

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11234

研究課題名(和文) 歯周靭帯幹細胞の多分化能力を応用した 靭帯・腱の再生治療法の確立

研究課題名(英文) Development of the tendon/ligament regenerative therapy utilizing human multipotent periodontal ligament stem cells

研究代表者

大久保 直登 (OKUBO, Naoto)

北海道大学・薬学研究院・特任助教

研究者番号：00553207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、歯根膜組織中に再生医療に応用可能な多分化能力を有した歯根膜幹細胞が存在し、この幹細胞が3次元的な構造を有した血管を構築する能力や創傷治癒にとって必要不可欠な筋線維芽細胞への分化能力を有していることを報告してきた。今回の研究課題において、この歯根膜幹細胞を筋線維芽細胞へ分化させた際に生じる物理的な組織収縮力を利用することで、三次元的な靭帯様構造を作成することに成功した。作成した靭帯様構造は組織学的な靭帯構造と類似した、並行して整列したコラーゲン線維束を形成し、物理的な強度を有していた。本研究の成果により、将来的に歯根膜幹細胞が靭帯再生治療に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that Periodontal ligament stem cells(PDLSCs) possess the capacity to construct three-dimensional blood vessel structures in vitro and can differentiate into the activated fibroblasts called myofibroblasts, which is essential for wound healing process. Here in this study, we report that PDLSCs can construct three-dimensional ligament like structure in vitro to utilizing the collagen gel contractile activity which produced when PDLSCs differentiated into myofibroblasts. This constructed ligament like structure not only has dense collagen fibers that parallel to one another but possess physical strength not to break off when it pulled both sides with fingers. These promising results suggesting that PDLSCs may provide a new therapeutic application for ligament/tendon regenerative therapy.

研究分野：医科・歯科再生医療

キーワード：再生医療 組織幹細胞 歯根膜幹細胞 靭帯再生 腱再生

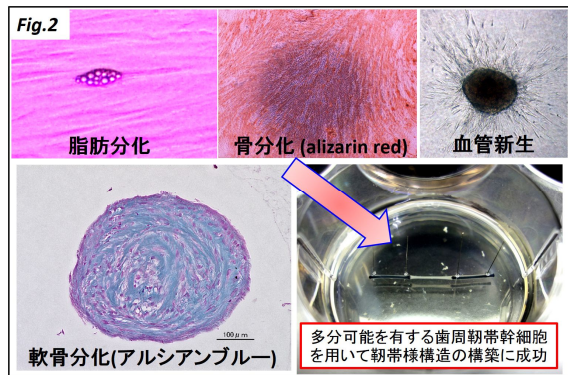
1. 研究開始当初の背景

歯周靭帯とは、歯根と歯槽骨の間に介在する線維性結合組織である。その由来を示す歯周靭帯マーカー遺伝子の一つとして、転写因子『*Scrx1*(*Scx*):スクレラキシス』は広く認識されているが、*Scx* は元来靭帯・腱などの強靭結合組織の発生過程においてその初期分化マーカー遺伝子として見出されたものである。さらに最近、靭帯・腱の成熟化にかかわる重要な後期分化マーカー遺伝子として認識されていた『*Tenomodulin*(以後、*Tnmd*):テノモジュリン』が歯周靭帯においても強く発現しており、歯周組織の維持に関わっている可能性が示された (Komiya et al., 2013)。この *Tnmd* は、前述の *Scx* によって発現が正の方向に制御されているという報告も存在しており (Qi et al., 2012)、このような背景から「*Scx* - *Tnmd*」の双方の強い発現を有する歯周靭帯幹細胞が靭帯損傷患者に対する靭帯・腱組織の供給源になり得る可能性は非常に高いと考えられる。

一方、歯周靭帯組織中には間葉系幹細胞が存在し、この細胞が線維芽細胞・骨芽細胞ならびにセメント芽細胞に分化し、硬組織および線維性軟組織を形成するという報告は多数あるが (Seo et al., 2004) この細胞が歯周靭帯中の血管細胞や血球細胞に分化しうるかどうかは全く明らかにされていなかった。この点に着目し我々はこれまでに歯周靭帯組織中に血液供給のために欠くことのできない血管構造を構築できる能力を有する幹細胞が存在することを報告し (Okubo et al., 2011)、さらにこの歯根膜幹細胞がコラーゲンゲルを利用した3次元培養において血管のみならず、構築した血管腔内において血球細胞をも誘導する能力を有することも確認し (Fig.1 左)、同じ

幹細胞が *in vitro* 細胞培養系において神経系分化誘導刺激を加えることで神経様形態を呈することも確認している (Fig.1 右)。

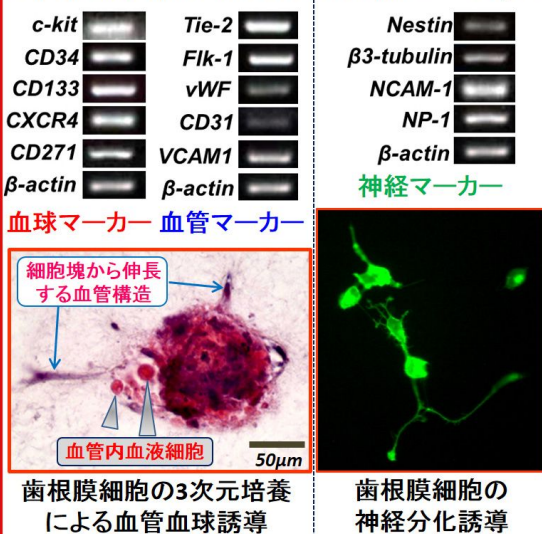
このような多分化能を有する歯周靭帯幹細胞を臨床での利用応用につなげるため、我々はヒト歯周靭帯組織から効率よく幹細胞画分を抽出するための採取方法や培養方法についての様々な検討を行っており、現在までに Fig.2 に示すような間葉系幹細胞様の多分化能力を有する歯周靭帯幹細胞画分の再現性のある増殖方法を確立しており、さらにこの培養法で誘導した歯周靭帯幹細胞を用いて *in vitro* において3次元的な構造を呈する弾性・靭性を有した靭帯様構造を構築できることを確認しているが、いまだ安定してこの構造を作成するプロトコールとこれに適した幹細胞の選定に至っていない。



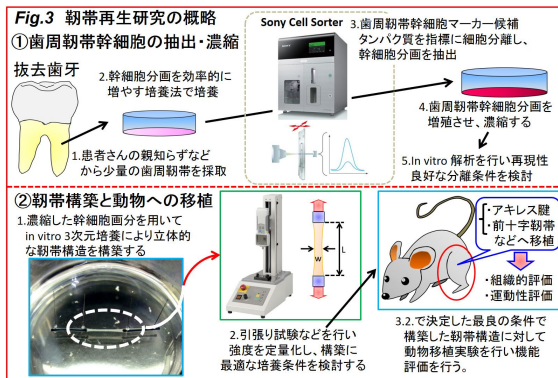
2. 研究の目的

本研究の目的は研究の背景(1)で述べた歯根膜幹細胞による靭帯構造の形成の可能性を検討することを目的とする。まず3次元培養により *in vitro* 環境にて効率よく靭帯構造を形成するために必要なサイトカインなどの誘導因子の検討を行う。続いて、作成する靭帯の質を向上させるために、ヒト歯周靭帯組織より靭帯への分化能力に優れた幹細胞画分を再現性良く抽出するための条件(維持する培養条件の選定やソーティングに用いる表面抗原の選定)を明らかにしたい。その後、靭帯分化能力の評価系として Fig.3 に示すように3次元靭帯構築系によって作成した靭帯様構造に対して引張り試験などを行ない機械的な強度を定量化することで、靭帯構築の際の最適な誘導条件を検討する。さらに、作成した靭帯様構造の最終機能評価法として、ヌードマウスのアキレス腱や前十字靭帯に対し部分欠損や完全欠損を作成し、そこへ作成した靭帯様構造を移植し組織学的評価や運動性の評価等を行うことにより、口腔組織由来である歯周靭帯幹細胞を靭帯・腱

歯根膜幹細胞が有する多分化能力 Fig.1



損傷患者における靭帯・腱再生治療に利用できる可能性を検討したい。

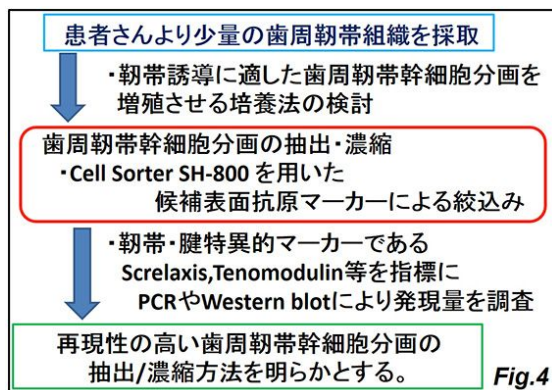


3. 研究の方法

(1)靭帯への分化に適した歯周靭帯幹細胞画分の抽出・濃縮方法の確立

患者さんより少量の歯周靭帯組織を採取し、まずは靭帯分化誘導に適した幹細胞画分を効率的に増殖させる培養条件の検討を行う。複数の幹細胞マーカー遺伝子の発現や多分化能力を指標に選別が完了した後、発現が向上したことで分離効率の上がった幹細胞マーカーを標的として Cell sorter により細胞分離を行い、より良質な歯周靭帯幹細胞画分の抽出を行う。

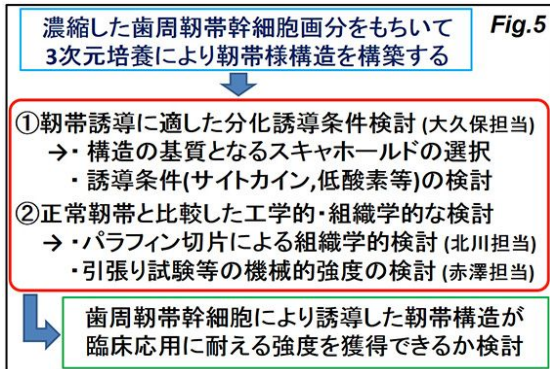
この際の選定条件の指標として、靭帯・腱特異的マーカーである前述の scx や Tnmd の Realtime PCR による遺伝子レベルの発現や Western blot によるタンパク質レベルの発現を調査する。



(2)濃縮した歯周靭帯幹細胞画分を用いて in vitro で成熟靭帯構造誘導法を確立

現行の3次元培養による靭帯様構造の構築方法においては、構築に用いるスキャホールドとなるタイプ コラーゲンゲルの濃度の調整やスキャホールド自体の変更、構築に用いる培養環境など可変可能な要素が多く存在するが、これらを変更することでより良質な靭帯様構造を作成できる可能性は高い。条件検討を行うことで更なる改善

が可能である。以上のように誘導した靭帯様構造に対して、パラフィン切片の作成し組織学的構造解析や免疫染色法を用いた Scx, Tnmd のタンパク質発現解析を行い正常靭帯組織との比較を行う。工学的な手法として引張り試験や弾性試験などを行い、機械的な強度を測定・定量化することで、臨床応用可能な構造体を形成できるかを検討する。



(3)作成した靭帯構造に対しマウス移植モデルを用いてその機能を評価

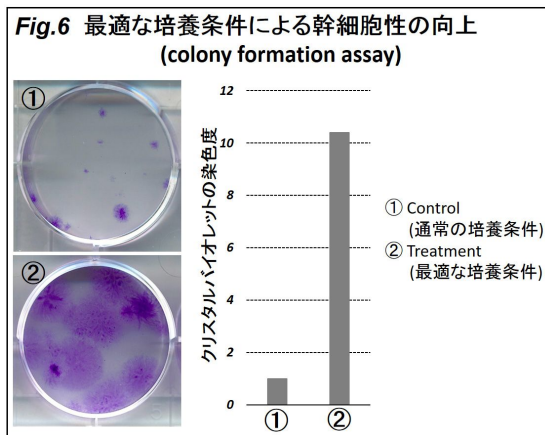
歯周靭帯幹細胞より作成した良質な靭帯構造体に対して、マウスによる移植実験を行い最終的な機能的評価を行う。前年度までに正常靭帯組織と比較して遜色のない機械的強度を獲得できた場合には、マウス後肢の前十字靭帯やアキレス腱の外科的な完全断裂モデルを作成し、これに対して歯周靭帯幹細胞により構築した靭帯様構造を用いた再建治療を実施する。一定の治癒期間を設けた後、移植部位に対するパラフィン切片などを作成し、治癒の程度に対して経時的な治癒過程の観察や組織学的、免疫組織化学的に成熟な人体組織の再構成が可能かどうかの評価を行う。さらに、機能的評価として行動学的な運動性の評価なども行うことで、総合的な評価を行う。以上の計画を3年計画として実施し、口腔由来組織を用いた靭帯再生治療の実現を目指す。

4. 研究成果

(1)靭帯への分化に適した歯周靭帯幹細胞画分の抽出・濃縮方法の確立

我々は以前より、歯根膜組織を採取し、その組織を初代培養する時点から想定される歯根膜幹細胞を維持するのに適した周囲環境(niche 環境)を培養液等により模倣することで、これまでに報告されているよりも、より幹細胞性の高い true Periodontal ligament stem cell を採取できると考えてきた。この仮説に基づき今回、幹細胞性が反映されるというコロニーフォーメーション

アッセイ等を評価指標として、新たな多分化能力の高い歯根膜幹細胞の抽出方法の検討を試みた。様々な培養条件の検討を行った結果、ある条件で培養抽出を行った際、従来の方法と比較してコロニー形成能が 10 倍以上高くなる幹細胞画分を効率よく濃縮する方法を確立した。(Fig.6)

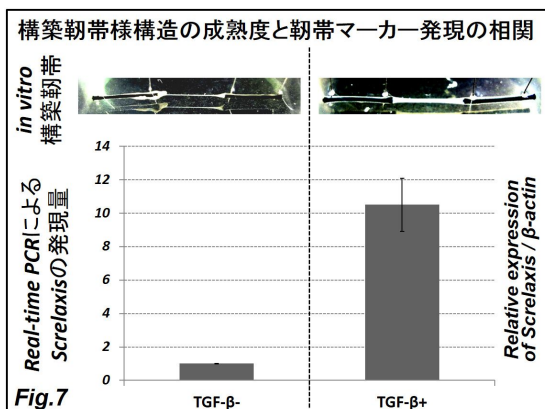


今後、この幹細胞画分を Cell sorting などによってさらに濃縮することで、臨床に活用可能な歯根膜幹細胞の抽出方法の確立を目指す。

(2)濃縮した歯周靭帯幹細胞画分を用いて *in vitro* で成熟靭帯構造誘導法を確立

歯周靭帯を分化誘導するのに適した歯根膜幹細胞の評価に対し、計画では, scx や Tnmd を用いる予定であったが、ともに分化型マーカーであるため、1st screening にこれらのマーカーを用いることはできなかった。そこで、TGF- 刺激により靭帯誘導刺激を加えた際の Scx 遺伝子の発現上昇率が最も高い歯根膜幹細胞の抽出方法として(1)と連動させてデータ採取を行った。結果として、(1)で示したコロニー形成能と TGF- 誘導性の Scx の発現上昇率は相関していた。

さらに興味深いことに、Scx の発現上昇と 3 次元培養による靭帯様構造の形成も相関することが判明した。(Fig.7)



これらのデータにより、(1)で抽出した歯根膜幹細胞画分は、靭帯様構造の形成能力の優れた歯根膜幹細胞であり、さらに、この幹細胞をもとに 3 次元培養によって構築可能な靭帯様構造は、マーカーの発現からも靭帯構造である可能性が強く示唆された。

続いて、この靭帯様構造のより詳細な組織学的解析を行うため、作成した靭帯構造に対しパラフィン包埋後、組織切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色による形態学的な観察、および、コラーゲン線維を染色する Azan 染色・Alcian Blue 染色により、評価を行った。その結果、組織学的に、靭帯構造に非常に類似した形態を有する靭帯様構造であることが判明し、さらに、その内部は靭帯構造同様にコラーゲン線維が密に配列し、規則的な配列をなすことが判明した。

ここまでは計画通り順調に推移したが、作成した靭帯様構造の機能的な評価として、引張試験を行い、その強度を定量的に評価しようと試みたが、サンプルを把持する部分などで難航し、いまだ定量が完了していない。今後この方法を成熟化させ機能的な評価を行うことを目標とした。定量性はないが、手でつかんで引っ張った感触では、非常に強靭で簡単には引きちぎることのできない強度のものは完成している。

(3)作成した靭帯構造に対しマウス移植モデルを用いてその機能の評価

作成した靭帯のマウスへの移植実験を行い、本靭帯構造が機能的な構造体であるかの評価を試みた。しかし、靭帯移植実験は非常に困難であり、いまだそのシステム作りに難航している。今後は、形成外科など専門分野の研究者との共同研究などの可能性を探ることで、動物実験を成功させることを目標とする。

以上の様に、3 次元的な靭帯構造を作成するのに適した歯根膜幹細胞の抽出方法の確立と、機械的な強度を有した靭帯様構造の形成までは順調に進んだ。それ以降の引張試験と動物実験において、今後の課題とする。

後半の実験が難航したため、TGF- により靭帯様構造を形成するメカニズムについての基礎的な研究を進めた結果、この靭帯構造形成に必要な収縮能力を発現させる部分で、TGF- 誘導性の筋線維芽細胞分化が一役買っている可能性が示唆された。この基礎的な解析においても、近日中に報告できる予定となった。

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 6 件)

1. Ohta M., Okubo N. (5th), et al. (査読有)

“ IL-1 and TNF- suppress TGF- β -promoted NGF expression in periodontal ligament-derived fibroblasts through inactivation of TGF- β -induced Smad2/3-, and p38 MAPK-mediated signals.”

International Journal of Molecular Medicine, 2018 *in press*

2. Shakya M., Okubo N. (3rd), et al. (査読有)

“ Microcracks design and bone induction of skull bone modified by ultrasonic treatment using acidic electrolyzed water.”

Phosphorus Research Bulletin, 2017;33:1-6
doi: <https://doi.org/10.3363/prb.33.1>

3. Takizawa N., Okubo N. (Co-1st), et al. (査読有)

“ Bone marrow-derived mesenchymal stem cells propagate immunosuppressive/anti-inflammatory macrophages in cell-to-cell contact-independent and -dependent manners under hypoxic culture.”

Experimental cell research, 2017;358:411-420

doi: 10.1016/j.yexcr.2017.07.014.

4. Nozaki R., Okubo N. (7th), et al. (査読有)

“ Znthoxylum fruit extract from Japanese pepper promotes autophagic cell death in cancer cells.”

Oncotarget. 2017;7:70437-70446.

doi: 10.18632/oncotarget.11926.

5. Fujitsuka N., Okubo N. (20th), et al. (査読有)

“ Increased ghrelin signaling prolongs survival in mouse models of human aging through activation of sirtuin1.”

Molecular psychiatry, 2016
21:1613-1623.”

doi: 10.1038/mp.2015.220.

6. Nakagawa K., Okubo N. (6th), et al. (査読有)

“ PIAS3 enhances the transcriptional activity of HIF-1 by increasing its

protein stability.”

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016;15:470-476.”

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.047.

[学会発表](計 13 件)

1. 客本 斉子、大久保 直登 他

“ マウス骨髄由来培養細胞において間葉系幹細胞は未分化単球/マクロファージを免疫抑制性マクロファージへと誘導する：細胞接着の関与.”

第 58 回歯科基礎医学会学術大会 2017

2. 村田 勝、大久保 直登 他

“ 自家象牙質移植による再生骨の組織学的証拠.”

第 26 回硬組織再生生物学会 2017

3. 大久保 直登 他

“ ラット歯根膜幹細胞由来筋線維芽細胞の収縮作用による歯周免疫機構への物理的関与.”

第 26 回硬組織再生生物学会 2017

4. Mamata Shakya, Naoto Okubo 他

“ Bone induction on surface of rat compact bone treated with ultrasonic irradiation and acidic electrolyzed water.”

第 26 回硬組織再生生物学会 2017

5. 客本 斉子、大久保 直登 他

“ マウス骨髄由来間葉系幹細胞は共培養下で未分化単球/マクロファージ系細胞を CD206 陽性の免疫抑制性(M2)マクロファージに分化誘導する.”

第 57 回歯科基礎医学会学術大会 2017

6. Naoki Takizawa, Naoto Okubo 他

“ Mesenchymal stem cells educate undifferentiated monocyte/macrophages to the M2 macrophages in cell-cell adhesion-dependent and independent ways.”

第 65 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 学術大会 (国際学会) 2017

7. Seiko Kyakumoto, Naoto Okubo 他

“ Bone marrow-derived mesenchymal stem cells propagate immunosuppressive/anti-inflammatory macrophages in cell-to-cell contact-independent and -dependent manners under hypoxic culture.”

第 40 回日本分子生物学会年会 2017

8. Shakya M., Okubo N. 他

“ Microcracks Design and Bone Induction of Skull Bone Modified by Ultrasonic Treatment using Acidic Electrolyzed

Water.”

The 9th International Symposium on Inorganic Phosphate Materials(ISIPM-9) 2016

9. Kyakumoto A., Okubo N. 他

“ MSCs educate undifferentiated monocytes/macrophages to the immunosuppressive macrophages in the co-culture of bone marrow cells:implication of adhesion.”

第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2016

10. Ohnishi S., Okubo N. 他

“ The hypophagia after psychological stress in aged male mice is mediated by an interaction of activation of estrogen receptor with serotonin 2C receptor.”

Digestive Disease Week(国際学会) 2015

11. Kyakumoto S., Okubo N. 他

“ MSCs educate undifferentiated monocytes/macrophages to the CD206-positive immunosuppressive (M2) macrophages in the co-culture of mouse bone marrow cells.”

BIT 's 6th World Gene Convention-2015. (国際学会) 2015

12. Kyakumoto S. Okubo N. 他

“ MSCs educate undifferentiated monocytes/macrophages to the CD206-positive immunosuppressive (M2) macrophages in the co-culture of mouse bone marrow cells.”

第 5 7 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2015

13. 赤澤 敏之、大久保 直登 他

“ エレクトロスピンニング法による細胞培養用複合基材の作製と歯根膜細胞の培養特性.”

日本セラミックス協会第 27 回秋季シンポジウム. 2015

〔図書〕(計 1 件)

1.大久保直登, 石川正浩.

“ レガシーショートインプラントと象牙質移植 DDM (Demineralized Dentin Matrix) で対応した骨吸収部へのアプローチ.”

インプラント YEARBOOK 2017. 51-54.クインテッセンス出版

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：歯根膜幹細胞が濃縮された細胞集団の製造方法

発明者：大久保 直登

権利者：国立大学法人北海道大学

種類：特許願

番号：特願 2017-198072

出願年月日：平成 29 年 10 月 11 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/byoutai/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大久保 直登 (OKUBO, Naoto)

北海道大学・薬学研究院・特任助教

研究者番号：00553207

(2) 研究分担者

北川 善政 (KITAGAWA, Yoshimasa)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：00224957