

令和元年5月15日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06897

研究課題名(和文) 軟骨誘導をほどこした間葉系幹細胞集塊による新規歯周組織再生療法開発

研究課題名(英文) Development of new periodontal tissue regeneration therapy using cartilage induced clumps of mesenchymal stem cells

研究代表者

竹脇 学 (Takewaki, Manabu)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：10805633

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)：申請者はC-MS Cに軟骨誘導を施した間葉系幹細胞(MSCs)と細胞自身が産生する細胞外基質(ECM)からなる間葉系幹細胞集塊Clumps of MSCs/ECM complex (C-MS C)がII型コラーゲンやプロテオグリカンをおもなECMとすることを確認した。さらに、軟骨分化C-MS Cを大規模歯周組織欠損であるビーグル犬根分岐部III級欠損モデルに移植し、歯周組織再生を促進することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、軟骨内骨化の様式による骨再生能を発揮する軟骨分化C-MS Cの作成が可能であることが示唆された。さらに、その軟骨分化C-MS Cの移植が、ビーグル犬根分岐部III級欠損モデルに対して効果的な組織再生を促進することが示唆された。本研究が発展し、軟骨内骨化を発揮できる軟骨C-MS Cが樹立された場合、骨再生のみならず、意図した位置での骨造成にも応用出来ると言える。例えば、C-MS Cを移植することで骨造成し、インプラント治療を行うことや、骨形成不全患者に対しても効果的な治療法となりうる。すなわち、本研究は歯周治療のみならず、歯学・医学の幅広い領域に応用可能な細胞治療法開発であるといえる。

研究成果の概要(英文)：C-MS C consists of mesenchymal stem cells (MSCs) and extracellular matrix (ECM) produced by themselves. The applicant has confirmed that C-MS C subjected to cartilage differentiation induction contains type II collagen and proteoglycan. Furthermore, it was confirmed that cartilage differentiation C-MS Cs were transplanted to a large-scale periodontal tissue defect model Beagle canal root bifurcation class III defect model to promote periodontal tissue regeneration.

研究分野：再生医療

キーワード：歯周病 組織再生 再生医療 骨再生 軟骨誘導 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、細菌感染と宿主の免疫応答の結果生じる炎症性組織破壊疾患である。その歯周組織欠損に対して、GTR法やエムドゲイン、もしくはFGFの投与といった組織に内在する細胞を利用した歯周組織再生療法が臨床の場において行われている。しかし、これらの方法は広範囲に及ぶ水平性の骨欠損に対しては、残存する細胞数・機能が不足するため有効ではない。このような治療困難な大規模歯周組織欠損に対して、体外から多分化能を有した細胞を大量に供給する細胞治療法の開発が進められており、特に間葉系幹細胞(MSCs)を利用した研究が注目を集めている。申請者は、この水平性大規模骨欠損に対する組織再生療法のために、**MSCs自身が産生するI型コラーゲン(Type I col)を中心とした細胞外基質を利用して三次元人工細胞集塊 Clumps of MSCs (C-MSC)を作成した(図1A)。C-MSCは、人工足場材料を必要とせずに欠損部に直接移植し細胞をとどまらせることが可能で、特に in vitroで骨分化誘導を施したC-MSC(石灰化C-MSC)が効果的な骨再生を促進することを明らかにした(Kittaka et al., 2015 Cytotherapy; ; 図1B)。さらに、ビーグル犬根分岐部III級欠損に対しても同様に、C-MSCおよび石灰化C-MSCの移植が歯周組織再生を促進することを申請者は見出している(Takewaki et al., 2017 J Dent Res.; ; 図1C)。**

しかしながら、より重篤なクリティカルモデルであるビーグル犬1壁性歯周組織欠損モデルにおいては、C-MSC、石灰

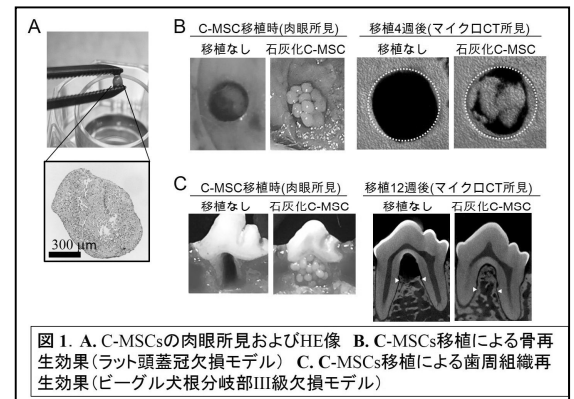
化C-MSCいずれの移植も、十分な骨再生効果が得られず、軟組織である歯肉組織形成のみにとどまった(未発表データ:後述、図4)。C-MSCによる骨再生のメカニズムは、自身が骨芽細胞に分化しながら、移植先でのI型コラーゲンを主とする結合組織中に石灰化物を沈着させながら骨形成を行う膜性骨化の様式であると考えられている。したがって、このビーグル犬1壁性歯周組織欠損モデルにおける大規模な欠損部では、結合組織が石灰化するより早くI型コラーゲンを足場に歯肉組織が形成されてしまったことや、栄養供給不足のため移植された細胞の機能が発揮されにくく、骨組織再生が誘導されなかったものと考えられる。

一方、近年、軟骨分化誘導を施したMSCsの移植が、軟骨内骨化の様式を経て骨形成・骨再生を生じるという報告がなされている(Scotti et al., 2013 Proc Natl Acad Sci USA, Harada et al., 2014 Biomaterials)。

軟骨内骨化とは、まず、MSCsから分化した軟骨細胞が肥大軟骨へと成長しながら軟骨基質を形成する。この軟骨基質表面に骨芽細胞が出現し、破骨細胞と協調してその軟骨基質を骨へと置換していく。申請者はこの軟骨内骨化のメカニズムを応用すれば、大規模歯周組織欠損部において、歯肉組織の侵入を防ぎ、確実に骨再生が得られると考えた。また軟骨細胞は極めて低栄養状態に強い細胞である点も大規模欠損に移植される細胞として適しているといえる。すなわち、大規模歯周組織欠損に対して、軟骨誘導を施されたC-MSC(軟骨分化C-MSC)の移植が軟骨内骨化の様式を経て、歯肉組織の侵入を防ぎながら効果的な骨再生を促進できると仮説をたて、本研究を着想するに至った。

### 研究期間内に明らかにすること

- 1) 移植先で軟骨内骨化を生じる軟骨分化C-MSCの誘導法を確立する
- 2) 軟骨分化C-MSCの骨再生能および歯周組織再生能を明らかにする



## 2. 研究の目的

申請者の研究室では、間葉系幹細胞(MSCs)と細胞自身が産生する細胞外基質(ECM)を用いて間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex (C-MSC)を樹立した。C-MSCは三次元的な細胞集塊であるため、人工足場材料を必要とせず欠損部に移植可能で、ビーグル犬根分岐部 III 級欠損モデルにおいて効果的な歯周組織再生を促進する。しかし、実際の臨床で遭遇する、より重篤な歯周組織破壊に対しては確実な歯周組織再生が得られるかは不明である。

一方、軟骨誘導を経た MSCs の移植が極めて強い骨形成能を発揮することが近年明らかになりつつある。そこで、本申請書では、C-MSC に軟骨誘導を施し、これを大規模歯周組織欠損に移植することで、歯周組織再生を達成する新規細胞治療法を樹立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (概要)

本研究の目的は、軟骨誘導をほどこした C-MSC を利用して大規模歯周組織欠損に対する新規細胞療法を確立することである。そこで、研究計画として以下の実験を行う。

1) F344 ラット由来 C-MSC を軟骨誘導培地にて培養し、軟骨分化 C-MSC を作成する。これをラット頭蓋冠欠損部およびラット皮下組織に移植し、骨形成能を解析する。

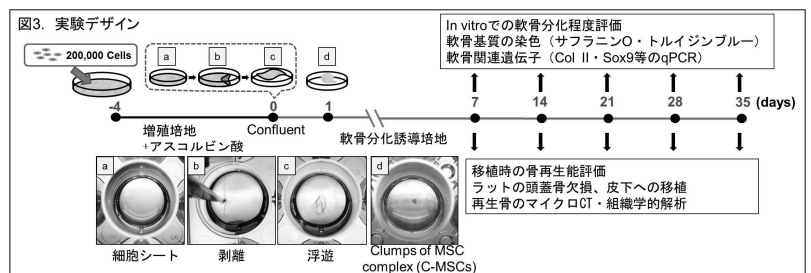
2) 上記検討で、最も効果的な骨形成能を発揮した軟骨分化 C-MSC と同様の培養条件にてビーグル犬由来軟骨分化 C-MSC を作成する。これをビーグル犬 1 壁性歯周組織欠損モデルに移植し、その歯周組織再生効果を評価する。

### 1) 骨再生に最適な軟骨分化 C-MSC の誘導条件の検討 (図3 参照)

F344 ラット大腿骨から分離した MSC を、24well プレートに播種し、50 µg/ml のアスコルビン酸含有の増殖培地にて4日間培養する。十分に細胞外基質を産生させ、剥離、浮遊させる。浮遊した MSCs/ECM 複合体をさらに増殖培地にて培養することによって、幹細胞集塊 C-MSC が得られる(図 3A)。得られた C-MSC を軟骨分化培地(Pittenger et al., 1999, Science)にて7, 14, 21, 28, 35 日間培養し、その分化程度を in vitro にて以下に記す項目で評価する。

- a) 軟骨分化マーカー遺伝子 Sox9, Aggrecan, Type II col mRNA 発現の変化を qPCR で定量
- b) 軟骨基質の産生パターンを HE 染色、サフラニン O 染色、トルイジンブルー染色、および Type II col の免疫染色によって観察する。

さらに、上記各培養期間で得られた軟骨分化 C-MSC をラット頭蓋冠欠損部(直径 4mm のクリティカルモデル)およびラット皮下組織に移植し骨再生・形成能とその過程を確認する。すなわち、骨形成量をマイクロ CT および HE 染色にて評価し、その形成過程が軟骨内骨化の様式を経ていくかを確認するため、Type II col



(軟骨基質), Type X col (軟骨基質), Type I col (骨基質)の免疫染色を行う。また、移植された軟骨分化 C-MSC に対する血管の侵入を CD31 を指標とした免疫染色にて観察する。予備的検討として、C-MSC を軟骨誘導培地で14日間培養するとトルイジンブルーに濃染することを見出している。したがって、C-MSC を軟骨誘導培地で培養することで、経時的に成熟した軟骨基質と軟骨細胞に変化していくと期待できる。ただし、本申請書が提唱する軟骨内骨化を経る骨再生には、軟骨基質の吸収、血管の侵入、MSC から分化した骨芽細胞による骨形成が必須である。つまり、完全な軟骨の状態より、未分化な MSC を含んだ状態のほうが望ましいと予想できる。そこで、上記で示す各段階で、軟骨分化の成熟度と vivo での骨形成能を比較しながら、骨再生に最も適した軟骨分化 C-MSC を樹立する。

### 2) イヌ大規模歯周組織欠損モデルに対する軟骨分化 C-MSC 移植効果の検討。

前述の検討で得られた、高い骨形成能を発揮する軟骨分化 C-MSC の歯周組織再生効果を検討するために、大規模歯周組織欠損モデルである、ビーグル犬根分岐部歯周組織欠損モデルを利用する。すなわち、ビーグル犬の第2, 3, 4 小臼歯の根分岐部の骨を分岐部直下より 4mm 切削し骨欠損を作製、アルジネート印象材を填入することで炎症を惹起させる。1週間後、アルジネート印象材および不良肉芽を除去し、欠損部を郭清。基本治療とし、さらに1週間後上記検討で得られた培養条件でビーグル犬骨髄由来の軟骨分化 C-MSC

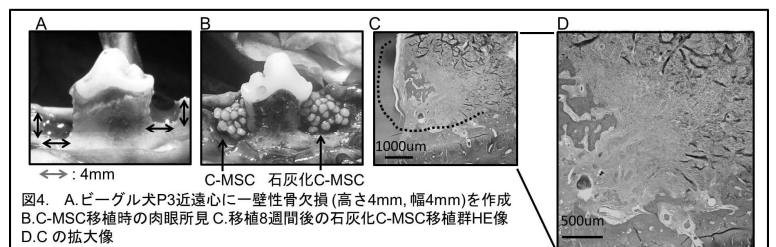


図4. A. ビーグル犬P3近遠心に一壁性骨欠損(高さ4mm, 幅4mm)を作成 B. C-MSC移植時の肉眼所見 C. 移植8週間後の石灰化C-MSC移植群HE像 D. Cの拡大像

治療とし、さらに1週間後上記検討で得られた培養条件でビーグル犬骨髄由来の軟骨分化 C-MSC

を作成し、この欠損部に移植する。4, 8, 12 週間後にその歯周組織再生効果を以下の項目で評価する。

- a) マイクロ CT を用いた歯槽骨再生量の定量
- b) HE 染色による組織学的観察
- c) アザン染色による機能的な歯周靭帯の再生の有無の観察
- d) その再生過程における基質の変化について、サフラニン O 染色および Type II col, Type I col の免疫染色による観察。

予備的検討として、ビーグル犬 1 壁性骨欠損モデルに対して申請者は C-MSC および骨分化 C-MSC の移植を行った。その結果、分岐部 III 級欠損モデルに対して有効な組織再生効果を発揮した骨分化 C-MSC の移植であっても、その骨再生はわずかであり、豊富な歯肉結合組織の再生にとどまった(図 4)。これは、骨分化 C-MSC の主な基質である I 型コラーゲンが骨形成ではなく歯肉結合組織形成に働いた可能性が高い。そこで、II 型コラーゲンやプロテオグリカンをおもな ECM とする軟骨分化 C-MSC の移植が、歯肉結合組織の形成を防ぎながら軟骨内骨化の様式で歯槽骨再生を促すと予想される。

#### 4 . 研究成果

本研究により、軟骨内骨化の様式による骨再生能を発揮する軟骨分化 C-MSC の作成が可能であることが示唆された。さらに、その軟骨分化 C-MSC の移植が、ビーグル犬根分岐部 III 級欠損モデルに対して効果的な組織再生を促進することが示唆された。本研究が発展し、軟骨内骨化を発揮できる軟骨 C-MSC が樹立された場合、骨再生のみならず、意図した位置での骨造成にも応用出来ると言える。例えば、C-MSC を移植することで骨造成し、インプラント治療を行うことや、骨形成不全患者に対しても効果的な治療法となりうる。すなわち、本研究は歯周治療のみならず、歯学・医学の幅広い領域に応用可能な細胞治療法開発であるといえる。

#### 5 . 主な発表論文等

なし

〔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〕

ホームページ等:

<https://home.hiroshima-u.ac.jp/perio/index.html>

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究分担者

研究分担者氏名：竹脇 学

ローマ字氏名：Takewaki Manabu

所属研究機関名：広島大学

部局名：歯周病態学

職名：歯周病態学・歯科診療医

研究者番号 (8 桁): 10805633

##### (2)研究協力者

研究協力者氏名：加治屋 幹人

ローマ字氏名：Kajiya Mikihito