

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11630

研究課題名(和文) 付着上皮再生を目指した歯周組織完全再生

研究課題名(英文) Complete regeneration of periodontal tissue by junctional epithelium regeneration

研究代表者

松坂 賢一 (MATSUZAKA, Kenichi)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70266568

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)：歯周病治療は炎症を消退させ、その後の再生療法を行うが、歯槽骨の再生に主眼が置かれている。しかし、本来の再生は歯槽骨のみならず、歯根膜、歯肉、そして付着上皮の再生があって本来の歯周組織再生であると言える。本研究の目的は歯および歯周組織の完全再生を目指し、歯周組織内の細胞の特徴を解明することである。再生治療で注目されているiPS細胞の歯周組織内の主要な細胞である歯根膜線維芽細胞、骨芽細胞、マラッセの上皮遺残細胞の相互の関係を探索した。その結果、iPS細胞が硬組織形成能を得るための条件、上皮細胞との関連が明らかとなった。さらに、マラッセの上皮遺残細胞が果たす歯周組織細胞への役割の一部が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織の再生療法は歯槽骨の再生を主体に行われているが、本来歯槽骨のみならず、歯肉や歯根膜、付着上皮など歯周に存在するすべての組織が再生されるべきである。この目標のために、本研究では再生療法分野で注目されているiPS細胞の歯周組織細胞への分化誘導と歯周組織に存在する細胞の相互関係を解明することを目的とした。本研究の成果から、将来の歯周組織再生に関する考え方が変わり、破壊される前の歯周組織に戻す治療の基礎となるものである。

研究成果の概要(英文)：A treatment of periodontal disease purposes to be decreased inflammation and regenerative therapy. Although periodontal regenerative therapy is focused to alveolar bone regeneration, periodontal tissue constitutes not only alveolar bone but also periodontal ligament, gingiva and junctional epithelium. We aspire for perfect regeneration of periodontal tissue. The purpose of this study is to induce iPS cells for periodontal cells, and to evaluate the interaction among various cells in periodontal tissue. This study indicated the conditions for iPS cells to be several kinds of cells in periodontal tissue. Further, some roles of Malassez' epithelial cell for periodontal tissue cells were elucidated.

研究分野：口腔病理学

キーワード：歯周組織 再生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周組織は上皮細胞が作り出したエナメル質と付着上皮のヘミデスモゾーム結合によって、生体の内部環境が外部と隔たれている必要がある。歯周病に罹患すると付着上皮が脱落して、上皮による被覆が消失することになる。この状態は、歯周組織破壊に対する治療目標が炎症の消退のみに焦点が当てられている現在の歯周病治療では、歯周炎に再度罹患する可能性が高く、予後が不安定であることが言える。付着上皮の再生を目的とした研究はこれまでにほとんどなく、歯槽骨の再生ばかりが報告されている。本研究の開始当初の背景は、歯槽骨の再生のみならず、歯根膜の再生、さらには付着上皮の再生を目指すことによって歯周病治療後の再発を防止できるものと考えた。

### 2. 研究の目的

現在の歯周治療は破壊された歯周組織における炎症を消退することが目的であるが、炎症の消退後の歯周組織の再生は、近年歯槽骨の再生を目的として、これが歯周組織の再生と同義語になっていることも否めない。しかし、本来の再生は歯槽骨のみならず、歯根膜、歯肉、そして付着上皮の再生があってこそ歯周病の治療、歯周組織の再生であると言える。本研究の目的は歯および歯周組織の完全再生を目指し、歯周組織を構成する細胞の特徴を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス iPS 細胞を用いた歯周組織に存在する細胞へ分化誘導

iPS 細胞を生体吸収性材料である poly-L-lactic-glycolic-acid (PLGA) 上に播種し、Dexametazon、glycerophosphate、ascorbic acid を含有した骨系細胞誘導培地にて培養した。対照群として、ゼラチンコートを行った基質を用いた。Osteocalcin mRNA の定量を RT-PCR 法にて行い、骨基質形成に関してはアリザリンレッド染色にて検索した。また、35 日間、これらの基質上で培養された iPS 細胞をマウスの皮下に移植し、生体内での反応を観察した。

iPS 細胞を表面微細構造を有する基質上に播種し、骨系細胞誘導培地にて培養した。培養基質はポリスチレンを用い、25  $\mu\text{m}$ 、50  $\mu\text{m}$ 、150  $\mu\text{m}$  の直径を有するアルミナ粉末にてサンドブラストすることによって微細構造を付与した。対照群としてサンドブラストしない培養基質を用いた。まず、材料の表面荒さに関して確認し、それぞれの培養基質上での iPS 細胞の RUNX2 mRNA の発現を RT-PCR 法にて検索した。

iPS 細胞を EDTA にて表面を脱灰したウシ象牙基質上で培養した。対照群として表面の脱灰処理を行わないウシ象牙基質上で培養したものとした。表面の性状を検索する目的で、それぞれに BMP-2 の存在を確認した。そして、bone sialoprotein mRNA、osteocalcin mRNA といった骨系細胞マーカーと Dmp1 mRNA、Dsp1 mRNA といった象牙芽細胞マーカーの検索を行った。

#### (2) 歯周組織に存在する細胞の相互作用に関する研究

マイトマイシン (MMC) 処理あるいは処理なしのマラッセの上皮遺残細胞をフィーダー細胞として iPS 細胞を共培養した。それぞれの細胞において RUNX2 mRNA、osteocalcin mRNA、bone sialoprotein mRNA の発現を検索した。

歯肉上皮細胞と骨芽細胞を共培養し、上皮細胞の骨芽細胞への影響を検索した。共培養しない骨芽細胞を対照群とした。骨芽細胞の細胞増殖能および collagen type I mRNA、RUNX2 mRNA、osteocalcin mRNA の発現とアルカリフォスファターゼ活性を検索した。

### 4. 研究成果

#### (1) マウス iPS 細胞を用いた歯周組織に存在する細胞へ分化誘導

の培養基質に PLGA を用いた実験では、対照群に比較して、PLGA 上で培養した iPS 細胞の osteocalcin mRNA の発現が有意に高い値を示し、骨基質形成面積が広い結果であった。移植された PLGA 上で培養された iPS 細胞は生体内で、骨基質の形成が確認された。

の表面微細構造を付与した培養基質上で培養した実験では、培養基質における表面粗さ (Sa) は 25  $\mu\text{m}$  アルミナサンドブラストでは  $0.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 、50  $\mu\text{m}$  アルミナサンドブラストでは  $1.1 \pm 0.29 \mu\text{m}$ 、150  $\mu\text{m}$  アルミナサンドブラストでは  $1.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$  であった。また、iPS 細胞の RUNX2 mRNA の発現は 25  $\mu\text{m}$  アルミナサンドブラスト上 (表面粗さ  $0.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$ ) のもので有意に高い値

を示した。

の EDTA 脱灰処理を行ったウシ象牙基質では BMP-2 が検出されたが、対照群では BMP-2 が検出されなかった。対照群に比べて EDTA 脱灰処理を行ったウシ象牙基質上で培養された iPS 細胞の骨系細胞マーカーの mRNA 発現はいずれも高い値を示した。一方、象牙芽細胞マーカーの mRNA はいずれも差がなかった。

#### (2) 歯周組織に存在する細胞の相互作用に関する研究

マイトマイシン C 処理されたマラッセの上皮遺残細胞をフィーダー細胞として培養された iPS 細胞の RUNX2 mRNA、bone sialoprotein mRNA の発現において有意に高い値を示した。

歯肉上皮細胞の存在により骨芽細胞の増殖力は減退し、硬組織形成系 mRNA マーカーおよびアルカリフォスファターゼ活性のいずれにでも低い値を示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>MATSUZAKA Kenichi, HORIKAWA Tadashi, KOKUBU Eitoyo, INOUE Takashi   | 4. 巻<br>29                |
| 2. 論文標題<br>Oral epithelial cells inhibit the proliferation, mRNA expressions of collagen type I, RUNX2 and BGP, and ALP activity of osteoblast-like cells in co-culture | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Biomedical Research   | 6. 最初と最後の頁<br>3085-3089   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>NAONO Koichi, MATSUZAKA Kenichi, INOUE Takashi  | 4. 巻<br>42                |
| 2. 論文標題<br>Evaluation of the ability of ERM cells to stimulate the osteogenic differentiation of miPS cells   | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Clinical Dentistry and Research   | 6. 最初と最後の頁<br>印刷中         |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>TOKITA Reiko, NAKAJIMA Kei, INOUE Kenji, AL-WAHABI Akram, SER-OD Tungalag, MATSUZAKA Kenichi, INOUE Takashi   | 4. 巻<br>36                |
| 2. 論文標題<br>Differentiation behavior of iPS cells cultured on PLGA with osteoinduction medium  | 5. 発行年<br>2017年           |
| 3. 雑誌名<br>Dental Materials Journal  | 6. 最初と最後の頁<br>103 ~ 110   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.4012/dmj.2016-087  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Al Wahabi Akram, Ser Od Tungalag, Inoue Kenji, Nakajima Kei, Matsuzaka Kenichi, Inoue Takashi   | 4. 巻<br>107               |
| 2. 論文標題<br>Topography enhances Runx2 expression in outgrowing cells from iPS cell derived embryoid bodies   | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials   | 6. 最初と最後の頁<br>2288 ~ 2296 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/jbm.b.34321   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                 |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>SER-OD Tungalag, AL-WAHABI Akram, INOUE Kenji, NAKAJIMA Kei, MATSUZAKA Kenichi, INOUE Takashi   | 4. 巻<br>38              |
| 2. 論文標題<br>Effect of EDTA-treated dentin on the differentiation of mouse iPS cells into osteogenic/odontogenic lineages <i>in vitro</i> and <i>in vivo </i> | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Dental Materials Journal  | 6. 最初と最後の頁<br>830 ~ 838 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.4012/dmj.2018-161  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている(また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堀川 正、國分克寿、国分栄仁、松坂賢一             |
| 2. 発表標題<br>口腔粘膜上皮細胞の骨芽細胞様細胞への影響 -共培養による検討- |
| 3. 学会等名<br>第61回歯科基礎医学会学術大会                 |
| 4. 発表年<br>2019年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tungalag Ser-Od, Akram Al-Wahabi, Yoshihiko Akashi, Masami Sumi, Kenji Inoue, Kei Nakajima, Kenichi Matsuzaka, Takashi Inoue, Toshifumi Azuma |
| 2. 発表標題<br>Effect of EDTA-treated dentin on the differentiation of mouse iPS cells into osteogenic/ odontogenic lineage in vitro and in vivo             |
| 3. 学会等名<br>第303回東京歯科大学学会   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                           | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 井上 健児<br><br>(Kenji INOUE)<br><br>(00624636) | 東京歯科大学・歯学部・ポストドクトラル・フェロー<br><br><br><br>(32650) |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 中島 啓<br><br>(Kei NAKAJIMA)<br><br>(20733463)   | 東京歯科大学・歯学部・助教<br><br><br><br>(32650) |    |
| 研究分担者 | 国分 栄仁<br><br>(Eitoyo KOKUBU)<br><br>(70453785) | 東京歯科大学・歯学部・講師<br><br><br><br>(32650) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |