

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11104

研究課題名(和文)他家移植を基盤とした歯周組織に対する次世代細胞療法の創生

研究課題名(英文)Creation of next generation cell therapy for periodontal tissue based on allogenic cell transplantation

研究代表者

半田 慶介 (HANDA, Keisuke)

東北大学・歯学研究科・講師

研究者番号：40433429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来多系統前駆細胞(adipose tissue-derived multilineage progenitor cells; ADMPC)を用いた他家移植による再生医療技術の開発を目指すこととした。根分岐部2級病変を有するマイクロミニブタ歯周炎モデルへADMPCの他家移植と自家移植による歯槽骨の再生効果を比較検討した。uCTを用いて歯槽骨再生能力を3次元画像で解析した結果、pADMPCの他家移植は自家移植と同程度の歯槽骨再生効果を有することが確認された。本研究の成果により、ADMPCが持つ免疫調節能力は他家移植においても歯周組織の機能回復に効果が見込まれた。

研究成果の概要(英文)：We decided to aim for the development of regenerative medicine technology by transplantation using an adipose tissue-derived multilineage progenitor cells (ADMPC). Comparison of regeneration effect of alveolar bone by autologous transplantation of ADMPC and microinhibition periodontitis model with root bifurcation second grade lesion was carried out. As a result of analyzing alveolar bone regeneration ability with uCT in three dimensional images, it was confirmed that the transplantation of pADMPC with osteogenesis had alveolar bone regeneration effect comparable to autologous transplantation. Based on the results of this study, the immunomodulatory capacity possessed by ADMPC was expected to be effective in restoring the function of periodontal tissues in other transplantation.

研究分野：保存修復学

キーワード：再生医療 歯周組織 脂肪由来間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

これまで歯周組織の再生療法として GTR 法やエムドゲインが行われ、さらに bFGF や BDNF などをはじめとしたサイトカイン療法が計画されている。近年、末梢血や歯根膜、脂肪組織、骨髄由来から採取された間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells : MSC)を用いた幹細胞移植療法が先端医療として頭角を現してきた。このように難治症例に対して、生物活性物質と幹細胞を応用した歯周組織再生医療による機能回復が行われるようになった。

最近、これらの再生療法において抗炎症効果を目的とした他家由来の MSC による細胞移植が注目を受けている。MSC 移植の特長とし、細胞傷害部位にホーミングし、胚葉を超えて多彩な細胞に分化するとともに、炎症反応の抑制、損傷組織におけるアポトーシスの抑制、血管新生促進、組織幹細胞の活性化、免疫担当細胞機能の賦活などの “ trophic effect ” が認められている。MSC による細胞製剤の可能性は高く、他家の MSC を用いることができる。そのメリットは、予め他家より採取された MSC を大量培養することができるため緊急性が高い場合や創傷部位が大きく、細胞数が大量に必要とする場合にも即応できることが挙げられる。また、個人の MSC の培養の必要がないことから、培養にかかる人的物的なコスト削減につながる。それゆえ MSC を細胞製剤として用いる他家移植が実用化に極めて近く、患者にとって非常に有益だと考えられる。

2. 研究の目的

他家由来の MSC を用いた再生療法によって、これまでにない積極的な抗炎症効果を期待し、さらに幹細胞による歯周組織再生が可能かどうかを適切に調査し、これらの細胞を歯周炎の細胞薬として活用を検討する。これらの結果を基に、他家細胞移植プロトコルを作成し、臨床応用へ推進することを目的とする。

3. 研究の方法

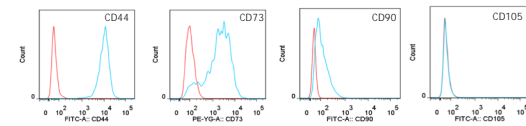
前臨床研究を行うため、マイクロミニピッグの下顎臼歯部(P3)の歯根分岐部に歯周炎を想定した骨欠損モデルを作成する。その後脂肪由来間葉系幹細胞を歯周炎モデルに他家移植を行う。移植された病変部は顎骨ごと継時的に摘出し、マイクロ CT 解析および組織標本を作成し、炎症程度や組織再生状態を免疫組織学的に観察する。

4. 研究成果

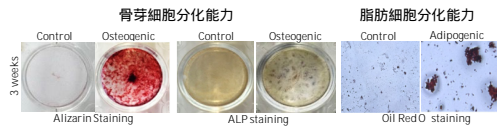
本研究では間葉系幹細胞としてマイクロミニブタの体網より脂肪由来間葉系幹細胞の分離培養技術の確立を行うため、コラゲナーゼによる細胞分離と密度勾配法による遠心分離を実施し、脂肪由来幹細胞を採取し、その機能を評価するため幹細胞の表面マーカー

の発現を FACS 解析にて評価した。その結果、ブタ由来脂肪幹細胞は CD44, CD73 陽性でヒト由来脂肪幹細胞とは異なり CD105 陰性であることが分かった。

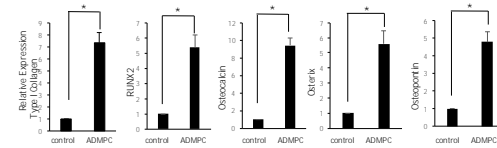
MSC表面抗原マーカーの発現



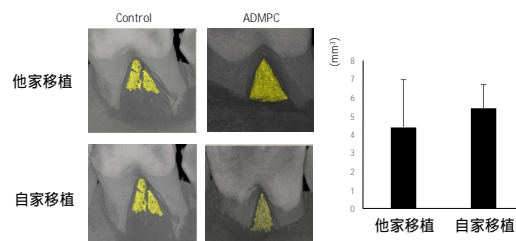
次に骨芽細胞分化能力を解析した結果、骨芽細胞分化誘導培地で処理することで脂肪幹細胞は石灰化能力、アルカリフォスファターゼ活性陽性であることがわかった。さらに、qPCR 解析により I 型コラーゲン、runx2, osterix, osteocalcin, および oteopontin を発現する骨芽細胞に分化することが確認された。また脂肪細胞分化誘導培地で処理することで脂肪由来間葉系幹細胞は oil red 陽性の脂肪細胞への分化も確認された。以上の事から脂肪幹細胞は骨芽細胞および脂肪細胞分化能力を有していることが判明した。



骨芽細胞マーカー遺伝子



他家移植後 1 ヶ月の μ CT 像において、コントロールでは分岐部での骨欠損が観察される。一方他家移植群においては分岐部における骨新生が観察された。3次元構築画像で比較したところ、コントロールと比較して分岐部での明確な骨新生が観察された。陽性コントロールである自家移植実験においても同様にコントロールと比較して分岐部に形成された骨欠損の再生効果を観察することができた。この結果より他家移植は自家移植と同様に歯周組織再生効果を有していることが示された。



本研究から得られた他家移植の前臨床研究の成果は、将来的な ADMPc による他家移植のプロトコル開発に寄与すると考えられる。

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 5 件)

1. Handa K, Abe S, Suresh VV, Fujieda Y, Ishikawa M, Orimoto A, Kobayashi Y, Yamada S, Yamaba S, Murakami S, Saito M. Fibrillin-1 insufficiency alters periodontal wound healing failure in a mouse model of Marfan syndrome. Arch Oral Biol. 2018 Jun;90:53-60. 査読あり <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.02.017>

2. Orimoto A, Kurokawa M, Handa K, Ishikawa M, Nishida E, Aino M, Mitani A, Ogawa M, Tsuji T, Saito M. F-spondin negatively regulates dental follicle differentiation through the inhibition of TGF- activity. Arch Oral Biol. 2017 Mar 1;79:7-13. 査読あり

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.02.019>

3. Iwamatsu-Kobayashi Y, Abe S, Fujieda Y, Orimoto A, Kanehira M, Handa K, Venkataiah VS, Zou W, Ishikawa M, Saito M. Metal ions from S PRG filler have the potential to prevent periodontal disease. Clin Exp Dent Res. 2017;3:126-133.

<https://doi.org/10.1002/cre2.70> 査読あり

4. Nakagaki S, Iijima M, Yasuda Y, Handa K, Koike T, Saito T, Mizoguchi I, Effectiveness of methods for detaching orthodontic implants likely to fracture upon rotational torque-an animal study, Clinical and Experimental Dental Research, Article first published online: 9 FEB 2016, DOI: 10.1002/cre2.20 査読あり

5. 歯学部臨床実習における老人福祉施設実習の意識調査、白井 要, 半田 慶介, 河野舞, 長澤 敏行, 江口 正尊, 越野 寿, 齋藤隆史, 古市 保志、北海道医療大学歯学雑誌 巻 : 34(1) ページ : 13-20, 2015 査読あり、<http://id.nii.ac.jp/1145/00010329/>

[学会発表](計 15 件)

1. 脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いた他家移植療法の前臨床研究に向けた取り組み、半田 慶介、齋藤 正寛、第 17 回日本再生医療学会 2018.3

2. ニッケルチタンファイルによる天然歯根管形成過程の X 線連続撮影、石幡 浩志、半田 慶介、齋藤 正寛、山田 聡、147 回日本歯科保存学会学術大会、2017.10

3. 結合組織破壊の分子メカニズムの新展開 Pannexin 3 は新骨形成制御因子である、石河 真幸, Williams Geneva L., 折本 愛, 半田 慶介, 山田 吉彦, 齋藤 正寛, 49 回日本結合組織学会学術大会 2017.06

4. 結合組織破壊の分子メカニズムの新展開 ADAMTS superfamily による Marfan 症候群の解離性大動脈瘤発症機構の解析、折本 愛、

石河 真幸, 半田 慶介, 千々岩 みゆき, 望月 早月, 村澤 祐介, 磯貝 善蔵, 岡田 保典, 齋藤 正寛, 49 回日本結合組織学会学術大会, 2017.06

5. 脂肪由来幹細胞を用いた歯周組織再生療法の開発 マイクロミニプタを用いた他家移植モデルの確立、V. ベンカタ・スレッシュ, 半田 慶介, 竹立 匡秀, 村上 伸也, 齋藤 正寛, 146 回日本歯科保存学会学術大会 2017.05

6. ADAMTSL6 を介した Marfan 症候群の解離性大動脈瘤発症機構の解析、折本 愛, 二木 正晴, 石河 真幸, 半田 慶介, 齋藤 正寛 146 回日本歯科保存学会学術大会 2017.05

7. Pannexin 3 による Wnt/ -catenin および p21 signaling を介した骨前駆細胞の増殖機構の解析、石河 真幸, 小林 洋子, 折本 愛, 半田 慶介, 齋藤 正寛、第 145 回日本歯科保存学会学術大会、2016-10-26

8. ADAMTS superfamily による新規結合組織破壊機構の解析、折本 愛, 半田 慶介, 齋藤 正寛、第 37 回日本歯内療法学会学術大会、2016-07-23

9. 未分化骨芽細胞移植を用いた歯周組織再生療法に関する研究、半田 慶介、二木 正晴、丸山 顕太郎、折本 愛、石河 真幸、根本 英二、齋藤 正寛、第 144 回日本歯科保存学会学術大会、2016-06-09

10. マイクロミニピッグを用いた間葉系細胞移植による歯周組織再生療法の開発について、半田 慶介、V. Venkata Suresh、二木 正晴、大倉華雪、松山晃文、村上伸也、齋藤 正寛、第 15 回日本再生医療学会総会、2016-03-17

11. 未分化骨芽細胞様細胞移植による歯槽骨再生療法について(第一報)プタ歯槽骨由来未分化骨芽細胞の特性、半田 慶介、丸山 顕太郎、根本 英二、齋藤 正寛、平成 28 年度秋季日本歯周病学会学術大会、2016-10-06

12. ADAMTSL6 が誘導する微細線維形成によるマルファン症候群モデルマウスの大動脈瘤悪化機構の解析、折本 愛, 半田 慶介, 村澤 裕介, 磯貝 善蔵, 齋藤 正寛、日本結合組織学会学術大会、2015-05-15

13. ADAMTSL6 を介したマルファン症候群モデルにおける組織破壊機構の解析 2015 著者名/発表者名折本 愛, 二木 正晴, 石河 真幸, 半田 慶介, 齋藤 正寛、第 143 回日本歯科保存学会、2015-11-12

14. S-PRG フィラー抽出液由来イオンによるマウス歯周炎モデル抑制機構の解析、小林 洋子, 兼平 正史, 半田 慶介, 齋藤 正寛、第 143 回日本歯科保存学会、2015-11-12

15. マルファン症候群モデルマウスにおける歯周炎の組織破壊機構に関する研究、半田 慶介, 折本 愛, 小林 洋子, 齋藤 正寛、第 142 回日本歯科保存学会、2015-06-25

[図書](計 3 件)

1. 再生医療 歯周組織における再生療法の

最前線と実用化への課題、半田慶介、齋藤正寛 Pharm stage 17(7), 10-15, 2017-10

2. 歯科再生・修復医療と材料、第 8 章歯周組織再生療法の実用化に向けた技術開発と課題、半田慶介、齋藤正寛、シーエムシー出版,2016

3. 口腔外科ハンドマニュアル '15, Chapter 3 口腔外科最新レビュー、口腔領域における再生医療の最前線 未分化骨芽細胞を用いた新規骨再生医療技術の開発、半田慶介、相野 誠、三谷章雄、齋藤正寛,2015

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

半田 慶介(HANDA, Keisuke)

東北大学大学院歯学研究科・講師

研究者番号：40433429

(2)研究分担者

齋藤 正寛 (SAITO, Masahiro)

東北大学大学院歯学研究科・教授

研究者番号：40215562

研究分担者

後藤 昌史 (GOTO, Masafumi)

東北大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50400453

(3)連携研究者

出澤 真里 (DEZAWA, Mari)

東北大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50272323