛志 (TAKARADA Takesi)		
研究 協力者	内田 健太 (UCHIBE Kenta)		
研究 協力者	原 エミリオ サトシ (Hara Emilio Satoshi)		