

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02976

研究課題名(和文) 歯周組織再生のための幹細胞コンピテンシーの解明と細胞移植治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of stem cell competencies for periodontal tissue regeneration and application to cell transplantation therapy

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周組織再生誘導のための細胞自己移植治療に用いられたヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞を臨床で得られた歯周組織再生効果の違いから分別し、効果の高い細胞と低い細胞の細胞特性を分泌因子および遺伝子発現解析によりプロファイリングすることで、歯周組織を再生するために必要となる幹細胞の特徴について多角的な情報を取得した。なかでも低酸素シグナル、TGF・SMADシグナル、さらにはアポトーシス関連シグナルの違いが歯周組織再生能力の違いに関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療に用いられるヒト由来細胞には、ドナー由来の個体差があることは周知であるにも関わらず、これまでにその不均一性と治療効果との関係を検証した報告はなかった。本研究課題にて得られた研究成果は細胞の自己移植治療における有効性向上のみならず、他家由来の細胞を用いた再生医療等製品の開発による歯周組織再生医療の開発につながる貴重な情報になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Adipose tissue-derived multilineage progenitor cells, which has been used for clinical study to induce periodontal tissue regeneration, were classified based on the clinically obtained difference in efficacy of periodontal tissue regeneration. By profiling the characteristics by secretome and transcriptome analysis, we obtained multifaceted information about the competency of stem cells required to regenerate periodontal tissue. In addition, it has been suggested that differences in hypoxia signals, TGF-SMAD signal and apoptosis-related signal was involved in periodontal tissue regeneration ability.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生 幹細胞移植

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、重度歯周病に対応可能な歯周組織再生療法のニーズに対応するために、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSC) の自己移植による歯周組織再生医療の開発に取り組んできた。その結果、申請者らは、ほぼすべての成人から比較的簡便かつ安全に採取可能である皮下脂肪組織を幹細胞源として選択し、脂肪組織中に存在する高純度 MSC である脂肪組織由来多系統前駆細胞 (Adipose tissue-derived multilineage progenitor cells; ADMPC) (Okura *et al. Tissue Eng Part C Methods*, 2011) の移植による歯周組織再生誘導効果についてイヌ実験的歯周病モデルを用いた非臨床研究にて明らかにした (Takedachi *et al. J Oral Biosci.* 2013, Ozasa, Takedachi *et al. Inflammation Regenerat.* 2014)。この結果をもとに申請者らは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」(UMIN000007698) を実施し、当該治療法の安全性と有効性に関して検討を重ねてきた。これまでに、既存の歯周組織再生療法では効果が期待できない 4 壁性あるいは 1 壁性の重度垂直性骨欠損を有する患者を含む 9 名 (平成 29 年度中に予定症例数計 12 名の移植を完了する予定) の被験者に対し歯槽骨欠損部への ADMPC の自己移植を行ったが、いずれの患者においても歯周ポケットの減少、アタッチメントレベルの獲得並びに歯槽骨の再生が認められた (Takedachi *et al. IADR* 2017, 竹立他 第 146 回日本歯科保存学会春季学術大会)。なお、ADMPC 移植に関連した有害事象は発生していない。このことは ADMPC 移植が重度の歯周組織欠損を伴う歯周病患者に対応可能な歯周組織再生療法であることを強く示唆している。

国際細胞治療学会 (ISCT) では、ヒト MSC を プラスチックに接着性があり、表面抗原 CD105・CD73・CD90 が陽性、CD45・CD34・CD14 または CD11b・CD79a または CD19・HLA-DR 陰性、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化能を有することを必要最低条件としている。また、MSC 移植による再生医療は長らく MSC の有する多分化能を活かし障害組織を置き換える細胞補充療法と考えられてきたが、近年では MSC 由来分泌因子による免疫制御作用、抗炎症作用、血管新生作用等により治療効果が得られるという方向にパラダイムシフトしてきた。申請者らの先行研究においても、ADMPC 移植による歯周組織再生機序の一つとして ADMPC 由来の液性因子が歯根膜細胞の分化を促進させることを報告している (Sawada, Takedachi *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015)。しかしながら、移植した ADMPC が如何なる分子機序により歯周組織に生着し、増殖因子や組織再生活性化因子などを分泌することで組織再生を誘導しているかの全貌は明らかになっていない。

さらに他の細胞治療と同様、上記臨床研究にて得られた歯周組織再生効果には被験者の性別や年齢等に限らず、歯周組織破壊の重症度だけでは説明できない個人差があるという結果を、申請者らはすでに取得している。一般的に、移植に用いる MSC は、細胞数や生細胞率などの製造管理項目以外に、上記 MSC マーカーを FACS によって解析する純度試験や、無菌試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ否定試験などの細胞安全性試験によってのみ、その品質管理項目が決定されているが、移植前に細胞特性を分子レベルで事前診断し、必要に応じて細胞機能の一部を調整あるいは補充し、歯周組織再生能を高めるための操作を施すことができれば、ドナー由来の細胞特性の不均一性を治療効果の視点から解決するとともに、幹細胞の持つ組織再生効果を最大限に引き出すことが可能となる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、大阪大学歯学部附属病院にて実施された臨床研究「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」において、歯周組織欠損部に自己移植した ADMPC を、治療後に得られた有効性に関する臨床データの統計学的解析結果をもとにそれぞれ歯周組織再生力価を判定する。そして被験者ごとに凍結保存された ADMPC を用いてその細胞特性をプロファイリングし、各細胞ロットが具有する組織再生能に関する分子基盤情報をデータベース化し、歯周組織再生に必要な幹細胞コンピテンシーを retrospective に解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ADMPC 細胞バンクの作製

上記臨床研究に参加した各被験者から移植に際し、残余した細胞についてその特性を解析する臨床研究への参加に関して同意を取得した。そして臨床研究にて得られた歯周組織再生力価を基準に high performer: HP と low performer: LP に分類するとともに、各細胞を培養、凍結保存し、細胞バンクを作製した。

#### (2) ADMPC 培養上清の secretome 解析

(1)にて凍結保存した HP と LP を再培養し、培養上清を回収後、nanoLC-MS/MS 分析を行うことにより、ADMPC 由来の分泌タンパクに関して網羅的に解析した。

#### (3) ADMPC の transcriptome 解析

(1)にて凍結保存した HP と LP を再培養し、mRNA を回収後、アジレント社製マイクロアレイを用

いて各細胞に発現する遺伝子を網羅的に解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) secretome 解析による HP と LP の分泌因子解析

HP と LP の培養上清に含まれる分子を網羅的に解析した結果、334 個の分子が検出され、LP の培養上清に対し、HP の培養上清に多く含まれる分子が 166 個同定された。特に顕著な差が認められたものについて図 1 に示す。

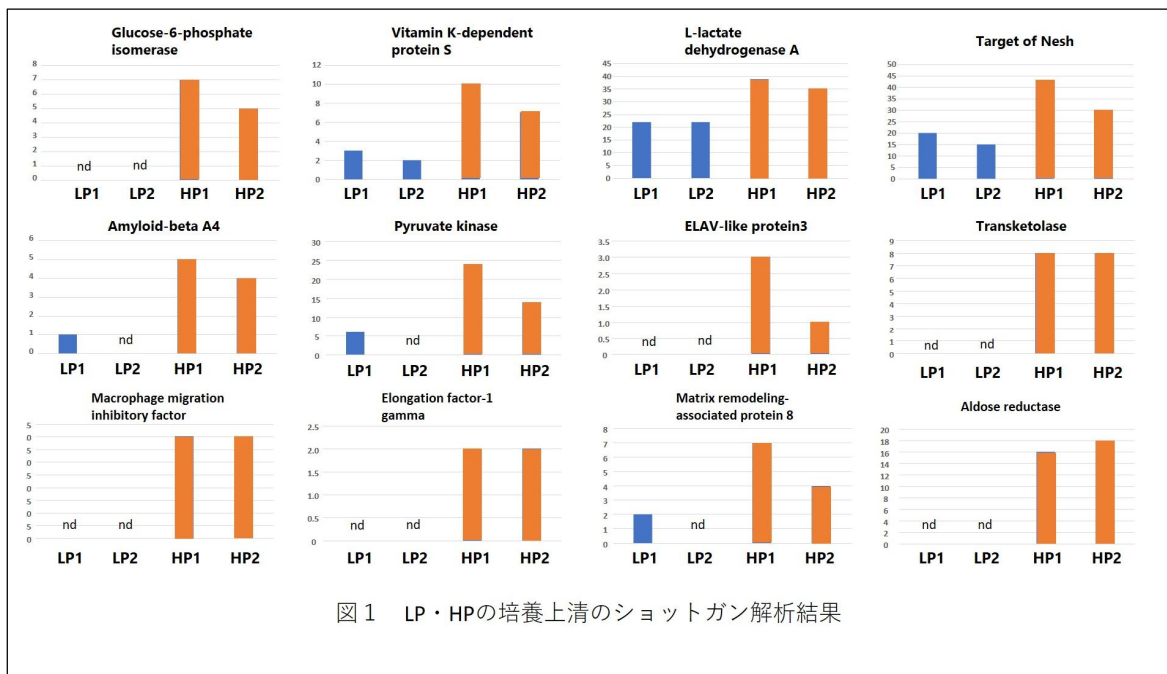


図 1 LP・HPの培養上清のショットガン解析結果

一方で、LP に対し HP の培養上清中に低い頻度で検出された分子が 161 個であった。興味深いことに図 2 に示すように HP ではコラーゲン量が減少している傾向が示された。

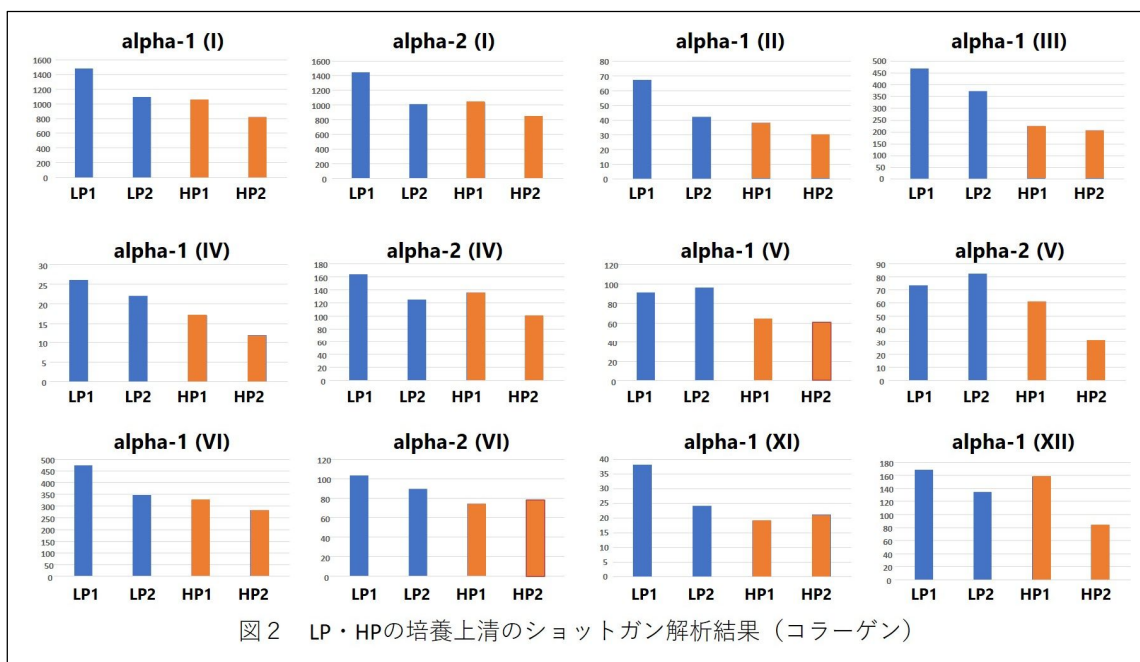


図 2 LP・HPの培養上清のショットガン解析結果（コラーゲン）

##### (2) transcriptome 解析による HP と LP の遺伝子発現解析

HP と LP の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、統計学的に有意な差を認めたプローブが 1741 であった。なかでも LP に対し HP で 2 倍以上の発現が認められたプローブが 207、0.5 倍以下の発現であったプローブが 236 であった。GO エンリッチメント解析の結果から、シグナル関連の遺伝子発現に顕著な差があることが明らかとなった。（図 3）

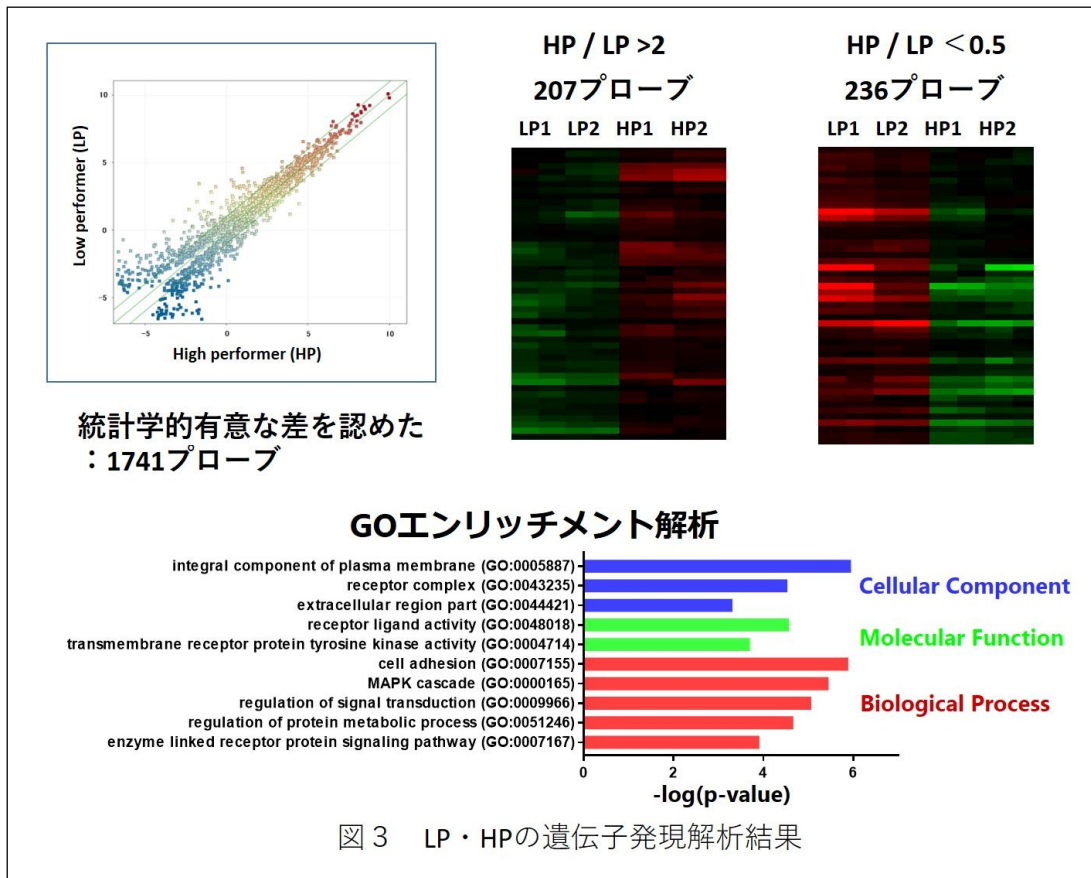


図3 LP・HPの遺伝子発現解析結果

### (3) 幹細胞コンピテンシーに関する解析

#### パスウェイ解析

(1)および(2)の結果をもとに、HPとLPの臨床的な差が如何なる分子機序に依存するのかを明らかにするためにパスウェイ解析を行った。その結果、HPにおいて低酸素誘導因子HIFによる発現制御を受ける分子群に特徴的な発現が認められるとともに、HPとLPの機能がTGF-β・SMADシグナルの違いに由来する可能性が見出された。

#### コラーゲン

(1)の結果から、HPとLPとの細胞特性の差を特徴付ける結果として、コラーゲン産生が見出された。各種コラーゲン関連遺伝子の発現に大きな差が認められない一方で、LPに比べ、HPにおいて培養上清中に含まれるコラーゲン量が減少している傾向が見出された。なお、MMP等のコラーゲン分解に関与する分子群に大きな差が認められなかったことから、コラーゲンの合成過程に必要なグリシン、プロリン、アラニンといったアミノ酸の代謝がHPとLPで異なることを示唆された。そこで、コラーゲン合成に関与するアミノ酸代謝の差異や、同アミノ酸の補給がコラーゲン合成の違いを補正するか否かについて検討を加えたが、その関連性は見出されなかった。

#### アポトーシス

(2)の結果からアポトーシス関連遺伝子の発現がHPとLPの違いに関連する可能性が明らかとなった。そこで、歯周組織に移植したADMPCの組織内における生存期間に関してラット歯周組織欠損モデルを用いて検討した。その結果、ラット歯周組織欠損部に移植したGPF標識ADMPCは少なくとも移植後1週間は検出可能であることが明らかとなった。また、移植したADMPCのアポトーシス後の処理細胞として歯周組織構成細胞が関与するか否かについてin vitroで検討を行った。蛍光標識したADMPCにアポトーシスを誘導し、歯根膜細胞と共培養後に共焦点顕微鏡にて観察を行ったところ、non professionalな貪食細胞である歯根膜細胞がefferocytosisに関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 沢田啓吾、竹立匡秀、森本千晶、平井麻絵、下村純平、川崎公輔、岩山智明、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMPC)由来Trophic因子のプロテオーム解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takedachi M, Sawada K, Morimoto C, Hirai A, Shimomura J, Kawasaki K, Iwayama T, Kitamura M, Murakami S
2. 発表標題 Therapeutic efficacy and Stem cell characteristics association in Stem cell transplantation therapy.
3. 学会等名 13th Asian Pacific Society of periodontology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹立匡秀
2. 発表標題 脂肪組織由来多系統前駆細胞の自己移植による歯周組織再生療法の開発
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹立匡秀
2. 発表標題 脂肪組織由来多系統前駆細胞移植による歯周組織再生医療の開発
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sawada K, Takedachi M, Morimoto C, Hirai A, Shimomura J, Kawasaki K, Iwayama T, Kitamura M, Murakami S
2. 発表標題 Shotgun Proteomic Analysis of the humoral factors derived from ADMPC.
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹立匡秀、村上伸也
2. 発表標題 自己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
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	藤原 千春 (Fujihara Chiharu) (00755358)	大阪大学・歯学研究科・助教  (14401)	
研究分担者	山口 佳則 (Yamaguchi Yoshinori) (20386634)	大阪大学・工学研究科・招へい教授  (14401)	
研究分担者	大倉 華雪 (Okura Hanayuki) (20589684)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪はびきの医療センター（臨床研究センター）・次世代創薬創生センター・研究員（移行）  (84430)	

6. 研究組織（つづき）

	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	村上 伸也  (Murakami Shinya)  (70239490)	大阪大学・歯学研究科・教授   (14401)	
研究 分 担 者	岩山 智明  (Iwayama Tomoaki)  (80757865)	大阪大学・歯学研究科・助教   (14401)	

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