

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15805

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を用いた自律反応型メカノセンサーの開発

研究課題名(英文) Development of an autonomic proactive mechanosensor using mesenchymal stem cells

研究代表者

鮎川 保則 (AYUKAWA, YASUNORI)

九州大学・大学院歯学研究院・准教授

研究者番号：50304697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯・歯周組織やインプラントの長期にわたる健康を維持するための重要なものとして力のコントロールが挙げられる。本研究では、全身投与されたMSCが炎症局所に集積する性質を利用し、緑色の蛍光を発するタンパク質(GFP)の遺伝子を導入した動物より採取したMSCを用いて、実験的にラット骨に2本のインプラントを埋入し、overloadを付与した局所におけるMSCの集積を検討することとした。その結果、投与されたMSCが応力に反応してインプラント周囲に局所集積することが示唆された。このことより、MSCがoverload局所に集積することによってメカノセンサーとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Overload is one of the most important factors leading to deterioration of periodontal and peri-implant tissue and control of load is a crucial factor for long-time good prognosis. In the present study, we pursued the possibility of systemically-administered mesenchymal stem cells (MSC), which has a characteristic of inflammation-homing, as a sensor for overload. MSC was obtained from MSC gene-transfected rat and systemically administered. In parallel, implants were placed into rat bone and pathological overload was provided to implants. As a result, MSC accumulated to bone around overloaded implant. This may imply the capability of MSC as a mechanosensor to visualize the overload.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：間葉系幹細胞 歯科補綴学 メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

歯科治療の成功は適切な力のコントロールと関連している。例えば歯周治療においては、力のコントロールに配慮せず炎症のコントロールのみに注力しても歯周状態の改善は困難である。また、補綴治療において不適切な早期接触等を咬合に付与してしまうと、咬合性外傷のような状態を惹起することがある。これらの場合、現状では適切な咬合接触やガイドの付与、多数歯の連結による応力の分散、メンテナンスにおける咬合状態の変化に対する対応（咬合調整等）を主な対処法としている。また、インプラント治療において過度な骨の圧迫を行うとインプラント周囲の骨吸収を惹起することが知られているが、これに対しては、過度な骨の圧迫を避ける術式の選択、応力を緩和する形状を有するインプラントの選択等が推奨されている。しかし、歯周疾患、咬合、インプラントのいずれにおいても、これらの対処法は明確なエビデンスを欠くことが多く、術者の経験に頼った介入を行わざるを得ないことが少なくない。また、過大な応力と、その結果として起こる骨吸収などの有害事象の関連が必ずしも明確ではない。また、インプラントのデザインの妥当性に関しては、その治療の長期予後でしか判定が難しい。このように、力と歯科におけるクリニカルアウトカムの間には多数の問題点を有しているといえる。

2. 研究の目的

本研究では、未分化間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) を用いたメカノセンサーを開発することを目的とする。MSC の特徴として、

1. 種々の細胞に分化可能
 2. 遺伝子導入せずに得られる
 3. 患者自身から得られ増殖能が高い
 4. 全身投与にて炎症部位に集積するホーミング能を有する (Khakoo ら、2006)
- ことが知られている。つまり、顎口腔領域を

含む全身の特定部位にオーバーロードが存在した場合、その部位に炎症が生じることによって、全身投与した MSC がオーバーロード局所に集積することによって局所に生じる応力が過大なものかを判定することができるのではないかと考えた。この仮説が正しい場合、オーバーロードが MSC の存在によって可視化できるため、歯・歯周組織やインプラントの長期にわたる健康を維持するために最も重要なものの一つである力のコントロールに関連して、ある治療法が力学的に適切なものであるか、また、新規開発したインプラントのデザインが力学的に妥当であるか等について検討可能であると考えた。

3. 研究の方法

実験 1 : 全身投与 MSC が応力作用箇所に集積するかの確認

緑色の蛍光を発するタンパク質 (green fluorescent protein: GFP) を遺伝子導入されたラット (市販) より MSC を樹立する (Atsuta et al., Stem Cell Res Ther, 2013)。これとは別に、MSC のレシピエントとして 6 週齢ラットを用意し、脛骨に 2 本のチタンインプラントを埋入する (Ayukawa et al., J Biomed Mater Res, 1996) インプラントを埋入されたラットに GFP ラットから採取した MSC を尾静脈より全身投与する。比較対象として、インプラント近傍に MSC を局所投与し、同様の集積が起こるか否かを観察を行う。

続いて、インプラントは間欠応力作用装置 (Esaki et al., Clin Oral Implants Res, 2012) を用いて種々の応力をインプラントに作用させ、与えた応力値と MSC の集積の関連について検討する。

実験 2 : MSC 集積閾値の判定

実験 1 と同様にラットに埋入したインプラントに種々の応力を間欠応力作用装置を用いて作用させる。その際、インプラント近

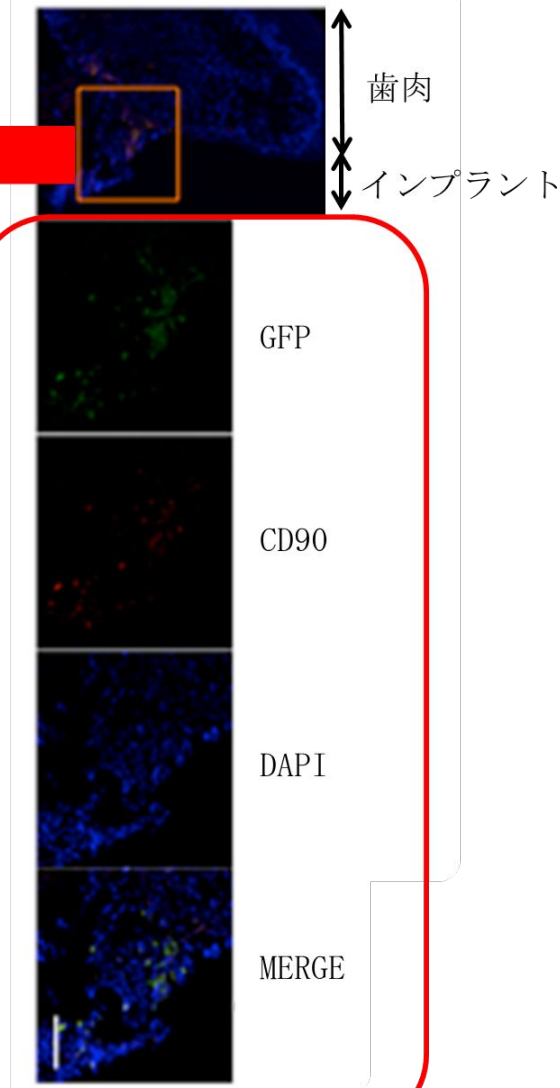
傍の骨面に strain gauge を貼付し、ひずみ値を測定する。また、インプラント周囲骨の μ CT 画像から有限要素モデルを作成し、インプラントに作用させた応力値よりひずみを計算する。以上より得られたデータより骨内応力値 / ひずみ値と MSC 集積の関連を整理する。

実験 3 : MSC 集積状態と力に応答した組織の変化の関連の検討

実験 2 において得られた μ CT 画像あるいは組織切片を作製し、骨形態計測を行うことによって骨内応力値 / ひずみ値・MSC 集積・表現型としての骨の変化 (吸収) の関連を整理する。

4 . 研究成果

まず、全身投与した MSC がインプラント周囲に集積するかどうかの確認実験を行った。



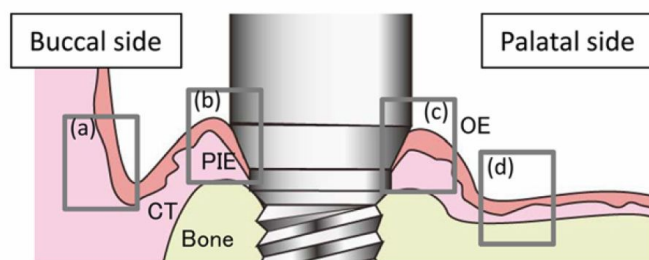
図：インプラント-歯肉界面の蛍光顕微鏡像。尾静脈より全身投与された GFP 陽性細胞がインプラント近傍の歯肉に集積しているのが観察される。また、この細胞は MSC のマーカーである CD90 陽性であることから、MSC であることが確認される。

その結果、ラット尾静脈から MSC を全身投与すると、埋入されたインプラント周囲に MSC が集積することが観察された。また、これらの細胞は CD90 陽性であることから、MSC であり、他の細胞への分化は見られないことが確認された。

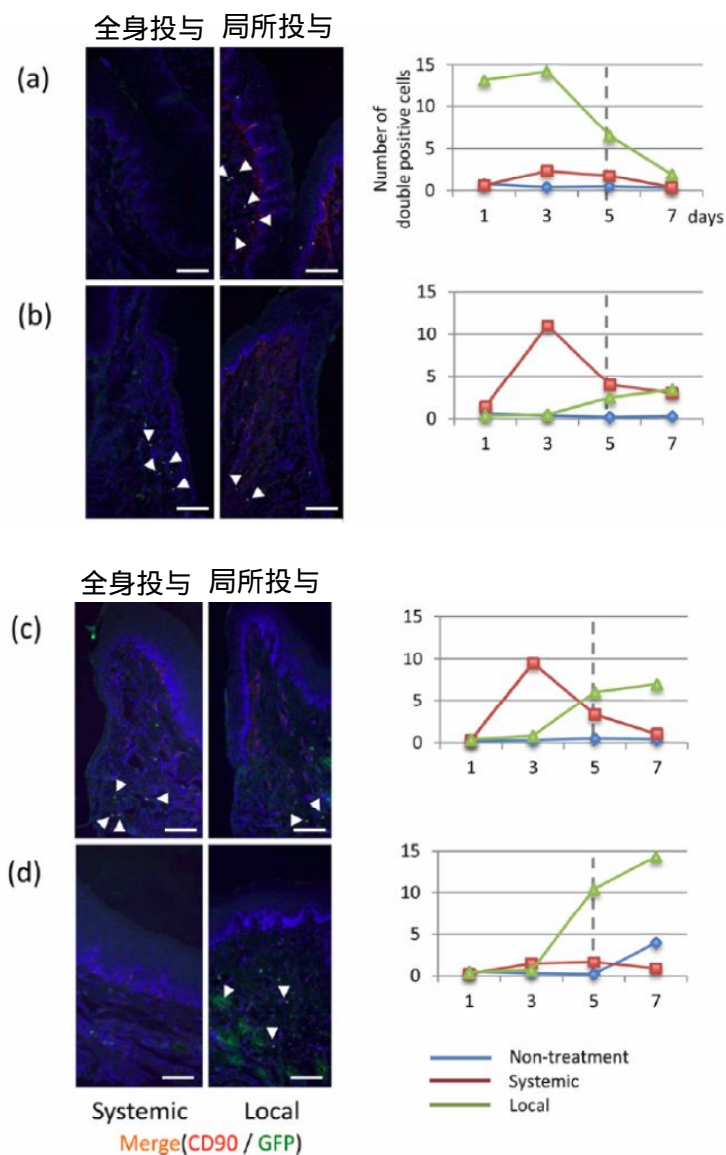
次に、ラット口腔内に埋入されたインプラントの近傍に MSC を局所投与し、MSC がインプラント周囲に集積するかどうかの確認実験を行った。

その結果、インプラントの近傍に MSC を局所投与しても、MSC はインプラント周囲に集積しないことが認められた。

以上のことより、少なくともインプラントモデルにおいては MSC は全身投与が必要な局所に集積させやすいことが示唆された。



図：全身投与、あるいはインプラント近傍局所 (a 部) に MSC を投与し、図の a~d の部位における MSC の集積を経時的に観察した。



図：MSC を全身、あるいはインプラント近傍（a 部）局所投与した際の MSC の集積。全身投与した場合のみインプラント最近部（b, c）に MSC が集積している。グラフは視野中の MSC の数（赤：全身投与、緑：局所投与）。全身投与した場合、3 日目にインプラント近傍に MSC が集積する（b, c）。局所投与した場合、投与部位（a）の MSC 数は経時的に減少し、時間とともに口蓋粘膜へ移行している（d）。

次に、MSC の集積と応力の関連について検討した。ラット脛骨に埋入したインプラントに種々の応力を間欠応力作用装置を用いて週 1 回・1 時間作用させ、応力値と、その後に作製した組織標本におけるインプラント近傍 MSC 数について、Spearman の相関係数を算出したところ、 $r=0.21$ と、応力値と集積 MSC 数の間に明確な相関性は認められなかった。

以上より、インプラント埋入直後の炎症状態に呼応して、全身投与した MSC がインプラント近傍に集積すること、インプラントに近い部位に局所投与しても効率的に集積しないこと、インプラントに応力を作用させても応力値に応じた MSC の集積は見られないことが示唆された。

今後、実験モデルの適正化をさらに図って応力を検知するメカノセンサーとしての MSC の活用について検討を進めていきたい。

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 1 件)

Kanazawa, M. Atsuta, I. Ayukawa, Y. Yamaza, T. Kondo, R. Matsuura, Y. Koyano, K. The influence of systemically or locally administered mesenchymal stem cells on tissue repair in a rat oral implantation model. *International Journal of Implant Dentistry*, 査読有, 4:2, 2018. (doi: 10.1186/s40729-017-0112-4)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.implantgishi.dent.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鮎川 保則 (AYUKAWA, Yasunori)

九州大学・大学院歯学研究院・准教授

研究者番号： 50304697

(2)研究分担者

古谷野 潔 (KOYANO, Kiyoshi)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号：50195872

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし