

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11799

研究課題名(和文)インプラント周囲炎の治療予後に影響を与える組織特異的幹細胞傷害の可能性を探る

研究課題名(英文)It explores the possibility of the tissues-specific stem cell bodily injury which has an influence on the treatment prognosis of the periimplantitis.

研究代表者

奥田 一博 (OKUDA, Kazuhiro)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00169228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント周囲炎の不可逆性を幹細胞に対する傷害と捉えて、細菌由来リポ多糖(LPS)により生成される活性酸素(ROS)による傷害とDNA修復活性に着目して歯肉細胞や歯槽骨骨膜細胞との比較を通して、間葉系幹細胞(MSC)のLPSに対する感受性とその後の細胞応答機序の相違を明らかにすることを目的とした。結果はLPSによる細胞増殖抑制作用は顕著なもので無く、ROSの関与は明確に出来なかった。MSCと他の分化細胞のTLR4(Toll-Like Receptor4)の発現では前者が優位では無かった。インプラント周囲炎はLPSの単独の作用よりは細菌の存在が圧倒的に影響を与えていることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラント周囲炎の治療に対する細胞治療の可能性を探るべく、3つの知見を得た。1)歯周病原性細菌LPSによる歯周構成細胞に対する増殖抑制作用は見られなかったためROSの関与の検証に至らなかった。2)MSCと他の分化細胞のTLR4発現の比較においてMSCの発現が有意に高い(あるいは低い)ということは確認できなかった。3)インプラント表面の感染が引き起こすインプラント周囲炎はLPSが単独で及ぼす効果というよりは、やはり細菌が存在することによる効果と考えるべきであり、あらためて抗菌剤等を併用した外科的感染組織の徹底的な除去を柱とした治療法を徹底するべきであることが確認された。

研究成果の概要(英文)：It had a purpose of clarifying the difference of the susceptibility to LPS of the mesenchymal stem cell (MSC) and in the cell response mechanism after that through the comparison with the gingival cell and with the alveolar-bone periosteum cell, aiming at the bodily injury by the reactive oxygen species (ROS) which is generated by the periodontopathic bacteria origin lipopolisaccharide (LPS) and DNA repair's being activated, taking the irreversibility of the peri-implantitis with the damage to the stem cell. A result is shown below.

1)It wasn't possible to have done the involvement of ROS clearly, that a cell growth depressant-action by LPS was remarkable and that there was not it.2)When the former was predominant in the manifestation of MSC and TLR4 (Toll-Like Receptor4) of the other differentiated-cell, it was not.3)As for the peri-implantitis, having an influence, that the existence of the bacteria was more overwhelming than the independent operation of LPS was confirmed.

研究分野：歯周病学

キーワード：再生医学 歯学 インプラント周囲炎 細胞治療 幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者の調べた限りにおいて、間葉系幹細胞(MSC)の細菌由来リポ多糖(LPS)に対する感受性や応答性に関する研究報告は少ない(Ti et al., J Transl Med, 2015, Ziegler et al, Ann Hematol, 2016)。また、インプラント周囲炎という視点から、歯肉線維芽細胞と MSC との比較検討例は見つけられなかった。この点で、本研究はインプラント周囲炎の治療法を念頭に置いた独創的なアプローチであると考えている。

(2) 感染症やそれに伴う重篤な急性炎症に対しては薬物治療で沈静化し、組織傷害の劇症化は抑え込むことができる。よって、局所的に多数の線維芽細胞が傷害を受けたとしても、周辺の線維芽細胞や幹細胞からの補充で再生は見込めるはずである。しかし、局所の MSC が相当の傷害を受けたと仮定すると、血管侵入をとまなう組織再生が困難になることは想像に難くない。

(3) 本研究によって、組織や血管のターンオーバーや再生に不可欠な間葉系幹細胞が傷害され喪失していることが明らかにできれば、治療方法として従来の感染病巣の除去や抗菌的・抗炎症的治療に頼るだけでは歯肉退縮・歯槽骨破壊からの回復は見込めないことも納得できる。したがって、末梢血に循環している幹細胞のリクルート、あるいは幹細胞の移植を中心とした細胞治療が必要になってくる。治療方針を体系的に見直すことによって、インプラント治療の予後向上に貢献するものと期待される。

(4) このようにインプラント周囲炎の病態やその成因については不明の点が多くある。しかし、インプラント人口が継年の増加傾向にあることを考えると、発症率が 30-50%ともいわれる(Schwarz, 第 46 回口腔インプラント学会国際セッションより, 2016)インプラント周囲粘膜炎や同周囲炎の病態についてより深く理解するとともに、いったん傷害を受けた歯周組織の回復を図る効果的再生治療法の開発が喫緊の課題である。

2. 研究の目的

(1) ヒト由来の歯肉線維芽細胞や骨膜細胞等と MSC の間で LPS に対する感受性と応答性の違いを明らかにする。

(2) LPS 刺激した MSC において、濃度依存性に ROS 産生、抗アポトーシス反応、アポトーシス誘導反応が惹起される機序を明らかにする。

(3) LPS 刺激した MSC が低傷害時には線維芽細胞に分化する可能性を明らかにする。

(4) インプラント周囲炎からの組織再生には MSC 移植が必要であることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) LPS による歯周構成細胞に対する傷害作用に活性酸素(ROS)が関与していることを検証する。

(2) MSC は LPS に対して感受性が高いが、傷害を免れた場合、歯肉を再生する線維芽細胞等に分化する余地があることを検証する。

(3) LPS の分子レベル作用機序に細胞種間格差があることを根拠に LPS に対する感受性の違いを説明する。

4. 研究成果

(1) LPS による歯周構成細胞に対する LPS-PG が細胞増殖に及ぼす影響
それぞれの細胞を 1×10^3 /well の細胞密度で 96-well plate に播種し、DMEM+1%FBS 培地中(あるいは、MSC-BM は MesenPRO 培地中)で 24 時間の preincubation の後、48 時間 LPS-PG (0.01-10 ng/mL)で処理した。細胞数は Cell-counting kit-8 により比色的に計測した。結果は以下に示した表の通りであった。

LPS-PG (ng/mL)	control	0.01	0.1	1	10
Saos-2	100.0%	97.2 ± 4.7%	88.4 ± 1.2%	87.5 ± 1.8%	81.7 ± 3.9%
NHost	100.0%	95.5 ± 9.2%	88.1 ± 10.9%	82.2 ± 17.9%	83.0 ± 5.0%
MSC-BM	100.0%	96.4 ± 3.8%	99.1 ± 5.0%	90.6 ± 4.2%	91.0 ± 1.3%

骨芽細胞の分化度が最も高い Saos-2 の増殖活性が最も強く LPS-PG により阻害され、MSC-BM の感度は低いものであった。このように予想を下回る結果だった原因の一つとして、培養系において LPS と複合体を形成する可溶性 LPB (LPS-binding protein)と可溶性 CD14 の不足が関与していると考えた。そこで、市販の LPB と CD14 を培養系に添加して、LPS による増殖阻害効果を再度検討した。若干、細胞増殖抑制効果が顕著になる傾向も認めしたが、再現性に乏しかった。

(2) フローサイトメーターによる Toll-like receptor-4 (TLR4)の発現度評価
LPS-PG に対する特異的受容体として知られている TLR4 の発現程度を書く細胞種ごとに解析した。その結果、MG63 と NHost と MSC-BM はわずかな発現しか認められなかった。Saos-2 に関しては、15-30%程度の細胞に TLR4 の発現が認められるという結果になった。

(3) TLR4 陽性細胞のクローニング

細胞増殖と TLR4 受容体の発現の相関関係を検証するために、MG63 細胞から TLR4 陽性細胞をクローニングする試みを行った。方法として限外希釈法と時期ビーズ法を採用した。150 以上のクローニング細胞についてフローサイトメーターによる解析を行ったが、クローニング直後に比較的高い陽性率を示した細胞集団についても、継代を重ねると親細胞とほとんど変わらないレベルに減少するという結果になった。これまでの所見から、これらの細胞はいずれも TLR4 と区別できる別の機能的 TLR4 受容体を発現している可能性があり、今後は受容体の同定から、細胞反応の解析に軸足を移して、詳細な検討を行なう予定である。

(4) 純チタン表面へのタンパクの吸着

インプラント周囲炎の病因を考えた場合、インプラント表面へのバイオフィルムの形成と LPS の吸着が根底にあると思われる。そこで、市販の表面が滑沢な純チタン板とこれに HA プラスト処理した表面に微細構造を付与した純チタン板を材料として、これらに対する各種接着タンパク質の吸着性を検討した。標的とした接着タンパクはヒトの血漿に含まれる fibronectin (FN)、fibrinogen (FGN)、von Willebrand factor (vWF)、vitronectin (VN)とし、比較対照として血清中に多量に含まれるアルブミン(Alb)についても併せて検討した。結果的に FGN がもっともチタン表面に吸着しやすく、それは同時に添加した Alb によって阻害されない。ただし、事前にチタン表面にコートされた bovine serum albumin (BSA)によって強力に阻害されるということが判明した。FN や vWF もチタンへの親和性は高く、血漿中の血小板などは、これらの接着タンパクを介してチタン表面と接着することも明らかになった。*E. coli* の LPS の吸着については、PBS に添加してチタン表面に滴下した場合、特異的な吸着は検出できた。しかし、血漿中に添加して滴下した場合、FGN や Alb に比較して親和性が低いためか、特異的吸着は認められなかった。

(5) 純チタン表面への血小板の吸着

インプラント周囲炎の治療を考えた場合、インプラント表面への生物学的親和性を改善する目的で、多血小板血漿(PRP)をチタン表面にコーティングすることが試みられている。しかしながら PRP がチタン表面でどのように作用するかは理解に乏しい。この PRP による表面修飾法のメカニズムを検証するために、活性化して純チタン板に付着した血小板から放出された血小板由来可溶性生物学的分子 (PPAR、PDGF-B、TGF- β 1) の分布を評価した。結果的に血小板由来可溶性生物学的分子は血小板から均等に放出された。そして暫くの間、血小板周囲を取り巻く空間に維持され直ちに拡散しなかった。CaCl₂ 処理でこの効果は増強された。血小板はただちに純チタン板に付着して血小板のなかに蓄えられた生物学的分子を血漿タンパクの無い部分へ放出する。そしてこれらの生物学的分子は拡散せずに新生された未熟なフィブリン線維網の近傍の血小板周囲の血小板外空間に、より長くとどまる。従ってこれらの蓄積された生物学的分子は歯槽骨再生とインプラント結合に関与する細胞を刺激することによってインプラントを生体組織と協調して安定化させることが予想される。

(6) アポトーシス細胞のフローサイトメーター(FCM)による検出

アポトーシスの評価法はキットを使用する方法もあるが、他の結果との相関性を検討するうえでもっとも有効で定量的評価が可能な FCM による評価を試みた。骨芽細胞に LPS を作用させて、4 時間後、8 時間後、24 時間後に細胞を回収し、PI 染色あるいは annexin V-FITC 処理した後、FCM にて解析したが、正常細胞より小型のゲートに有意な数の細胞が認められなかった。ただし、これは使用したフローサイトメーターの検出限界による可能性も考えられるため、さらに細胞化学的な方法で検出を試みた。ある程度の PI 陽性のアポトーシス細胞を検出されたが、適用した LPS 濃度範囲内では、control に対する有意差は認められなかった。ROS によるアポトーシス誘導が示唆されているシリカ微粒子を positive control として骨膜細胞のアポトーシスと運動活性に及ぼす影響を検討した。80%の増殖抑制がかかるレベルのシリカ微粒子を培養系に添加した場合、骨膜細胞の運動活性は顕著に抑制され、アポトーシス細胞の数も顕著に増加した。従って、LPS の局所濃度が想定以上に濃縮されている場合は別として、本研究のような *in vitro* の実験系において、LPS による細胞増殖抑制効果の可能性は極めて低いと示唆された。

(7) 純チタン表面への LPS の吸着細胞化学的検出

PG 由来の LPS に対する特異的抗体の入手が困難であったため、*E. coli* 由来 LPS (1 ng/Ti plate)をチタン板表面 (10x10mm)に一晩コートした状態で、骨芽細胞、骨膜細胞、骨髄・脂肪由来間葉系幹細胞の増殖に及ぼす影響を検討するとともに、チタン表面に吸着した LPS の検出も試みた。4)でも述べたように、LPS の特異的吸着は認められたものの、これらの細胞のいずれにおいても顕著な増殖抑制効果は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsujino T, Takahashi A, Watanabe T, Isobe K, Kitamura Y, Okuda K, Nakata K, Kawase T	4. 巻 7
2. 論文標題 Platelet adhesion on commercially pure titanium plates in vitro. II. Immunofluorescence visualization of PDGF-B, TGF 1, and PPAR released from activated adherent platelets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dentistry Journal	6. 最初と最後の頁 109-126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/dj7040109	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
連携研究者	川瀬 知之 (KAWASE Tomoyuki) (90191999)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	