

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592386
 研究課題名（和文） 幹細胞移入を伴うプリンヌクレオチド誘導性歯周組織再生療法の基盤構築
 研究課題名（英文） Involvement of purine nucleotide in periodontal regeneration by transplantation of adipose tissue-derived stem cells

研究代表者
 橋川 智子（HASHIKAWA TOMOKO）
 大阪大学 大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：00362682

研究成果の概要：

幹細胞移入とプリンヌクレオチドの融和による新規歯周組織再生療法を樹立することを目指し、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞(ADSC)をヒト脂肪組織より単離し硬組織への分化誘導能を *in vitro* にて検討した。その結果、ADSC は硬組織形成能を有することが確認され、また長期培養後の形質転換もなく安全性が高いことを明らかにした。さらに、歯周病動物モデルを用いて、ADSC 移入による歯周組織再生を検討し、歯周組織再生促進が強く示唆される結果を得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周外科学、脂肪組織由来幹細胞、歯周組織再生、細胞移入

1. 研究開始当初の背景

組織幹細胞の1つとして脂肪組織中に存在する間葉系幹細胞が注目されている。すでに、*in vitro* においては、脂肪組織由来未分

化間葉系幹細胞(ADSC)が、脂肪、骨、軟骨、筋肉など中胚葉性の細胞へ分化することが報告されており、ADSCがmultipotentな細胞であることが明らかにされている。私たちの

研究室でも、ヒト脂肪組織より単離した ADSC が骨芽細胞 lineage への分化能を有していることを *in vitro* にて確認しており、成体内に豊富に存在し、採取も簡便かつ安全に行える脂肪組織は有用な幹細胞源と考えられる。一方、幹細胞を移入する治療法の確立にあたり、もう一つの主要な検討課題は、臨床応用が可能ないかなるシグナル分子を用いることにより、幹細胞の至適な分化誘導を達成できるかということである。近年、プリンヌクレオチドであるアデノシンは、種々の生体反応制御作用を有するとの知見が集積しつつある。アデノシンが抗炎症的なメディエーターとして重要な役割を果たしていることは *in vivo*, *in vitro* の実験を通じて広く知られているこのような背景から、幹細胞の移入を伴う再生療法において、シグナル分子としてプリンヌクレオチドを組み合わせることは、投与部位において抗炎症作用が発現されるのみならず、幹細胞の硬組織形成細胞への分化を促進することが期待できると考えられる。

2. 研究の目的

幹細胞移入とプリンヌクレオチドの融和による新規歯周組織再生療法を樹立することを目指し、

(1) 歯周組織幹細胞を、歯周組織あるいは脂肪組織より単離し、

(2) プリンヌクレオチドの幹細胞分化誘導能を *in vitro* にて解析する。また、

(3) 脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の硬組織への分化を、分子・遺伝子レベルで解析するために、*in vitro* での脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の硬組織への誘導過程、あるいは、実験的歯周病モデルでの歯周組織再生過程で、如何なる遺伝子発現の調節が行われているのかについて、DNA チップを用いるこ

とにより、網羅的に検出し解析を行う。

(4) これらの情報を活用し、歯周病動物モデルを用いて、幹細胞移入によるプリンヌクレオチド誘導性歯周組織再生を検討する。

3. 研究の方法

(1) 脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の単離

① ヒト脂肪組織からの幹細胞単離

ヒト脂肪組織由来幹細胞は、大阪大学医学部附属病院でインフォームドコンセントを得た手術患者を対象に、手術時に廃棄となる脂肪組織より本学医学部未来医療センターにて単離する。得られた脂肪組織を一時間のコラゲナーゼ処理を行い、得られた細胞より ficoll を用いた比重遠心により赤血球を除去し播種。培養プレートに付着した細胞を三代継代後、得られた細胞を幹細胞 (ADSC) とする。

② ビーグル犬脂肪組織からの幹細胞単離

ビーグル犬の腹部大網より脂肪組織を採取、細断し、一時間のコラゲナーゼ処理を行う。得られた細胞より ficoll を用いた比重遠心により赤血球を除去し播種。培養プレートに付着した細胞を三代継代後、得られた細胞を未分化間葉系幹細胞 (ADSC) とする。

(2) プリンヌクレオチドによる単離幹細胞への分化誘導条件の解析

① 単離した幹細胞をアデノシン・ATP 存在・非存在下にて 10mM β -グリセロリン酸、50 μ g/ml アスコルビン酸、デキサメタゾンを含む石灰化誘導培地にて長期培養し、その際のアルカリフォスファターゼ活性の測定およびアリザリン染色による石灰化ノジュール形成能について解析する。

② DNA チップを用いた硬組織分化過程における遺伝子発現解析
幹細胞を石灰化誘導培地にて培養する際に、

アデノシン、ATP、アデノシンデアミナーゼ阻害剤、アデノシンレセプター特異的アゴニスト、アンタゴニストを添加し、7日目、14日目、21日目、28日目の各タイムポイントで細胞を回収し、RNAを調整する。コントロールとして、各タイムポイントでの無刺激群を作成し、同様にRNAを調整する。各サンプルは、GeneChipアレイ (affymetrix社) を用いて解析を行う。

(3) ビーグル犬を用いた重度歯周病モデルの作製およびプリンヌクレオチド誘導性幹細胞移入による歯周組織再生療法の確立

ビーグル犬の左右両側の下顎第三小臼歯を抜歯し、約3ヶ月間の治癒期間を経た後に第4小臼歯の近心部の歯槽骨を削合し、一壁性の垂直性骨欠損を作製する。作製する骨欠損は深さが5mmとなるように規格化を行うが、歯根の形態が骨欠損部の体積に大きく影響を与えると予測されるため、術前にエックス線撮影を行い可及的に条件の等しい被験個体を選別する。このようにして作成した左右両側の人工的垂直性骨欠損のうち一側を被験部位として(幹細胞+基材)を移入する。一方、対照部位として(基材のみ)を移入する。本研究においては基材(足場材)として、通常の歯周外科時に適応可能なフィブリングル等からなる足場材と共に移植する。移植後、アデノシン・ATPの局所投与、あるいはADA inhibitor・ATPの経口投与を毎日行い、約2週間おきにレントゲン撮影による歯槽骨再生の評価を行うとともに、約6週間後にマイクロCTにより歯周組織の断層撮影による歯槽骨再生の評価を行うとともに、屠殺し、組織切片を作成して組織学的に歯周組織再生効果を評価する。

4. 研究成果

(1) ヒトADSCの分化能の解析

①フローサイトメトリーを用いて、ヒトADSCの各種表面抗原の解析を行った結果、ADSC上にはCD73、CD44、CD105、CD166、SSEA4の発現を認め、CD34、CD45の発現は認められなかった。また、ADSCの増殖能を増殖曲線により解析した結果、継代を重ねても高い増殖能を示した。さらに増殖能が消失するまで継代を続けた後、G-band法およびSKY法にて染色体検査を行った結果、ADSCは増殖しなくなるまで継代数が進んでも染色体異常は認められなかった。

②アルカリフォスファターゼ活性の測定および石灰化ノジュール形成の解析：

ADSCを硬組織誘導培地(デキサメタゾン含有あるいは非含有の、10mM β -グリセロリン酸、50 μ g/ml アスコルビン酸、10%FCS添加D-MEM)にて長期培養を行った際のALPase活性を経時的に測定し、また、石灰化ノジュールの形成をアリザリン染色にて解析した結果、ADSC中のALPase活性が上昇し、石灰化ノジュールの形成が認められることが確認された。

③DNAチップを用いてADSCの硬組織形成細胞への分化過程における遺伝子発現の変化を検討したところ、ALPase、Runx2、PLAP-1などの硬組織分化マーカー遺伝子および歯根膜マーカー遺伝子の発現の上昇が認められた。

以上の結果より、ADSCは硬組織形成能を有することが確認され、また長期培養後の形質転換もなく安全性が高いことが示唆された。

(2) ビーグル犬脂肪組織からのADSC単離

ビーグル犬の腹部内臓脂肪より脂肪組織を採取、コラゲナーゼ処理を行った。得られた細胞よりficollを用いた比重遠心により赤血球を除去し、得られた細胞を播種後、培養プレートに付着した細胞を3代継代し、得ら

れた細胞をイヌ ADSC とした。

(3) ビーグル犬を用いた実験的歯周病モデルの作製および ADSC の移植

根分岐部歯周病モデルは、ビーグル犬1頭を用い、第四前臼歯頰側分岐部に頬舌径3mm、深さ5mmの人工的2級根分岐部病変を作製した。また、2壁性骨欠損歯周病モデルは、ビーグル犬5頭を用い、左右両側の下顎第四前臼歯を抜歯し、約3ヶ月間の治癒期間を経た後に第一後臼歯の近心部の歯槽骨を、頬舌径3mm、近遠心径5mm、深さ4mmとなるように規格化を行い同上骨欠損を作製した。作製した左右両側の人工的骨欠損のうち一側を被験部位として、ADSC+フィブリンを移植した。一方、対照部位にはフィブリンのみを移入した。移植後6週目に屠殺し、マイクロCTを用いた断層撮影および、組織切片の作製により歯周組織再生効果を評価した。その結果、ADSC移植側において骨新生、セメント質新生が認められ、新生したセメント質にはコラーゲン線維の埋入を伴うことが示された。さらに、歯肉上皮の下方増殖が有意に抑制される傾向が認められ、ADSC移植による歯周組織再生促進が強く示唆される結果が得られた。

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2件)

- ①村上伸也・橋川智子、歯周組織再生の現状と将来の展望、査読無、90、2008、609-616
- ②橋川智子・村上伸也、脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生、日本歯科評論、査読無、778、2007、39-40

[学会発表] (計7件)

①小笹匡雄、脂肪細胞由来未分化間葉系幹細胞の移植による歯周組織再生療法の開発、日本歯科保存学会 2008 年度秋季学術大会 (第129回)、2008年11月7日、富山国際会議場 (富山)

②橋川智子、脂肪細胞由来未分化間葉系幹細胞の移植による歯周組織再生療法の開発、第6回日本再生歯科学会学術大会・総会、2008年9月13日、日本歯科大学 (東京)

③岩山智明、Analysis of Osteogenic Differentiation of Adipose Tissue-derived Stem Cell、IADR 86th General Session & Exhibition、2008年7月3日、Metro Toronto Convention Centre (カナダ)

④橋川智子、Periodontal Regeneration by Transplantation of Adipose Tissue-derived Stem Cells、IADR 86th General Session & Exhibition、2008年7月3日、Metro Toronto Convention Centre (カナダ)

⑤岩山 智明、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の硬組織分化能の解析、日本歯周病学会 2008 年度春季学術大会 (第51回)、2008年4月26日、大宮ソニックシティー (埼玉)

⑥小笹匡雄、実験的歯周病モデルを用いた脂肪組織由来間葉系幹細胞の移植による歯周組織再生、日本歯周病学会 2008 年度春季学術大会 (第51回)、2008年4月26日、大宮ソニックシティー (埼玉)

⑦橋川智子、脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の硬組織形成細胞への分化誘導、日本歯周病学会、2007年5月18日、横須賀芸術劇場 [産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：歯周硬組織再生用組成物及び歯周硬組織を再生する方法

発明者：村上伸也、橋川智子、澤 芳樹、松山 晃文、菰田 弘

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許権

番号：特願2006-259717PCT

出願年月日：2007年 9月20日

国内外の別：米国・欧州（JSTの支援確定）

PCT第22条（1）に基づく指定国移行

（PCT/JP2007/06287）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋川 智子 (HASHIKAWA TOMOKO)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00362682

(2) 研究分担者

村上 伸也 (MURAKAMI SHINYA)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70239490

北村 正博 (KITAMURA MASAHIRO)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：10243247