

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11985

研究課題名(和文) 歯周組織再生に向けたマクロファージ・間葉系細胞間免疫調節療法のための基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study for immunomodulatory therapy utilizing crosstalk between macrophages and mesenchymal cells toward periodontal tissue regeneration

研究代表者

柳田 学 (Yanagita, Manabu)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：80379081

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)：塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)の局所投与が有意な歯周組織再生を誘導することが知られています。しかしながら、創傷部に遊出する血球系細胞に対するFGF-2の作用は十分に検討されていません。本研究では、単球系細胞からM1/M2マクロファージに分化する過程でFGF-2が及ぼす影響を検討しました。その結果、FGF-2存在下でM1マクロファージはその炎症性の形質を、M2マクロファージ様の抗炎症性へと分極させました。FGF-2は創傷により損傷した歯周組織の炎症反応を速やかに収束させることにより歯周組織再生へ向けて微小環境を整えている可能性が示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により塩基性線維芽細胞増殖因子の局所投与が、歯周組織再生の場において歯根膜細胞をはじめとした歯周組織構成細胞だけでなく、免疫担当細胞にも作用して創傷治癒・組織再生に関与することが示唆されました。これらの知見は、サイトカイン治療によって誘導される組織再生メカニズムの理解を深め、歯周病のみならず様々な疾患に対する新たな治療法の開発に繋がることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Local administration of FGF-2 induces significant periodontal tissue regeneration. However, the action of FGF-2 on hematopoietic cells migrating to the wound site has not been investigated. In this study, we investigated the effects of FGF-2 on the differentiation of monocytes into M1 / M2 macrophages. We found that in the presence of FGF-2, M1 macrophages polarized their inflammatory characteristics into M2 macrophage-like anti-inflammatory properties. This finding suggested that FGF-2 may promptly resolve the inflammatory response, promote the wound healing and prepare the microenvironment for periodontal tissue regeneration.

研究分野：歯周病学

キーワード：FGF-2 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室が中心となり2016年9月に日本初の歯周組織再生剤として製造販売承認を取得した“塩基性線維芽細胞成長因子:FGF-2”の開発(J.Bone Min.Res.2016,31:806, J.Dent.Res.2011, 90:35, PLoS One 2008,7:e2611)やヒト幹細胞研究(厚生労働省医政0822第6号)として実施中の脂肪組織由来多系統前駆細胞移植による歯周組織再生療法の開発(BBRC,2015,464:299)をはじめとして、間質系細胞(歯肉線維芽細胞、歯根膜細胞、セメント芽細胞、血管内皮細胞)や間葉系幹細胞といった組織再生に直接関与する細胞に焦点を当て、それらのポテンシャルを活用して歯周組織再生を誘導しようとする試みがなされている。これまで我々は、間質系細胞にターゲットを絞った FGF-2 の歯周組織再生効果に関する *in vitro* での解析で、FGF-2 が歯根膜細胞の増殖・遊走を促進し、細胞外基質産生を制御するとともに(J.Cell.Physiol.2005,203:553, J.Cell.Physiol. 2011,226:809) 歯根膜細胞と血管内皮細胞が FGF-2 と VEGF-A の共存下で協調的に作用し血管新生を増強する(J.Dent.Res.2014,93:89) ことにより、歯周組織再生に適した局所環境を創出していることを明らかにしてきた。

一方、歯周組織の創傷治癒や組織再生の過程には歯周組織構成細胞以外の多種多様な細胞が関与し、それらの細胞間の複雑な相互作用が組織の生体応答を制御しているものと考えられる。例えば、免疫担当細胞の1つであるマクロファージには炎症を惹起して感染異物を排除する1型マクロファージの他に、2型マクロファージが存在し、この2型マクロファージは異物排除後の創傷治癒機転において成長因子や細胞外基質の生成や分解を調節する酵素類を産生することが報告されている(Nat.Rev.Immunol.2011,11:723, Nat.Rev.Immunol. 2013,14:986)。すなわち、本来炎症を惹起して外来異物の侵入を感知・排除する役割を担う免疫担当細胞が、異物排除後の局所組織の創傷治癒にも関与することが明らかとなりつつある。

2. 研究の目的

マクロファージをはじめとする免疫担当細胞の歯周組織再生への関与についての検討はほとんど皆無である。そこで、今回我々は歯周組織再生過程における免疫担当細胞とりわけマクロファージの動態に着目し、歯周組織再生過程におけるマクロファージの動態解析と、免疫担当細胞と歯周組織構成細胞が微小環境においてどのような動態を示すかを検討する。また喫煙習慣は歯周組織再生療法の効果を著しく減少させることが知られている。そこで、タバコ煙成分が歯周組織の間質系細胞に及ぼす影響もあわせて検討する。

3. 研究の方法

(1)ヒトの単球が FGF-2 存在時にいかなる形質のマクロファージに分化するか検討した。市販の末梢単核球(KURABO)より磁気細胞分離装置(MACS®)を用いて CD14 陽性単球を分離して実験に供した。2004年の Verreck らの方法(PNAS 2004,101:4560)に従い、GM-CSF 存在下で分化させたものを M1 マクロファージ、M-CSF で分化させたものを M2 マクロファージとした。さらに FGF-2 存在下で培養したものを FGF マクロファージとした。培養6日目の細胞形態を観察した後、マクロファージの分化マーカーの発現と、IL-10 タンパク発現を検討した。

(2)マウスの単球系細胞は FGF-2 存在時にいかなる形質のマクロファージに分化するか検討した。マウス単球系細胞 RAW264.7 を *E. coli* LPS 存在下で分化させたものを M1 マクロファージ、IL-4 で分化させたものを M2 マクロファージとした。予備実験において RAW264.7 を FGF-2 のみ存在下で培養した場合、明確な極性を示さなかった。そのため、M1/M2 マクロファージへの分化させる段階で FGF-2(50ng/ml)を加え、マクロファージの分化マーカーの発現を検討した。

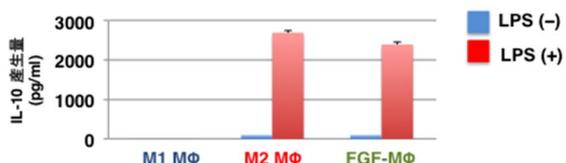
(3)マクロファージがマウス歯根膜細胞の骨様組織への分化に及ぼす影響を検討した。マウス単球系細胞 RAW264.7 を M1/M2 マクロファージへの分化させる段階で FGF-2(50ng/ml)を加え、得られたマクロファージとマウス歯根膜細胞と直接的接触あるいは間接的に共培養し、マウス歯根膜細胞の骨様組織形成能を検討した。

(4)歯周組織に存在する間質系細胞がタバコ煙曝露によって惹起される細胞機能変化を検討した。

4. 研究成果

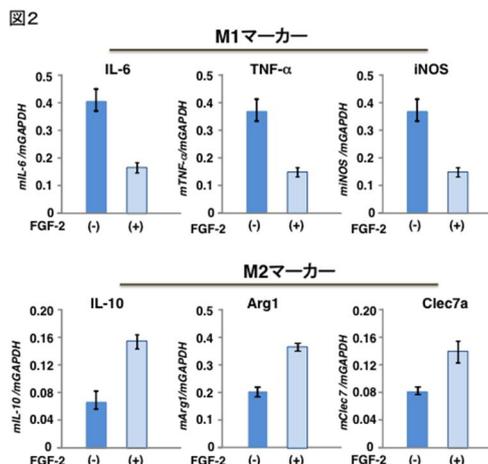
(1)ヒト M1 マクロファージでは目玉焼き様形態、M2 マクロファージでは紡錘形を示した。FGF マクロファージは M2 マクロファージに類似した紡錘形を示した。FGF-2 マクロファージは M1 マーカーをほとんど発現していなかった。その一方、

図1



FGF-2 マクロファージはM2 マクロファージにおいて発現するM2 マーカーである IL-10、CD163、CCL2 をM2 マクロファージと同等に発現した。また、M2 マクロファージと FGF マクロファージは無刺激でも IL-10 を産生を認めたと、LPS 刺激により大量の IL-10 を産生した。その一方、M1 マクロファージからの IL-10 産生は認めなかった(図1)。

(2) マウス単球系細胞 RAW264.7 を IL-4 存在下で分化誘導したM2 マクロファージに FGF-2 を加えてもほとんど変化を認めなかった。FGF-2 存在下ではM1 マクロファージにおけるM1 マーカーの発現は、FGF-2 非存在下におけるM1 マクロファージと比較して抑制される一方、M2 マーカーの発現は亢進した(図2)。



(3) マウス歯根膜細胞とマクロファージを共培養して、マクロファージが歯根膜細胞においてどのような遺伝子変動に影響を及ぼすかを検討した。しかしながら、共培養後のマウス歯根膜細胞を高純度で抽出することが困難であった。今後、両細胞を明確に分離できるマーカーの検索と細胞分離装置が必要と思われる。次に、マウス歯根膜細胞をM1 マクロファージあるいはM2 マクロファージに直接的に接触あるいは間接的に共培養したのち石灰化誘導培地にて長期培養を行った。その際、歯根膜細胞のみを石灰化誘導培地で培養した場合と比較して骨様石灰化物形成能は低下し、その低下レベルはM1 マクロファージ存在下よりもM2 マクロファージ共培養時の方が顕著であった。

(4) ヒト歯肉線維芽細胞をタバコ煙濃縮物あるいはタバコ煙の主要成分であるニコチン存在下で培養すると老化関連 beta-galactosidase 活性が亢進した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 3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 柳田学	4. 巻 28
2. 論文標題 歯周組織を診る	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 大阪府歯科衛生士会雑誌	6. 最初と最後の頁 6-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 柳田学	4. 巻 135
2. 論文標題 加熱式タバコ・電子タバコの全身及び口腔領域への影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 歯界展望	6. 最初と最後の頁 140-149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 柳田学	4. 巻 -
2. 論文標題 歯周病と糖尿病・アルツハイマー病との関連	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 兵庫県歯科衛生士会 学術誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kido JI, Murakami S, Kitamura M, Yanagita M, Tabeta K, Yamazaki K, Yoshie H, Watanabe H, Izumi Y, Suda R, Yamamoto M, Shiba H, Fujita T, Kurihara H, Mizuno M, Mishima A, Kawahara N, Hashimoto K, Naruishi K, Nagata T.	4. 巻 89
2. 論文標題 Useful Immunochromatographic Assay of Calprotectin in Gingival Crevicular Fluid for Diagnosis of Diseased sites in Patients with Periodontal Diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 67-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1902/jop.2017.170206.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 柳田学、村上伸也	4. 巻 71
2. 論文標題 喫煙により増悪する歯周病の病態形成に関する基礎的研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本歯科医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 43-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 柳田学	4. 巻 61
2. 論文標題 歯肉上皮細胞における免疫制御機構 -内因性因子が歯肉上皮細胞の免疫応答能に及ぼす影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 340-342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.11471/shikahozon61.340.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 柳田学	4. 巻 28
2. 論文標題 歯周組織を診る	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 大阪府歯科衛生士会学術誌	6. 最初と最後の頁 6-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 柳田学	4. 巻 59
2. 論文標題 喫煙により増悪する歯周病の病態形成に関する基礎的研究	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本歯周病学会会誌	6. 最初と最後の頁 110-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2329/perio.59.110	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 -

1. 著者名 柳田学	4. 巻 131
2. 論文標題 歯周病病態形成における喫煙の影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 歯界展望	6. 最初と最後の頁 221-224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 辰巳真理、柳田学、山下元三、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 FGF-2がマクロファージの形質に及ぼす影響
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辰巳真理、柳田学、長谷川詩織、鈴木美麻、池上久仁子、山下元三、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 タバコ煙の長期曝露が歯肉線維芽細胞の細胞機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第150回歯科保存学会春季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mari Tatsumi, Manabu Yanagita, Shiori Hasegawa, Kuniko Ikegami, Mio Suzuki, Motozo Yamashita, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
2. 発表標題 Long-term Exposure of Cigarette Smoke Modulates Functions of Gingival Fibroblasts
3. 学会等名 97th IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳田学
2. 発表標題 長期タバコ煙曝露が歯肉線維芽細胞の細胞機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第8回ときわ学術フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳田学
2. 発表標題 歯周病と糖尿病・アルツハイマー病との関連
3. 学会等名 兵庫県歯科衛生士会 第6回歯科衛生学術研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辰巳真理、柳田学、長谷川詩織、鈴木美麻、池上久仁子、山下元三、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 タバコ煙の長期曝露が歯肉線維芽細胞の細胞機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第61回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsumi M, Yanagita M, Hasegawa S, Suzuki M, Ikegami K, Yamashita M, Kitamura M, Murakami S.
2. 発表標題 Effects of long-term exposure of cigarette smoke on gingival fibroblasts
3. 学会等名 第66回国際歯科研究学会日本部会学術大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳田学
2. 発表標題 タバコ煙の長期曝露は歯肉線維芽細胞の細胞機能に影響を及ぼす
3. 学会等名 第29回近畿中国四国口腔衛生学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辰巳真理、柳田学、山下元三、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 FGF-2がマクロファージの形質に及ぼす影響
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳田学
2. 発表標題 歯周組織を診る
3. 学会等名 大阪府歯科衛生学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川 詩織，柳田 学，久保田 実木子，辰巳 真理，山下 元三，北村 正博，村上 伸也
2. 発表標題 アロマトーゼ阻害薬が歯周組織構成細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 第60回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳田学
2. 発表標題 喫煙により増悪する歯周病の病態形成に関する基礎的研究
3. 学会等名 第60回春季日本歯周病学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池上 久仁子、山下 元三、中村 友美、鈴木 美麻、西川 有彩、平沼 麻央、三木 康史、北垣 次郎太、柳田 学、北村 正博、村上 伸也
2. 発表標題 ヒト老化歯根膜細胞におけるmicroRNA-34a SATB2を介した硬組織形成制御
3. 学会等名 第147回 歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榎本 梨沙、北垣 次郎太、松本 昌大、宮内 静香、藤原 千春、黒田 智子、田内 拓史、小笹 匡雄、柏木 陽一郎、沢田 啓吾、山下 元三、柳田 学、竹立 匡秀、山田 聡、野崎 剛徳、北村 正博、村上 伸也
2. 発表標題 日本人における侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索
3. 学会等名 第60回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M Suzuki, M Yamashita, K Ikegami, T Nakamura, K Miki, M Yanagita, M Kitamura, S Murakami
2. 発表標題 Failure of mitophagy in senescent HPDL cells
3. 学会等名 第65回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 村上伸也（編著）柳田学（分担）	4. 発行年 2017年
2. 出版社 大阪大学出版会	5. 総ページ数 230
3. 書名 歯周病なんか怖くない	

〔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
研究 分担者	竹立 匡秀 (Takedachi Masahide) (60452447)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	
研究 分担者	北垣 次郎太 (Kitagaki Jirouta) (90570292)	大阪大学・歯学研究科・招へい教員 (14401)	