

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05034

研究課題名(和文) 歯周組織再生効果増強を目指した幹細胞-サイトカイン治療の創生

研究課題名(英文) A basic study for the development of stem cell-cytokine therapy aimed at the enhancing periodontal tissue regeneration effect.

研究代表者

北村 正博 (Kitamura, Masahiro)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：10243247

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)：本研究では、間葉系幹細胞を用いた細胞治療とサイトカイン治療の歯周組織再生効果増強の可能性を検討した。その結果、脂肪組織由来幹細胞(ADSC)の足場材として、顆粒径；500-1000 $\mu$ mの-3リン酸カルシウムとフィブリンゲルが有用であることが明らかとなった。そして、ADSCや骨髄由来間葉系幹細胞の培養上清のプロテオーム解析の結果、Periostinが歯周組織再生に関与している可能性が示唆された。また、ビーグル犬の開窓モデルにおいて、FGF-2投与により骨再生が観察された。以上の結果より、細胞治療とサイトカイン治療を組み合わせることにより、歯周組織再生効果が増強される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the possibility of enhancing periodontal regeneration effect in the cell therapy using mesenchymal stem cells and the cytokine therapy. As a result, it was revealed that fibrin gel and -3 calcium phosphate (-TCP) whose granule size was 500-1000 mm were useful as a scaffold for adipose tissue-derived stem cells (ADSC). The proteomic analysis of culture supernatants of ADSC and bone marrow-derived mesenchymal stem cells suggested that Periostin might be involved in periodontal tissue regeneration. In addition, the bone regeneration was observed by application of FGF-2 in the fenestration model of beagle dogs. These results suggested that the combination of cell therapy using stem cells and cytokine therapy might enhance the periodontal tissue regeneration effect.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 再生 サイトカイン 幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

1980年代初頭にGTR法が登場し歯周組織再生誘導が臨床可能であることが示された。その後、有効性及び安全性の向上や術式の簡便化を目指して新規歯周組織再生療法の開発がなされ、エナメルマトリクスタンパクや血小板由来増殖因子とβ-リン酸3カルシウムの合剤が歯周組織再生用“医療機器”として国内外で実用化されていた。我々の研究グループも、1990年代初頭から塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)を用いた新規歯周組織再生療法の開発に着手し、動物実験などの前臨床研究を経て、第I相～第III相臨床試験を展開してきた。その結果、歯周炎患者の3、2壁性骨欠損に対するFGF-2の歯周組織再生誘導能と安全性が確認されていた。このように研究開始当初の段階において、FGF-2を有効成分とする新規歯周組織再生薬ごく近い将来に誕生する可能性が高まっていたことから、FGF-2の歯周組織再生作用を如何に増強するか、あるいはその歯周組織再生誘導効果を超える新規歯周組織再生療法をどのように開発するかが、次の重要な研究課題と研究開始当時は考えられていた。

また、我々が手がけてきたFGF-2も含め、t当時臨床応用されていた歯周組織再生療法は、歯根膜などの歯周組織に内在する幹細胞の能力をサイトカインや人工膜で高めることにより、歯周組織の再生を図るものであった。しかしながら、このような組織幹細胞は、その供給量に限界があり、加齢とともにその数が減少し、増殖能や分化能も低下することから、他の組織や部位より採取した幹細胞を歯周組織欠損部へ移植することにより、歯周組織再生を図る細胞治療が次世代の歯周組織再生療法として注目されていた。そのような中、我々もいち早く歯根膜に依存しない間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell: MSC)として、採取が比較的容易で脂肪組織中に多く存在する脂肪組織由来間葉系幹細胞(Adipose Tissue-derived MSC: ADSC)に着目し、その歯周組織再生能の検討を行っていた。その結果、ADSCが歯周組織再生能を有することをビーグル犬実験の歯周炎モデルで確認してきたことから歯周組織再生治療における幹細胞ソースとしてADSCが有用であることを明らかにしていた。さらに、我々は、ADSCとFGF-2とを実際に併用することによりその歯周組織再生効果が増強されることをビーグル犬モデルですでに確認し、幹細胞とサイトカインとの併用療法が歯周組織再生効果の増強をもたらす可能性を明らかにしていた。

以上のことから、より効果的に歯周組織再生を促す次世代の歯周組織再生療法の構築には、サイトカイン治療に加え幹細胞の組織再生能を効果的に発揮させ歯周組織再生効果の増強をもたらす幹細胞-サイトカイン治療の可能性を探索することが重要かつ必要と考えられていた。

### 2. 研究の目的

歯周組織に依存しない間葉系幹細胞を歯周組織欠損部へ移植する細胞治療とサイトカイン治療を組み合わせることにより従来のサイトカイン治療の歯周組織再生効果を超える新規歯周組織再生療法の開発が期待される。そこで、本研究では、3、2壁性骨欠損を超える重度の骨欠損へのFGF-2の適応拡大を図るとともに、ADSCなどの間葉系幹細胞の分化や増殖に適した足場剤の検討に加え、幹細胞が放出するtrophic因子を明らかにする。そして、それらの結果を我々がこれまで培ったFGF-2を用いたサイトカイン治療に関する知見と融合させ、歯周組織再生効果の増強をもたらす次世代型幹細胞-サイトカイン治療の基盤構築を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 脂肪組織由来間葉系幹細胞(Adipose Tissue-derived MSC: ADSC)に適した足場材の検討

ADSC(LONZA)  $1 \times 10^5$ 個と3種類の顆粒径の異なるβ-3リン酸カルシウム(β-TCP)顆粒各30mg(Cerasorb<sup>®</sup>S、MおよびLサイズ、顆粒径; S: 150-500 μm、M: 500-1000 μm、L: 1000-2000 μm、白鵬)を混和し、トランスウェル上で3日間培養した。その後、パラフィンで固定、切片を作製し、コンフォーカル顕微鏡にて観察し、切片に含まれるADSC数とβ-TCPの顆粒径との関連を検討した。

幹細胞を含む移植材には適度の賦形性が必要であるため、細胞とβ-TCPに加え、賦形性を有するボルヒール<sup>®</sup>(フィブリンゲル、帝人ファーマ)、アテロコラーゲン(コーケン)やハイドロキシプロピルセルロース(HPC、日本曹達株式会社)を基材として使用し細胞を含有する移植材うい作製し、各移植材の賦形性や操作性を比較検討した。なお、本解析では臨床応用を想定し、β-TCP顆粒として気孔率が75%と高いオスフェリオン<sup>®</sup>(オリンパス)を用い、また多数の細胞数での検討を行うため、高い硬組織形成能を有し細胞の確保が容易なマウス歯根膜細胞(MPDL)を用いて、解析を実施した。

で作製した移植材の中から賦形性や操作性の良好な8種の移植材を選び、移植材中の細胞数および細胞生存率をコンフォーカル顕微鏡で評価した。

(2) 間葉系幹細胞培養上清(MSC-CM)のプロテオーム解析

10cm dishに脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)、骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)およびヒト線維芽細胞(FB)を播種し、サブコンフルエントになるまで培養を行った。その後、無血清培地を添加し3日間培養を行い、遠心分離し各々の培養上清(ADSC-CM、

BMSC-CM、FIB-CM)を回収した。そして、各サンプルに含まれるタンパク質を、液体クロマトグラフ(LC)に Ultimate3000® を、そして質量分析装置(MS)に Q-Exactive Plus を用いたショットガンプロテオーム解析を用いて網羅的に解析した。

(3) ビーグル犬の重度歯周組織欠損モデルに対する FGF-2 の歯周組織再生効果の検討  
 ビーグル犬にネンプタル麻酔下で局所麻酔を行い、上顎両側犬歯および第2前臼歯にそれぞれ人工的裂開および開窓モデルを作成する。試験側には 0.3% FGF-2 含有ハイドロキシプロピルセルロース(HPC)製剤を、反対側(対照側)には HPC のみを投与し、試験側と対照側の歯肉の臨床的観察に加え、マイクロCT解析により両部位の歯槽骨の再生状態を評価して裂開および開窓モデルにおける FGF-2 の歯周組織再生効果を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ADSC に適した足場材の検討

S や L サイズの -TCP 顆粒に比べ、M サイズの顆粒が含まれる切片において ADSC が多く認められた。粒径の小さい S サイズの顆粒では細胞の接着面積が少なく、また L サイズでは、顆粒間の空間が大きくなり細胞の保持が難しくなると考えられた。

MPDL と -TCP 及び基剤を組み合わせた移植材の賦形性に関する評価を示す(表1)。

表1 移植材の賦形性に関する評価

MPDL	-TCP	基剤	賦形性
1	-	ボルヒール®	
2	G1	-	
3	-	1%アテロコラーゲン	×
4	-	2%アテロコラーゲン	
5	-	3%アテロコラーゲン	
6	-	HPC(H:1000-4000mPa)	
7	-	HPC(M:150-400mPa)	×
8	-	HPC(L:6-10mPa)	×
9	G1	1%アテロコラーゲン	×
10	G1	2%アテロコラーゲン	
11	G1	3%アテロコラーゲン	
12	G1	HPC(H:1000-4000mPa)	

G1: オスフェリオン® (顆粒径 0.5-1.5mm)

フィブリン製剤(ボルヒール®)、高濃度の HPC を基材とした移植材に加え、2%あるいは3%アテロコラーゲンに -TCP を加えた移植材の賦形性や操作性が良好であった。

MPDL とボルヒール®を組み合わせた移植材が細胞数および細胞生存率ともに最も高かった。そして、-TCP を含有する移植材は、-TCP の顆粒表面への細胞接着が認められ細胞生存率も中程度であったが、移植材に含まれる細胞数は少なかった。一方、アテロコラーゲンや HPC を基材とする移植材

は細胞生存率が低い傾向が認められた。

##### (2) 間葉系幹細胞培養上清(MSC-CM)のプロテオーム解析

各細胞の培養上清(CM)のショットガンプロテオーム解析により、ADSC-CM、BMSC-CM、FIB-CM にはそれぞれ 437、618、474 種のタンパク質が検出され、合計 767 種のタンパク質が検出された(図1)。そして、各上清に特異的に検出されたタンパク質はそれぞれ 21、191、57 種であった。そして、ヒト線維芽細胞の CM である FIB-CM に比べ、幹細胞から回収された幹細胞の CM である ADSC-CM および BMSC-CM において、いくつかのタンパク質が多く検出され、傷治癒にも関与することが報告されている細胞外マトリックスである Periostin が両細胞において多く検出された。

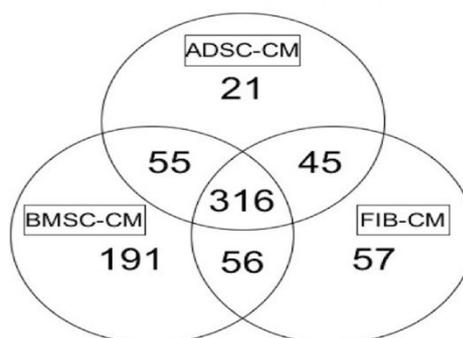


図1 間葉系幹細胞培養上清(MSC-CM)のプロテオーム解析によるタンパク質の検出

(3) ビーグル犬の重度歯周組織欠損モデル開窓モデルでは HPC のみを投与した対照群に比べ FGF-2 投与群において骨再生が観察された(図2)。一方、裂開モデルでは FGF-2 投与群の一部に歯槽骨再生が認められたが、全体的には両群とも著明な骨再生は認められなかった。

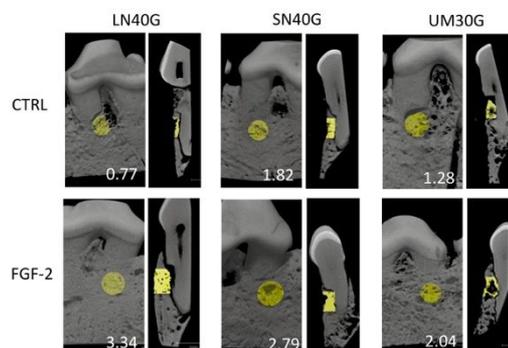


図2 開窓モデルにおける μCT による新生歯槽骨の解析

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 16 件)

S Murakami, Emerging regenerative approaches for periodontal regeneration from cytokine therapy to stem cell therapy, the Asian Pacific Society of Periodontology, 2015 年 10 月 8 日, Bali (Indonesia)

北村正博, 歯周組織再生療法の現状と近未来, 日本臨床歯周病学会平成 27 年第 2 回関西支部教育研修会コデンタルセッション 教育講演(招待講演)2015 年 11 月 23 日, 大阪歯科大学 100 周年記念館(大阪府大阪市)

M TAKEDACHI, K SAWADA, S YAMAMOTO, C MORIMOTO, A HIRAI, M OZASA, T IWAYAMA, Y SANO, C M LEE, A MATSUYAMA, H OKURA, M KITAMURA, S MURAKAMI, Periodontal tissue regeneration by transplantation of ADMPC, 第 63 回国際歯科研究学会学術大会, 2015 年 10 月 30 日, 福岡国際会議場(福岡)

K SAWADA, M TAKEDACHI, S YAMAMOTO, C MORIMOTO, A HIRAI, M OZASA, T IWAYAMA, Y SANO, M KITAMURA, S MURAKAMI,

Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue derived multi-lineage progenitor cells., international Symposium 2015, Oral and Craniofacial Development and Diseases, 2015 年 12 月 10 日, 弓倉記念ホール(吹田市)

沢田啓吾、竹立匡秀、岩山智明、山本智美、森本千晶、平井麻絵、李千萬、松山晃文、大倉華雪、佐野夕子、野崎剛徳、北村正博、村上伸也, 脂肪組織由来多系統前駆細胞の移植による新規歯周組織再生療法の開発, 第 15 回再生医療学会総会 2016 年 03 月 17 日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

北垣次郎太、宮内静香、榎本梨沙、今井敦子、小林香織、中谷明弘、河合伸治、藤原千春、山下元三、柳田学、山田聡、北村正博、村上伸也, 歯根膜細胞の骨芽細胞分化における SMPD3 の影響, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日, パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

S MURAKAMI, Periodontal Regeneration: Present status and future outlook., International Dental Exhibition and Meeting (IDEM), 2016 年 04 月 10 日, Singapore (Singapore)

K Sawada, M Takedachi, T Iwayama, S Yamamoto, C Morimoto, A Hirai, C M

Lee, H Okura, A Matsuyama, Y Sano, M Kitamura, S Murakami, The mechanism of periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells., International Society for Stem Cell Research 2016, 2016 年 06 月 22 日, San Francisco, USA

C Lee, M Takedachi, K Sawada, H Ohkawara, A Matsuyama, M Kitamura, S Murakami, Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Basic research toward the clinical application., International Federation for Adipose Therapeutics and Science, 2016 年 11 月 19 日, San Diego, USA

村上伸也, シンポジウム 歯科医療における再生医療等の臨床応用化の現状と課題, 脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いた歯周組織再生療法の開発, 第 16 回日本再生医療学会, 2017 年 3 月 7 日, 仙台

M TAKEDACHI, K SAWADA, T IWAYAMA, S YAMAMOTO, C MORIMOTO, A HIRAI, Y SANO, M KITAMURA, S MURAKAMI, Periodontal regeneration by ADMPC transplantation in man., 2017 IADR GENERAL SESSION, 2017 年 03 月 23 日, San Francisco, USA

S Murakami, Symposium: Hard Tissue Regeneration: Periodontal Regeneration by Cytokine Therapy and Stem Cell Therapy, Osteology Japan, 2017 年 6 月 4 日, Tokyo

北村正博、村上伸也, 歯周組織再生剤「リグロス®」誕生 = それはひらめきと半信半疑から始まった =, 第 59 回歯科基礎医学学会学術大会, 2017 年 9 月 17 日, 松本  
M Takedachi, K Sawada, T Iwayama, S Yamamoto, C Morimoto, A Hirai, Y Sano, M Kitamura, S Murakami, Periodontal regeneration by ADMPC transplantation in man, 2017 IADR GENERAL SESSION, 2017 年 3 月 22 日 ~ 25 日, San Francisco, California (USA)

K Sawada, M Takedachi, T Iwayama, C Morimoto, A Hirai, S Murakami, Analysis of trophic effects of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cell (ADMPC) on the periodontal regeneration, Osteology Japan 2017, 2017 年 6 月 1 日, Tokyo

竹立匡秀、沢田啓吾、岩山智明、柏木陽一郎、山本智美、森本千晶、平井麻絵、野崎剛徳、北村正博、村上伸也, 脂肪組織由来多系統前駆細胞移植による歯周組織再生療法の安全性・有効性評価第, 146

回日本歯科保存学会春季学術大会, 平成  
29年6月9日, リンクステーションホー  
ル青森(青森)

〔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 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 正博 (KITAMURA, Masahiro)  
大阪大学・歯学研究科・准教授  
研究者番号: 10243247

### (2) 研究分担者

村上 伸也 (MURAKAMI, Shinya)  
大阪大学・歯学研究科・教授  
研究者番号: 70239490

柳田 学 (YANAGITA, Manabu)  
大阪大学・歯学研究科・招聘教員  
研究者番号: 80379081

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

山田 聡 (YAMADA, Satoru)  
竹立 匡秀 (TAKEDACHI, Masahide)  
沢田 啓吾 (SAWADA, Keigo)  
安斎 純 (ANZAI, Jun)  
永安 利江 (NAGAYASU, Toshie)  
阪下 裕美 (SAKASHITA, Hiromi)  
山本 智美 (YAMAMOTO, Tomomi)  
津島 賢一郎 (TSUSHIMA, Kenichiro)  
森本 千晶 (MORIMOTO, Chiaki)  
長谷川 詩織 (HASEGAWA, Shiori)