

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390442

研究課題名(和文)印刷技術を用いた新規歯周組織再生法

研究課題名(英文)A novel periodontal tissue regeneration method using a printing technology

研究代表者

森田 育男 (Morita, Ikuo)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：60100129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを用いて歯槽骨欠損モデルを確立し、このモデルを用いて、我々が確立した転写移植法および新たな細胞培養液移植法による効果を検討した。その結果、歯根膜由来間葉系幹細胞を脱細胞化羊膜に転写した群では、迅速でしかもセメント質など従来の歯周組織と同様な歯周組織の再生が認められた。さらに、他家移植を可能にするため、この歯根膜由来間葉系幹細胞の培養液をコラーゲンスポンジに浸して、上記のモデルに適用したところ、同様な歯周組織再生が認められた。この培養液には、エキソソームが含まれており、in vitro実験系では、このエキソソームが分化細胞の間葉系幹細胞化が認められたことより、再生の新たな機序が提示された。

研究成果の概要(英文)：After we established the rat alveolar bone defect model, we have examined the effect of both our developed transfer-grafting method and conditioned medium injection method using this animal model. As a result, periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells transferring to the decellularized amniotic membrane cause to rapid tissue regeneration. Furthermore, to allow for allotransplantation, when a collagen sponge including the contained cultured medium of the periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells was applied to the same model, similar periodontal tissue regeneration was observed. We determined the presence of VEGF and exosomes in the cultured medium. In vitro experiment, we observed that the exosomes can differentiate the fibroblasts to the mesenchymal stem cells. The observation present new mechanism that mesenchymal stem cells can repair the defected tissues.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 歯根膜 間葉系幹細胞 骨損傷 エキソソーム

1. 研究開始当初の背景

21世紀型先端医療は再生医療と遺伝子を基盤とした個別化医療と考えられている。その中でも再生医療は自己の細胞を用いることにより副作用が少ない医療として注目を浴びている。専門機関の調査によると、再生医療技術で対象となる患者数は約165万人で、そのうち最も多い対象疾患は歯周病で110万人を超える(2008年ヒューマンサイエンス振興財団報告)。しかしながら、文部科学省資料ライフサイエンス2008-2009では、細胞を用いた再生医療のスキームには、歯周病は疾患名も拠点名も記載されていない。申請者は、これまで印刷技術を利用した組織再生技術を開発し、血管再建、骨再生実験において良好な結果を得ている。血管再建方法は組織特異的な細胞を単離、培養したのち、前もって疎水・親水性を利用してパターン化した基板の上に播種し、その後、脱細胞化したヒト羊膜上に転写し血管網を構築し、この血管付き羊膜を体内に移植し、迅速な組織再生を図る。骨再生はパターン化した基板を用いず、光リソグラフィ法により全面を処理した基板を用い、この基板の上に骨芽細胞を培養し、羊膜に転写し、骨欠損部に移植することにより、迅速な骨再生を可能とした。

本研究の成果が臨床応用されることにより、歯周疾患だけでなく、超高齢化社会である日本において大きな問題である褥瘡の治療にも応用可能であることより、本再生医療の有効性が明らかになれば、口腔領域における細胞を用いた再生医療が、他の組織の再生医療スキーム同様、社会的に認知されるようになる。

2. 研究の目的

本研究においては、口腔疾患の中で重要な疾患であり、再生医療の対象である歯周病に着目し、歯周組織欠損動物を用いて、開発した印刷技術を用いた再生医療法の効果を検

証する。特に、臨床応用への対応のため、自己幹細胞の採取、幹細胞としての性質を維持した培養法、無細胞化した羊膜(低抗原性)への転写、移植による細胞の組織局所への保持、ナノゲルを用いた増殖因子の組織局所での徐放、さらには良好な血行再建により迅速で完全な組織再生を行うことを目的としている。

さらに、将来の再生医療においては、無細胞再生医療法の確立も必要なことより、細胞の培養液からエキソソームを分離し、その作用を細胞移植と比較することも併せて目的とした。

3. 研究の方法

1) 歯周組織欠損モデルの作成と再生効果の評価法の確立:

免疫不全ラットの下顎第一臼歯近心口蓋側に外科的欠損を作製した。具体的には、ラット下顎右側、下顎下縁に切開を入れ、咬筋を露出させ近心、遠心側を結紮し、咬筋浅層、深層を切開し下顎骨体を露出させた。歯科用ラウンドバーを用いて第一臼歯近心根から第二臼歯近心根に到る歯周組織欠損を作製する。移植材料を設置後、咬筋を縫合、皮膚縫合し、経過を観察した。このように作製したモデルから骨の再生を定量的に検討するため、歯根表面量を測定した。

2) ヒト歯根膜由来間葉系幹細胞の培養法および幹細胞性の検討:

東京医科歯科大学歯学部附属病院を受診した患者より同意を得た後、抜去歯より歯根膜組織を採取する(東京医科歯科大学倫理審査委員会承認済)。歯根膜組織を細切後、Collagenase /Dispase 中にて37℃、1時間インキュベートしたのち、遠心分離し上清を除去後、培養液(MSCGM, Lonza)を加えセルストレーナー(70mm pore size)を用いて細胞塊を除く。Single cell suspension を10cm ディッシュに撒き歯根膜幹細胞を培養した。この細

胞を通常のディッシュ上、セルシード (UpCell), 光リソグラフィー基板上で培養し、その幹細胞性に関し、山中因子など幹細胞性維持遺伝子を real-time PCR 法で、また膜表面抗原を FACS で検討する。具体的には、遺伝子としては Sox2, Oct3/4, Nanog などを、間葉系幹細胞マーカーとしては CD90, CD44, CD73, CD105, STRO-1, ペリサイトマーカーとしては CD146, 血管内皮細胞マーカーとしては CD31, 白血球系細胞マーカーとしては CD45 の発現を FACS を用いて解析する。さらに、間葉系幹細胞の多分化能は骨芽細胞分化、脂肪細胞分化、軟骨細胞分化を各々分化用培養液で培養して染色により確認した (Von Kossa 染色, Oil red O 染色, Alcian Blue 染色)。

3) 歯周組織欠損モデルにおける歯根膜由来間葉系幹細胞転写羊膜移植, condition medium の再生効果の評価:

歯周組織欠損モデルに間葉系幹細胞を転写した羊膜を移植し、その効果を前述した方法で定量化した。本研究においては、移植した間葉系幹細胞の効果を調べるとともに、増殖因子を含有した徐放性ナノゲル、血管移植の必要性を調べた。最も効果が得られた群において、詳細な検討、すなわち、経時的な骨再生、歯根膜組織再生、血流などを調べるとともに、間葉系幹細胞の移植部位での分化状態、細胞の存在などの確認のため、間葉系幹細胞にあらかじめレンチ - GFP でラベルする方法など再生効果の機序を明らかにした。

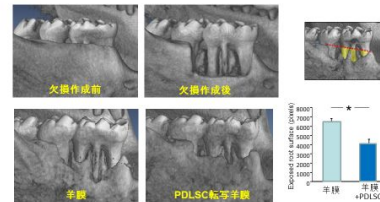
また上記の方法で、歯根膜由来間葉系幹細胞の conditioned medium の影響を調べた。

4. 研究成果

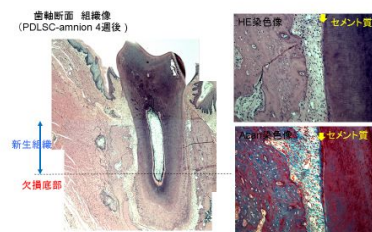
我々が確立した歯周組織欠損ラットに間葉系幹細胞を転写した羊膜を移植し、その効果を定量化した。間葉系幹細胞は、歯根膜から採取したが、CD44, CD73, CD90, CD166 陽性、

CD31, CD34, CD45 陰性であり、間葉系幹細胞と同定した。その結果、移植した細胞は再生組織には認められないものの、組織の再生は促進していた。

歯周組織再生実験

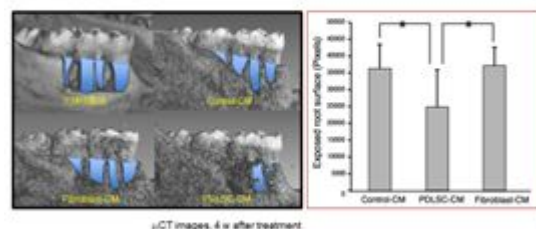


また、その組織像を調べたところ、従来の歯周組織再生実験では確認できなかったセメント質の存在が確認され、本来の組織への再生が行われていることが観察された。



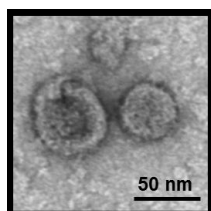
次に、他家移植の可能性を探るため、間葉系幹細胞の condition medium の効果を調べた。その結果、condition medium においても同様な再生効果が認められた。

幹細胞培養上清による歯周組織再生

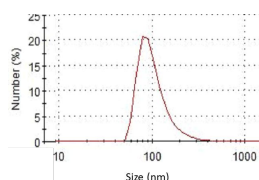


そこで、その condition medium の性質を調べたところ、血管新生因子である VEGF が含まれており、再生の一端を担っていることが明らかとなった。さらに、condition medium

からエクソソーム(大きさ約 100nm)を単離して、その効果を調べたところ、このエクソソームには分化した細胞を未分化細胞に脱分化させる能力があり、この未分化細胞は骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞に再分化することが明らかとなった。



エクソソーム
電子顕微鏡像



以上の結果より、歯根膜由来間葉系幹細胞が歯周組織の再生を促すこと、その作用機序としては、自分自身が再生組織構成細胞に分化するのではなく、VEGFのような液性因子とエクソソームにより組織周囲の細胞の変化をもたらすことにより再生を促すことが明らかとなった。このことにより、新たな再生医療方法として他家移植が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- Okito A, Nakahama K, Akiyama M, Ono T, Morita I Involvement of the G-protein-coupled receptor 4 in RANKL expression by osteoblasts in an acidic environment. *Biochem Biophys Res Commun.*458(2):435-40 (2015) 査読あり
- Kimura Y, Komaki M, Iwasaki K, Sata M, Izumi Y, Morita I: Recruitment of bone marrow-derived cells to periodontal tissue defects. *Front Cell Dev Biol.* 21;2:19 (2014). 査読あり
- Safronova OS, Nakahama K, Morita I. Acute hypoxia affects P-TEFb through HDAC3 and HEXIM1-dependent mechanism to promote gene-specific transcriptional repression. *Nucleic Acids Res.* 42(14):8954-69 (2014) 査読あり
- Komaki M, Iwasaki K, Morita I. Bone and Stem Cells. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Clin Calcium.* ;24(4):565-73 (2014) 査読なし
- Hatano Y, Nakahama K, Isobe M, Morita I. Tumor associated osteoclast-like giant cells promote tumor growth and lymphangiogenesis by secreting vascular endothelial growth factor-C. *Biochem Biophys Res Commun.*28;446(1):149-54 (2014) 査読あり
- Hashida Y, Nakahama K, Shimizu K, Akiyama M, Harada K, Morita I. Communication-dependent mineralization of osteoblasts via gap junctions. *Bone.*;61:19-26 (2014) 査読あり
- Akiyama M, Nakahama K, Morita I Impact of docosahexaenoic acid on gene expression during osteoclastogenesis in vitro—a comprehensive analysis. *Nutrients.* 5(8):3151-62 (2013) 査読あり
- Saitoh M, Shirakihara T, Fukasawa A, Horiguchi K, Sakamoto K, Sugiyama H, Beppu H, Fujita Y, Morita I, Miyazono K, Miyazawa K. Basolateral BMP signaling in polarized epithelial cells. *PLoS One.* 8(5):e62659 (2013) 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

- 小牧基浩, 岩崎剣吾, 森田育男 組織修復における移植幹細胞の役割について考える第 14 回再生医療学会シンポジウム 2015.3.18-21 横浜
- 森田育男 医療系大学院における基礎研究第 79 回口腔病学会学術大会特別講演 2014 12.6. 東京
- Izumi Honda Chikako Morioka Atsuko Taki Noriko Oshima-Sudo Motohiko Koomaki Toshihiro Kubota, Ikuo Morita Assessment of placental and neonatal complication in rat model of intra-uterine inflammation induced by intra amniotic injection of lipopolysaccharide. XVIIIth IVBM 2014.4.16-17,

Kyoto

4. Motohiro Komaki Mesenchymal stem cell therapy for periodontal regeneration: Cell transfer technique to paracrine factors TMU-TMDU Joint symposium 2013 21013 11.30 Taipei, Taiwan
5. 岩崎剣吾, 小牧基浩, 赤澤慶子, 横山尚毅, 菫蒲弘人, 木村康之, 遠井敏行, 和泉雄一, 森田育男 歯根膜幹細胞由来易性因子を用いた歯周組織再生 第 56 回秋季日本歯周病学会学術大会 2013.9.22 前橋
6. 岩崎剣吾, 小牧基浩, 横山尚毅, 菫蒲弘人, 森田育男 歯根膜幹細胞培養上清を用いたラット歯周組織の再生 第 34 回日本炎症・再生医学会 2013.7.2-7.3. 京都
7. 岩崎剣吾, 小牧基浩, 赤澤慶子, 横山尚毅, 菫蒲弘人, 木村康之, 遠井敏行, 和泉雄一, 森田育男 歯根膜幹細胞の培養家庭における形態および文化能の変化について 第 56 回春季日本歯周病学会学術大会 2013.5.31 東京
8. 岩崎剣吾, 小牧基浩, 滝 敦子, 本多 泉, 森田育男 歯根膜幹細胞凍干羊膜移植によるラット歯周組織の再生 第 33 回日本炎症・再生医学会 2012.7.5-7.6.福岡

〔産業財産権〕

無

6. 研究組織

(1)研究代表者

森田 育男 (MORITA, Ikuo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授

研究者番号： 6 0 1 0 0 1 2 9

(2)研究分担者

小牧 基浩 (KOMAKI Motohiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・寄附講座准教授

研究者番号： 3 0 4 0 1 3 6 8

岩崎 剣吾 (IWASKI Kengo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・寄附講座講師

研究者番号： 4 0 4 0 1 3 5 1

小野寺 光江 (ONODERA Mitsue)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・講師

研究者番号： 5 0 3 7 6 7 0 3