様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ５ 月 ３０ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ１１３８７

研究課題名（和文）低酸素バイオロジーを体性幹細胞に応用した歯周組織再生能の賦活化

研究課題名（英文）Enhancement of stem cell induced-periodontal tissue regeneration by utilizing hypoxia biology

研究代表者

竹立　匡秀（Takedachi, Masahide）

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：６０４５２４４７

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）：本研究課題では、間葉系幹細胞移植による歯周組織再生効果を増大させることを目指し、低酸素が同幹細胞および歯周組織構成細胞の性状に及ぼす影響を解析した。その結果、脂肪組織由来多系統前駆細胞は低酸素環境下において骨芽細胞への分化が抑制されることが明らかになった。さらに、歯周組織構成細胞の低酸素応答として、PLAP-1、コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外気質の産生が制御される一方で、PLAP-1は低酸素応答を調整する役割を担うことが明らかとなった。以上結果は歯周組織における低酸素応答が細胞外気質産生制御によって制御を受ける可能性を明らかにしたものといえる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we intended to demonstrate the molecular mechanisms by which periodontal tissue regeneration was enhanced with mesenchymal stem cell transplantation. Then, we conducted experiments to examine hypoxic responses in mesenchymal stem cells and periodontal cells. As a results, osteoblastic differentiation of adipose tissue-derived multi lineage progenitor cells was suppressed in hypoxic condition. In addition, several kinds of extracellular matrices such as PLAP-1, type I collagen and fibronectin were increased in hypoxia while PLAP-1 could regulate hypoxic responses by HIF-1. These results suggested that hypoxia might affect the cellular responses of periodontal cells through extracellular matrices production.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生　低酸素　幹細胞

１．研究開始当初の背景

今日の歯科臨床で用いられているGTR法やエムドゲイン・サイトカインの局所投与などの歯周組織再生療法は、歯周組織に内在する幹細胞（歯周組織幹細胞）のもつ自己修復力を活性化することにより歯周組織の再生を図る治療法と捉えることができる。一方で、生体内の幹細胞数は加齢とともに減少し、歯周組織幹細胞の増殖能や分化能も低下することが報告されている。また、重度の歯周病罹患歯では、歯周組織幹細胞の保管庫とされる歯根膜の破壊がすすんでいることから、十分な再生効果が期待できない場合も少なくない。そこで、他の組織より採取した幹細胞を歯周組織欠損部に移植することにより、歯周組織再生を促す治療法の開発が進められている。申請者らは、採取に際して患者への負担が少なく、安全性も高いと考えられる脂肪組織中に存在する未分化間葉系幹細胞（Adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells:ADMPC）に着目し、ADMPC移植による歯周組織再生誘導効果について前臨床研究にて明らかにし（*Inflammation and Regeneration*, 34:109-116, 2014）、現在、大阪大学歯学部附属病院にて臨床研究「自己脂肪組織由来幹細胞を用いた新しい歯周組織再生療法開発」を実施している。

幹細胞移植による歯周組織の再生誘導には、移植した幹細胞が被移植部位に生着し、歯周組織構成細胞との調和のなかで、歯周組織幹細胞としての役割を果たすことによって達成されると考えられる。しかしながら、一般に、移植した幹細胞の組織への生着率は自己由来の細胞であっても決して高くないことが明らかになっている。その原因の一つに移植前の細胞培養環境と生体内の移植部位における酸素濃度の差が挙げられる。*in vitro* における培養は、通常 20%酸素濃度下にて行われるが、生体内における酸素濃度は肺や一部の血管で15%程度、心臓では10－5%、その他の組織では5－1%以下である。さらに、組織の再生が必要となる被移植部位では、炎症や酸化ストレス等に伴う血流障害によって通常より酸素供給が低下しているものと考えられる。そのような環境に速やかに順応、生着し、組織再生の役割を効率よく果たすことができる幹細胞を、標的とする組織に特異的に調製する方法が確立されれば、幹細胞移植による再生治療の予知性の向上に大いに寄与するものと考えられる。

一方、移植された幹細胞は、種々の液性因子を分泌することにより被移植部位周囲の細胞を活性化する（Trophic 効果）とともに自らの生存環境を整備しつつ、組織を構成する細胞へと直接分化を遂げる（Repair 効果）ことで、組織の再生を果たすものと考えられている。申請者らは、*in vitro* の研究からADMPC が骨・セメント質といった硬組織形成細胞や歯根膜細胞への分化能を有することを報告すると共に、予備実験の結果としてADMPC 由来液性因子が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進的に制御している可能性があることを見出している。そしてこのような幹細胞による歯周組織再生の分子機序は、歯周組織に移植された幹細胞近傍の微小環境における酸素濃度によっても修飾・制御されているものと想定される。

近年、生体内における幹細胞の存在部位として幹細胞ニッチの研究が盛んに行われ、その微小環境の形成に低酸素が重要な役割を担っていることが明らかになってきた。低酸素環境は、低酸素誘導因子 HIF を介して幹細胞の代謝を調節することにより、幹細胞の老化を抑制するとともに酸化ストレスに対する抵抗性を亢進させる作用をもつ。一方で、多分化能の維持や各種成長因子の分泌を促進する作用をもつことも明らかになっている。すなわち、HIF を介した幹細胞の低酸素応答は、幹細胞の組織再生能を賦活化する重要なシグナルであるのみならず、その応答を上手く活用することは幹細胞移植治療用の良質な幹細胞の調製にも有用であることを強く示唆している。興味深いことに、申請者らの予備実験により、低酸素環境が歯根膜特異的に発現する細胞外基質である PLAP-1 の産生を亢進する一方で、同分子がHIFの機能を制御する可能性があることを見出している。このことは歯周組織特異的な低酸素応答制御システムが存在することを示唆しており、移植された幹細胞の機能を調整する機序の一つとして機能しているものと推測される。しかしながら、歯周組織に移植された幹細胞近傍の微小環境の構成や、同微小環境に対する幹細胞の低酸素応答性については未だほとんど解析されていない。

２．研究の目的

本研究課題では、間葉系幹細胞移植による歯周組織再生効果を増大させることを目指し、同上幹細胞の至適微小環境を低酸素の観点から明らかにすることを目的とし、研究を遂行した。

３．研究の方法

1) 細胞培養

低酸素下での培養は、酸素濃度を調整することができる O2-CO2 インキュベータを用いて行った。

骨芽細胞への分化誘導は、10mMベータグリセロリン酸、50ug/mL アスコルビン酸含有の石灰化誘導培地を3日ごとに交換して行った。

2) Real-time PCR法による遺伝子発現解析

培養細胞から核酸抽出試薬 RNA-Bee™（TELを用いて抽出し、精製した全RNAを鋳型として、Random Hexamer Primer、M-MLVを用いて逆転写反応を行い、cDNAを作製した。

遺伝子発現解析は、得られた cDNA を鋳型として、各遺伝子特異的なReal-time PCR用プライマー、Fast SYBR® Green PCR Master Mixを用いて、Step One Plus Real-time PCR

System にて解析した。なお、各遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子の一つである *hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT)* 内在性コントロール遺伝子として同遺伝子の発現量に対する相対量として算出した。

3) Western blotting 法による解析

培養細胞を PBS にて 2 回洗浄した後にプロテアーゼインヒビターカクテル錠、10 mM フッ化ナトリウム、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、10 mM beta-グリセロリン酸を加えた RIPA Lysis Buffer を加え、4℃で 20 分間処理した後回収し、さらに遠心(12000 rpm、4℃、20 分) 後に、上清を回収した。核タンパク質は Nuclear extract kit (ACTIVE MOTIF、Carlsbad) を用いて精製した。いずれのサンプルも、Bradford 法にてタンパク量を算出した後、濃度を同値に調整した。その後、2-ME による還元下にて SDS-PAGE にて電気泳動を行い、PVDF トランスファーメンブレンに転写後、5%スキムミルク含有バッファーにてブロッキングを行った。そして HIF-1 分子に対する特異抗体および HRP 標識二次抗体を順次反応後、ECL を用いて発光シグナルを検出した。

4) 免疫傾向細胞染色方による解析

培養細胞を 4%PFA にて固定後、PBS にて洗浄し、1.5%BSA 含有 PBS にてブロッキングした。その後それぞれの分子に対する特異抗体および蛍光標識二次抗体を用いて染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。

5) マウス絹糸結紮

C57BL/6 の上顎第二臼歯に 5-0 絹糸 を結紮し、7 日後に過剰麻酔により屠殺後、上顎骨を採取した。凍結切片を作製後、レーザーマイクロダイセクションにて歯根膜組織を採取し、LC-MS/MS 分析を行った。

４．研究成果

低酸素環境での培養がヒトADMPCの歯周組織構成細胞への分化能に及ぼす影響について検討した。ヒトADMPCを1%酸素濃度にて培養した際の歯根膜組織マーカーであるPLAP-1の発現を検討したところ、酸素濃度の低下によって同分子の発現に変化はなかった。続いてADMPCを1%あるいは20%酸素濃度下にて石灰化誘導培地を用いて培養し、骨芽細胞分化に必須の転写因子RUNX2の発現を検討したところ、1%酸素濃度下での培養では、同分子の発現が低下していることが明らかとなった。続いてADMPCを骨芽細胞へ分化誘導した後の、低酸素に対する応答性を検証するために、石灰化誘導培地にてADMPCを6日間培養した後、1%あるいは20%酸素濃度にて培養を2日間継続した際の各種遺伝子発現をPCR法にて検討した。その結果、アルカリフォスファターゼやRunx2遺伝子の発現は、20%酸素濃度での培養に比べ、1%酸素濃度での培養で低下していることが明らかとなった。一方でI型コラーゲンやVEGF遺伝子の発現は1%酸素濃度の培養にて上昇することが明らかとなった。

以上の結果から、低酸素環境がADMPCの骨芽細胞への分化を抑制することが示唆された。

次に歯周組織特異的な低酸素応答について明らかにするために、歯根膜特異的細胞基質PLAP-1が低酸素誘導因子HIFに及ぼす影響について検討を行った。歯根膜細胞のPLAP-1をsiRNAにて抑制した細胞株を作成し、同細胞を1%酸素濃度下にて2時間培養した際のHIF-1alphaの発現を検討したところ、PLAP-1の抑制によりHIF-1alphaの発現が亢進することが明らかとなった。

続いて歯周組織の低酸素応答について検討するために歯周組織構成細胞である歯肉線維芽細胞および歯根膜細胞を1%酸素濃度にて培養した際の細胞外基質産生について検討したところ、ウェスタンブロットおよび免疫染色による解析から、培養上清中のI型コラーゲンおよびフィブロネクチンの発現が上昇していることが明らかとなった。興味深いことにコラーゲン、フィブロネクチン両分子とも遺伝子レベルでの上昇は認めなかったことから、低酸素環境が転写後の修飾に関与していることが示唆された。なお、バーシカン、デコリン、バイグリカンの発現は酸素濃度に違いによる変化を認めなかった。

以上の結果から、低酸素環境が歯周組織構成細胞の細胞外気質産生制御に関与し、なかでもPLAP-1は低酸素応答を調整していることが示唆された。

歯周病の病巣局所における間葉系幹細胞を取り巻く環境と低酸素との関連について検索するために、歯周組織幹細胞が内在する歯根膜組織に着目し、マウス実験的歯周病モデルを用いて歯根膜組織における分子の発現変化について検討を行った。すなわち、C57BL/6マウスの上顎第二臼歯に5-0絹糸を結紮し、7日後の歯槽骨吸収をmicroCTにて確認した。一方で、新鮮凍結切片を作製し、レーザーマイクロダイセクションにて歯根膜組織を採取した。コントロールとして、同一個体の非結紮側を用いた。そして、得られた歯根膜組織におけるタンパク発現をLC-MS/MS分析にて解析した。その結果、結紮側の歯根膜組織において54個の分子が非結紮側に比べ有意に発現上昇することが明らかとなったが、上昇する分子群に低酸素によって誘導される分子は検出されなかった。一方で、これまでに我々は、低酸素が歯肉線維芽細胞や歯根膜細胞におけるコラーゲンおよびPLAP-1の発現を亢進させることを明らかにしてきたが、両分子の発現は結紮側で有意に低下することが明らかとなった。このことは、歯周病局所の歯根膜組織においては低酸素応答が低下していることを示唆している。

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)

〔学会発表〕（計１１件）
① Asae Hirai, Masahide Takedachi, Chiaki Morimoto, Satomi Yamamoto, Keigo Sawada, Yoichiro Kashiwagi, Tomoaki Iwayama, Shinya Murakami; Suppressed expression of PLAP-1 in murine periodontitis, 12th Asian Pacific Society of Periodontology, Seoul, 2017
② 森本千晶、竹立匡秀、山本智美、平井麻絵、沢田啓吾、中村友美、山下元三、村上伸也；低酸素状態が歯周組織構成細胞のコラーゲン産生に及ぼす影響、第 60 回春季日本歯周病学会、福岡、2017
③ Chiaki Morimoto, Masahide Takedachi, Satomi Yamamoto, Asae Hirai, Keigo Sawada, Tomoaki Iwayama, Tomomi Nakamura, Motozo YAMASHITA, Shinya Murakami ; Hypoxia affects extracellular matrix production in periodontal cells, IADR GENERAL SESSION, San Francisco, 2017
④ Chiaki Morimoto, Masahide Takedachi, Satomi Yamamoto, Asae Hirai, Keigo Sawada, Tomoaki Iwayama, Tomomi Nakamura, Motozo Yamashita, Shinya Murakami; The Effects of hypoxia on collagen production in gingival fibroblasts, IADR GENERAL SESSION, Seoul, 2016
⑤ 山本　智美、竹立　匡秀、岩山　智明、森本　千晶、平井　麻絵、沢田　啓吾、粟田敏仁、山田　聡、村上　伸也；歯根膜細胞における PLAP-1 による低酸素応答、第 59 回春季日本歯周病学会、鹿児島、2016
⑥ 森本　千晶、竹立　匡秀、山本　智美、平井　麻絵、沢田　啓吾、中村　友美、山下元三、村上　伸也；低酸素状態が歯肉線維芽細胞のコラーゲン合成に及ぼす影響、第 59 回春季日本歯周病学会、鹿児島、2016
⑦ 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、北村正博、村上伸也；ADMPC 移植による歯周組織再生誘導効果とその作用機序の検討、第 59 回春季日本歯周病学会、鹿児島、2016
⑧ 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 回日本再生医療学会総会、大阪、2016
⑨ Satomi Yamamoto, Masahide Takedachi, Keigo Sawada, Chiaki Morimoto, Asae Hirai, Tomoaki Iwayama, Toshihito Awata, Satoko Yamaba, Satoru Yamada, Shinya Murakami; Mutual Regulation between Hypoxic Responses and PLAP-1 in Periodontal Ligament Cells, International Symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Diseases, Suita, 2016
⑩ 山本智美、竹立匡秀、沢田啓吾、山羽聡子、森本千晶、山田聡、村上伸也；歯根膜細胞における PLAP-1 による低酸素応答の制御、第 142 回春季日本歯科保存学会、北九州、2016
⑪ 竹立匡秀；脂肪組織由来多系統前駆細胞（ADMPC）移植による歯周組織再生療法の開発、第 142 回春季日本歯科保存学会、北九州、2016

６．研究組織
(1)研究代表者
竹立　匡秀（TAKEDACHI, Masahide）
大阪大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：60452447

(2)研究分担者
山田　聡（YAMADA, Satoru）
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：40359849

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