

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17086

研究課題名（和文）type I およびtype IIIコラーゲンによる歯根膜細胞の機能・分化制御

研究課題名（英文）Type III collagen mediated-regulation of periodontal ligament-derived cell

研究代表者

藤田 和久 (Kazuhisa, Fujita)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：80805747

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：歯根膜は二つの硬組織挟まれ一定の幅を保つ線維性結合組織で歯周組織の恒常性の維持を担っている。歯根膜には多分化能を有する歯根膜幹細胞が存在し、その接着や分化は足場材料により制御されるため、歯周組織再生を目的とし、歯根膜幹細胞に適した生体材料の開発が必要とされている。そこで我々は歯根膜幹細胞の最適な継代数を検討し、ハイドロキシアパタイト（HAp）、type I及びtype III collagen上での歯根膜の挙動を評価した。歯根膜幹細胞はHApとtype I collagen上で骨芽細胞への分化を促進したが、type III collagenではその接着能と増殖能を亢進し骨形成能を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果より、type III collagen上にて歯根膜由来細胞の骨形成能が抑制され、初期接着能と細胞増殖能が亢進するため、type IIIが歯根膜の恒常性に貢献する可能性を見いだした。歯根膜は二つの硬組織に囲まれているにもかかわらず石灰化しない組織であり、咀嚼による応力を緩和する役割になっている。現在使用されている歯科用インプラント材料は、骨形成を促進する機能を向上させており、ヒトの歯周組織とは異なるメカニズムで咀嚼力を受け止めている。本研究の成果はヒト歯周組織を再生するための足場材料の最適化の一つであり、その設計指針に寄与できる可能性が提示された。

研究成果の概要（英文）：The periodontal ligament is a fibrous connective tissue that is a unique sandwiched-soft tissue between two hard tissues. That maintains a constant width and is responsible for maintaining the homeostasis of the periodontal tissue. Because periodontal ligament contains stem cells with pluripotency and their adhesion and differentiation are controlled by the scaffold material, it is necessary to develop a biological material suitable for periodontal ligament stem cells for the purpose of periodontal tissue regeneration. Therefore, we evaluated the behavior of periodontal ligament on hydroxyapatite (HAp), type I and type III collagen. Periodontal ligament stem cells promoted differentiation into osteoblasts on HAp and type I collagen, whereas type III collagen enhanced their adhesion and proliferation and suppressed bone formation.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯根膜由来細胞 生体材料 III型コラーゲン ハイドロキシアパタイト

1. 研究開始当初の背景

歯科領域では欠損部に対する治療法として、審美的・機能的に優れたインプラントが盛んに用いられている。しかしながら骨と直接結するインプラント特有の欠点も明らかになっている。応力集中による骨吸収、骨成長への非追従性、感染に対する抵抗性の減弱などのリスクが挙げられ、さらに骨性結合していることによる抜去時の侵襲の大きさのリスクも伴っている。これらのリスクを低減させるため、インプラントに歯周組織を付与した歯周組織結合型インプラントの開発も進んでいる。特に歯周組織の構成要素である歯根膜が外部刺激に対して重要な役割を担っているため、インプラントに歯根膜を付与する研究も行われており、骨性結合したインプラントに勝る機能性や耐久性が期待されている。

歯根膜はセメント質と歯槽骨に挟まれた線維性結合組織で、歯牙と歯槽骨を連結するとともに、歯周組織の恒常性の維持を担っている。近年では抜去した歯牙より採取された歯根膜組織を酵素処理することにより得られる歯根膜由来細胞とその多分化能が研究されており、歯根膜を含んだ歯周組織再生への応用が期待されている。こうした歯周組織再生を目的とした生体材料の開発が必要とされているが、細胞の増殖、分化は、細胞の接着する足場に影響されるため、歯根膜細胞の活動を維持しながら必要な分化を誘導する最適な足場材料の開発が必要である。歯根膜には、細胞外基質として主に2種類のcollagenが存在している。type I (type I) が約80%、type III collagen (type III) が約20%含まれている。type I は骨の有機成分の90%を占めており、骨形成において重要な役割を担い、インプラントのコーティングも適していると言われている。一方、歯根膜に含まれるtype IIIの量(～20%)は、歯槽骨(～1%)やセメント質(～5%)に比べ非常に多い(First author, Journal, date)。type IIIは生体内ではtype Iと共存しており、幼若な組織や損傷治癒過程の組織で多く見られるが、やがてtype Iに置換される。また、セメント質や骨に埋め込まれたシャープ線維ではtype IIIが検出され、type IIIが欠損するvascular Ehlers-Danlos syndromeでは結合組織に異常をきたすことが報告されており歯周組織にも異常が見られる。しかしながらtype IIIが歯根膜に存在する各種細胞に及ぼす影響は解明されていない。また、歯根膜のコラーゲンの代謝回転は歯肉の5倍、皮膚の15倍早いので、この非常に早い代謝回転がtype Iへの置換とtype IIIの減少を防いでいると考えられ、type IIIは、骨形成細胞である歯根膜由来細胞の石灰化を抑制し、細胞増殖能の高さを保つことにより歯根膜の恒常性維持に貢献していると考えられる。さらに蛍光染色された骨髄細胞が大腿骨骨髄に挿入されると、その蛍光染色された細胞群が歯根膜中で観察されることが報告されている。このことから、歯根膜中には骨髄細胞由来の多分化能を有した細胞が一定量存在することがわかっている。歯根膜の存在する細胞外基質の主成分であるtype I、およびtype IIIを用いた歯根膜由来細胞および骨髄細胞の挙動を比較検討した報告はこれまでなく、それぞれが各細胞に与える影響は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究においては、歯周組織結合型インプラント創製のための研究基盤を確立することを目的とし、type I およびtype IIIを用いて、歯根膜細胞の機能・分化制御と細胞外基質の関連性を解明に取り組み、各足場材料を用いた骨髄細胞の細胞形態、細胞増殖能、硬組織形成能の評価する。

3. 研究の方法

水酸化カルシウム懸濁液にリン酸水溶液を滴下し、Ca/P比が1.67になるよう混合、攪拌、静置をそれぞれ24時間行った。濾過したものを数日乾燥させ、仮焼、分級後、120MPaにて一軸加压成形を行い、水蒸気雰囲気下1250にて焼結させHApを作成した。XRDとFT-IRを用いて試料の評価を行った。HApをコントロールとし、type I及びtype III collagenをHApにコートした試料を作成した。type I及びtype III collagenは、ニッタゼラチン社製のCellmatrix Type I-CおよびCellmatrix Type IIIを用いた。それぞれのコラーゲン溶液にHApをティップコートした後に乾燥させた。各試料をHAp, Type I, Type IIIとし、コーティングの評価としてSEMによる表面構造解析と、FT-IRによる成分分析を行った。各試料を洗浄し細胞実験用試料とした。

Wistar ratの上顎臼歯を抜歯後、酵素処理を行い、歯根膜幹細胞の単離・培養・継代を行った。1～4継代目での歯根膜幹細胞のRunx2, osteopontin (OPN), F-spondin, S100A4, periostinの遺伝子発現量をreal-time PCRにて評価した。

2継代目にて試料上に細胞を播種し、1, 3日後にMTT assayを用いて細胞増殖能の評価を行った。また、細胞播種後、コンフルエントになった後に分化培地に交換し7, 10, 14日後にalizarin red Sにて染色を行い、染色された石灰化化合物を蟻酸、塩酸を用いて溶解した。415度にて吸光度を測定し、歯根膜細胞の石灰化能の評価を行った。さらにそのメカニズムを調べるために4, 7日後にreal-time PCRを用いてalkaline phosphatase (ALP)とcollagen type I alpha 1 (Col1a1)の遺伝子発現量を解析した。

4. 研究成果

XRD による HAp の結晶構造分析では、ICDD に記載されている HAp と一致するパターンを認め、HAp 単相の結晶構造を示した(図 1). FTIR では、リン酸イオンおよび水酸化物イオンに一致するピークが観察され、作製した試料は HAp 単相であることが確認された。SEM によるコーティングの評価において、HAp は緻密な多結晶体であり、Type I、Type III では線維状の構造が観察でき(図 2), FT-IR による成分分析では、collagen の特徴である Amide I, II, III バンドに帰属するピークが観察され、CH₂, CH₃ に帰属するピークも観察されたことからコーティングは適切に施されていた(図 3)。

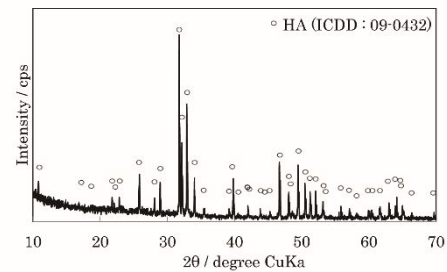


図 1 作製した試料の XRD 解析

次に、歯根膜幹細胞の最適な継代数を検討するため、real-time PCR を用いて骨芽細胞 (RUNX2, OPN)、セメント芽細胞 (F-spondin)、歯根膜細胞のマーカー (S100A4, periostin) の遺伝子発現量を測定したところ、それぞれ三継代目以降で大きな変化が見られた。

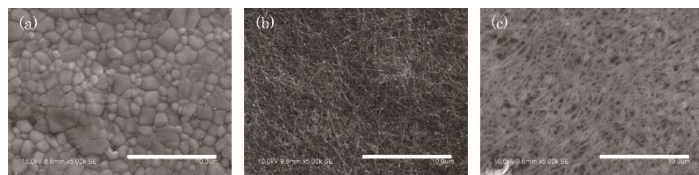


図 2 作製した試料の SEM 像

歯根膜幹細胞の細胞増殖能の評価では、HAp と Type I に比べ Type III では有意に高い値が得られた(図 4)。さらに骨伝導能試験では、HAp と Type I で骨芽細胞への分化と骨形成能が促進され、Type III でそれぞれ抑制された(図 5)。

本研究では、HAp 基盤に collagen をコートした階層性モデルを用いた。多くの研究で HAp/collagen 複合体の骨再生への有用性が報告されているが、これらは HAp の持つ優れた骨伝導能の影響も考えられる。歯周組織では、歯根膜幹細胞が HAp, type I 及び type III collagen という足場材料に接着し、歯槽骨とセメント質の固定や恒常性の維持に貢献していることから、本研究では階層性生体材料を用い歯根膜幹細胞の機能評価を行った。

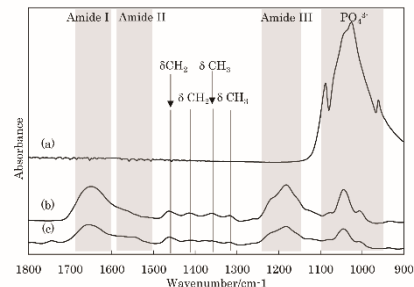


図 3 コーティングした試料の FTIR 解析

本実験で用いた歯根膜幹細胞は間葉系幹細胞と同様の多分化能を持つと考えられている。ラットより単離された歯根膜幹細胞を 1-4 継代まで継代し最適な継代数を検討したところ、RUNX2, OPN, F-spondin の遺伝子発現量は 3 継代目にて明らかな減少を認め、periostin, S100A4 では 3 継代目で大幅な増加が見られた。このことから初代細胞からの変化を最小限に抑えるための歯根膜幹細胞の最適な継代数は 2 継代目であることがわかったため本研究では 2 継代目を使用した。

細胞増殖能試験では、type III collagen において初期接着と増殖能が有意に高い値を示した。損傷組織や幼若組織形成においては、type III collagen は細胞の足場として高い初期接着能と細胞増殖能を有し、組織再生に貢献していると考えられる。歯根膜のコラーゲンの代謝回転は歯肉の 5 倍、皮膚の 15 倍早いため、この非常に早い代謝回転が type I collagen への置換と type III collagen が減少を防ぎ、歯根膜幹細胞の細胞増殖能の高さを保っていると考えられる。以上より、type III collagen は歯根膜再生において重要な役割を持っていると考えられる。

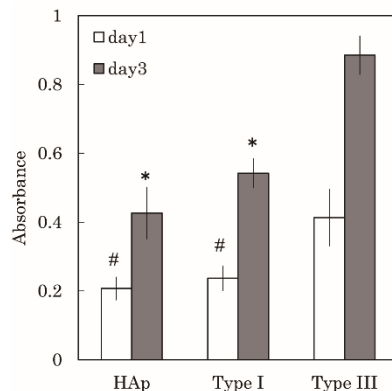


図 4 細胞増殖能試験

石灰化能試験では、骨・セメント質の主成分である HAp と type I collagen 上での歯根膜幹細胞の石灰化能が促進された。遺伝子発現量の評価では、骨芽細胞分化マーカーである ALP と Col1a1 の発現量が有意に増加していた。この結果は HAp と type I collagen コーティングが骨芽細胞と未分化間葉系細胞の骨伝導能を促進するという報告と一致することから、これらは歯根膜幹細胞を用いた場合でも硬組織形成細胞分化および石灰化を促進させるため、硬組織再生のために有用なコーティング材料であると言える。これは歯根膜幹細胞が歯槽骨やセメント質表面で硬組織形成細胞に分化し石灰化を促進することを示唆し

ている。

一方, type III collagen は有意に少ない石灰化量を示し, ALP と Col1a1 の発現量も有意に抑制された。歯根膜では type I collagen は type III collagen に覆われシャープ線維として歯槽骨やセメント質に埋入されている。シャープ線維は石灰化せずに埋入され硬組織を結びつけているため, type III collagen は歯根膜の石灰化を抑制していると考えられている。本研究では, type III collagen が歯根膜幹細胞の分化と石灰化能を抑制しているため, type III collagen は歯根膜とシャープ線維の石灰化を抑制し恒常性の維持に貢献していることを示唆している。

細胞外基質と細胞の相互作用はインテグリンを

介したシグナル伝達により制御されている。collagen のインテグリン接着部位には RGD 配列と非 RGD 配列が存在するが, RGD 配列は通常 3 重らせん構造内に隠れており, 熱処理などにより変性させなければ接着部位は露出しない。すなわち, 本実験において歯根膜幹細胞は非 RGD 配列である GER 配列に接着したと考えられる。type I collagen と type III collagen はそれぞれ異なる GER 配列を含んでおり, それぞれ異なるインテグリン吸着能を持つことが報告されている。例えば, type I collagen には GFOGER, GLOGER, GROGER, GMOGER などが存在するが, type III collagen では GFOGER, GLOGER が存在しない。骨芽細胞や前駆細胞表面に存在する $\alpha 1$ インテグリンは GFOGER と接着し分化を促進することや, インプラント表面に GFOGER コーティングを施すと type I collagen と比べ高い骨結合を示すことから, 非 RGD 配列は細胞の接着, 増殖, 分化を制御していることがわかる。しかしながら type III collagen に存在するインテグリン接着部位については未だ多くはわかっておらず, おそらく接着部位の数や部位が細胞と type III collagen の相互作用に影響を持つのではないかと考えられる。

以上より, type I collagen に接着した歯根膜幹細胞は硬組織形成細胞に分化し硬組織を形成するが, type III collagen は接着能を促進し石灰化抑制のために未分化の状態を維持することを示した。繰り返されるコラーゲンの代謝回転は豊富な type III collagen と歯根膜幹細胞の相互作用のバランスを保ち, type III collagen は骨形成を抑制し歯周組織の恒常性の維持に貢献していることを示唆している。

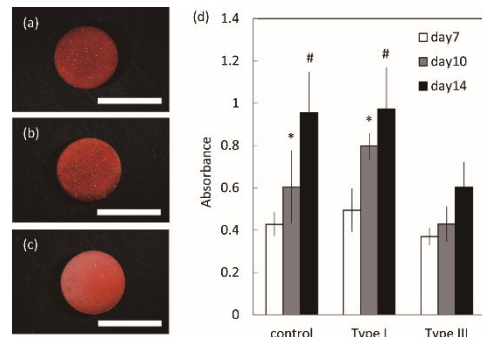


図 5 石灰化能試験

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi Kenichiro, Nozaki Kosuke, Tan Zhenquan, Fujita Kazuhisa, Nemoto Reina, Yamashita Kimihiro, Miura Hiroyuki, Itaka Keiji, Ohara Satoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Enhanced Antibacterial Property of Facet-Engineered TiO2 Nanosheet in Presence and Absence of Ultraviolet Irradiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 78 ~ 78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma13010078	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kosuke Nozaki, Kazuhisa Fujita, Naohiro Horiuchi, Kimihiro Yamashita, Kazuaki Hashimoto, Hiroyuki Miura, Akiko Nagai
2. 発表標題 Calcium deficiency regulates surface charges of -tricalcium phosphate
3. 学会等名 96th General Session and Exhibition of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------