

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09906

研究課題名（和文）死細胞シグナルを応用した新規歯周組織再生戦略

研究課題名（英文）Novel strategy for periodontal tissue regeneration using dead cell-derived signals

研究代表者

岩崎 剣吾（IWASAKI, Kengo）

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40401351

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では間葉系幹細胞の細胞死によって放出される因子の歯根膜細胞への影響を検討した。その結果、間葉系幹細胞にネクロシスを誘導した際に回収される因子は、歯根膜細胞に作用させると含まれるタンパク成分を介して細胞の遊走および増殖を促進する作用を持つことが明らかとなった。またこの際、塩基性線維芽細胞増殖因子や肝細胞増殖因子が作用の一部を担っていることが考えられた。一方、間葉系幹細胞にアポトーシスを誘導した際に回収される因子をマクロファージに作用させると、M2マクロファージのマーカー発現を誘導した。間葉系幹細胞が細胞死に至る際に創傷治癒過程を修飾する因子が放出されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞がネクロシスあるいはアポトーシスを起こし細胞死に至る際に組織の創傷治癒過程を修飾する因子が放出されることが明らかとなった。間葉系幹細胞移植後には移植細胞の細胞死が生じることから、本知見は間葉系幹細胞移植による組織再生のメカニズムの一部を説明する可能性がある。また、ネクロシスを起こして細胞死に至った間葉系幹細胞から由来する因子は歯根膜細胞の増殖、遊走を促進する作用を持ち、アポトーシスを誘導した間葉系幹細胞からはマクロファージの分化を制御する因子が放出されることが、細胞死を誘導して回収した因子を用いた新たな歯周組織再生法の開発につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, the effects of factors released upon cell death of mesenchymal stem cells on periodontal ligament cells were investigated. The results showed that the factors recovered when necrosis was induced in mesenchymal stem cells had an effect on periodontal ligament cells, promoting cell migration and proliferation via the protein components contained in the factors. In this case, basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor were thought to play a part in this function. On the other hand, factors recovered during apoptosis induction in mesenchymal stem cells elicited expression of M2 macrophage markers when applied to macrophages. It is evident that factors modifying the wound healing process are released when mesenchymal stem cells undergo cell death.

研究分野：再生

キーワード：歯周病 再生 間葉系幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病では歯を支える歯周組織が慢性的な炎症を起こし、その結果として歯の支持組織が破壊され、病気が進行すると抜歯が必要になる場合もある。歯周組織再生治療は、失われた歯周組織を再生し、歯の寿命を延ばすことを目的としている。これまで歯周組織再生療法として、さまざまな手法や材料が開発されてきたが、適応症例や再生量には未だ限界がある。そのため、新しい歯周組織再生治療の開発が求められている。近年、幹細胞の研究が進展し、体外で培養した幹細胞を移植して失われた組織を再生させる幹細胞治療が注目されている。歯周病に対しても、多くの動物実験で幹細胞移植による歯周組織の再生が報告されており、さらにヒトでの臨床研究も始まっている。しかし、幹細胞移植による歯周組織再生のメカニズムには不明な点が多い。我々の過去の研究では、間葉系幹細胞を歯周組織に移植すると歯周組織の再生が促進されるが、移植細胞の局所定着は予想より少ないことが観察された。移植細胞の一部が局所に定着しないにもかかわらず組織が再生するメカニズムは依然として不明であった。一方、創傷治癒の過程では、一部の細胞がネクロシスやアポトーシスなどの形で細胞死に至ることが知られている。近年、これらの死細胞が単に消失するのではなく、創傷治癒過程に影響を与えるシグナルを残すことが明らかになっている。幹細胞移植による歯周組織再生における、移植細胞の細胞死とその後の組織再生の関係については、これまで全く検討されていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は間葉系幹細胞が細胞死に至った際に放出される因子に歯周組織の創傷治癒に参加する細胞への影響があるのか、また、それらの因子が歯周組織再生を誘導する能力があるのか、について明らかとすることである。

### 3. 研究の方法

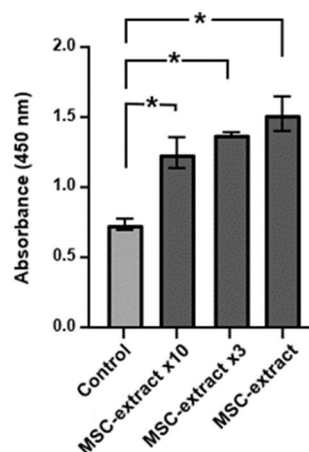
歯周組織再生において中心的な役割を果たす細胞として歯根膜細胞を培養し実験に用いた。歯根膜細胞は Lonza 株式会社より購入し培養した。また、間葉系幹細胞として不死化骨髄間葉系幹細胞株 UE7T13 を、単球・マクロファージ細胞株としては THP-1 を用いた。間葉系幹細胞の細胞死には 37 と 196 の凍結溶解を繰り返すことによって強制的に細胞にネクロシスを誘導した。一方、アポトーシスの誘導には紫外線 (UV) の細胞への直接照射あるいは、化学的なアポトーシス誘導剤であるスタウロスポリンによる刺激を用いた。細胞抽出物にアセトン沈殿法を行いタンパク分画の回収を行った。

細胞死の検討は、処理細胞を 7AAD, PI, Annexin V-FITC にて染色し、フローサイトメトリーを用いて検討した。また、細胞の viability の検討には WST-8 法を用い、96 ウェルプレート内で培養した培養上清の吸光度測定によって比較した。増殖期細胞の検討には Ki67 の免疫染色法を用い、Ki67 陽性細胞数を蛍光顕微鏡による観察像上で比較検討した。細胞遊走の検討には、8 μメートルのポアサイズを持つ膜を用いた Boyden Chamber 法によって解析を行った。死細胞由来因子のタンパク濃度は BCA 法によって測定し、SDS ゲル電気泳動、クマシーブルー染色によってタンパク成分の可視化を行った。さらに、タンパク成分の詳細な検討に LC-MS/MS 法を用いて、死細胞由来因子に含まれる成分の網羅的解析を行った。さらに増殖因子については Protein array 解析を用いて網羅的に解析した。幹細胞由来タンパク抽出物を作用させた歯根膜細胞の遺伝子発現について次世代シーケンサーを用いた RNA-sequencing 解析を行った。また遺伝子発現の検討はターゲット遺伝子特異的プライマーと SYBR green を用いた定量的 PCR 法を用いて行った。

### 4. 研究成果

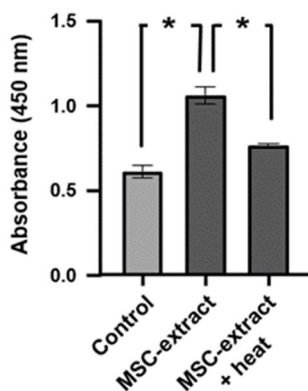
#### 間葉系幹細胞からの細胞抽出物による歯根膜細胞の増殖への影響

間葉系幹細胞株 UE7T13 を 37 と 196 の凍結溶解サイクルを 3 回繰り返すことによってネクロシスと考えられる細胞死が誘導された。その後、遠心分離、フィルトレーションによるデブリ成分の除去を行い、間葉系幹細胞抽出物 (MSC-extract) を作製した。この MSC-extract を歯周組織再生に重要な役割を持つと考えられる歯根膜 (PDL) 細胞へ作用させると、その MSC-extract のタンパク濃度依存的に PDL 細胞の増殖が増強されることが明らかとなった (図 1)



(図 1)

さらに、この MSC-extract による PDL 細胞の増殖促進活性は MSC-extract の 65 の加熱処理によって消失することも明らかとなった(図 2)。



(図 2)

また、タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドを作用させた UE7T13 から回収された MSC-extract では PDL 細胞の細胞増殖作用が有意に減少していることも確認された。これらの結果から、MSC-extract の PDL 細胞の増殖促進作用は、含まれるタンパク成分に大きく依存することが考えられた。そこで、MSC-extract からアセトン沈殿法を用いてタンパク成分のみを抽出し間葉系幹細胞タンパク抽出物(MSC-protein)を作製し、PDL 細胞の細胞増殖への影響を検討したところ、MSC-protein は濃度依存的に PDL 細胞の viability を増強し、細胞増殖期に発現する Ki67 タンパク発現を亢進させることが明らかとなった。これらの結果は、MSC にネクローシスを誘導した際に回収される MSC-extract は PDL 細胞の細胞増殖を含まれるタンパク成分を介して増強する能力があることを示していると考えられる。

#### 間葉系幹細胞からの細胞抽出物による歯根膜細胞の遊走への影響

PDL 細胞の増殖と共に歯周組織再生を促す重要な現象の一つに創傷治癒部位への PDL 細胞の遊走がある。そこで MSC-extract による PDL 細胞の細胞増殖への影響を検討したところ、MSC-extract は PDL の遊走を有意に増強し、その遊走促進活性が MSC-extract の加熱処理によって大きく減弱することが明らかとなった。この結果は、細胞増殖同様に MSC-extract による細胞遊走促進作用が含まれているタンパク成分に依存していることを示していたため、次に MSC-protein を PDL へ作用させ遊走への影響を検討した。その結果、MSC-protein は PDL の遊走を増強することが観察された。これらの結果は、MSC-extract による PDL 細胞の遊走促進作用が、増殖促進作用と同様にタンパク成分によっていることを示していると考えられる。

#### MSC-protein に含まれる因子

MSC-extract のタンパク抽出物である MSC-protein が PDL の増殖および遊走を促進することから MSC-protein の内容物について検討を進めた。SDS-Page によって MSC-extract および MSC-protein を展開すると数 kDa から数百 kDa までさまざまなタンパク質を含むことが観察された。LC-MS/MS 解析を用いて網羅的にタンパク成分を解析すると、4388 のタンパク質が確認され、ヒットの多かったタンパクには酵素、細胞骨格タンパク、マトリクスタンパクが多く検出された。さらに、MSC-protein を PDL に作用させた際に発現の変動する遺伝子を RNA-sequence によって分析し GeneOntology 解析を行ったところ、細胞増殖、細胞分裂、核分裂、に関連する遺伝子の変動が大きいことが明らかとなった。これらの結果を受けて、MSC-protein に含まれている増殖因子について Protein array を用いて詳細に検討した。その結果、MSC-extract および MSC-protein とともに塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)および肝細胞増殖因子(HGF)が高濃度で含まれていた。これらの結果は、MSC-extract は多種多様なタンパク成分を含み、PDL に作用させると細胞増殖や細胞分裂などの細胞機能と関連する多くの遺伝子発現を変動させることを示している。さらに細胞増殖を亢進する bFGF や HGF を豊富に含んでいることも明らかとなった。

#### 間葉系幹細胞のアポトーシスによって放出される因子

ネクローシスと共に重要な細胞死の形態であるアポトーシスについても検討を行った。アポトーシス誘導シグナルとして紫外線 (UV)を用いて UE7T13 細胞に作用させてアポトーシスの発生を検討したところ、想定よりアポトーシスの誘導効率が低く、UE7T13 が UV 誘導アポトーシスに抵抗性が高いことが観察された。そこで、アポトーシス誘導シグナルを化学的な薬剤であるスタウロsporinに変更したところ、ほぼ 100 パーセントのアポトーシスが誘導された。この

条件下で UE7T13 細胞にアポトーシスを誘導しその際に放出される因子を回収した。アポトーシス由来因子を単球・マクロファージ細胞株へ作用させて遺伝子発現を検討した所、CD163 および IL-10 の遺伝子発現が上昇していることが明らかとなった。これらの結果はアポトーシスによって細胞死に至った細胞から放出される因子がマクロファージの分化に作用し創傷治癒に影響する可能性を示唆するものと考えられる。

ネクローシスおよびアポトーシスに至った間葉系幹細胞から放出される因子に創傷治癒促進を促す因子が含まれていることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Peng Y, Iwasaki K, Taguchi Y, Umeda	4. 巻 58
2. 論文標題 MSC-extract inhibites LPS-induced TNFa expression in THP-1.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18905/jodu.58.1_1	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 Iwasaki K, Wu F, Hashimoto Y.	4. 巻 57
2. 論文標題 iPS cell-derived extracts enhance proliferation of periodontal ligament cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 239-243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18905/jodu.57.2_239	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 Peng Y, Iwasaki K, Taguchi Y, Umeda M.	4. 巻 57
2. 論文標題 The extracts of mesenchymal stem cells induce the proliferation of periodontal ligament cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 119-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18905/jodu.57.1_119	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 Iwasaki K, Peng Y, Kanda R, Umeda M.	4. 巻 55
2. 論文標題 Global gene expression profiling of periodontal ligament cells after ascorbic acid treatment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 149-157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18905/jodu.55.1_149	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎剣吾、彭 一豪、田口洋一郎、石川 烈、梅田 誠.
2. 発表標題 間葉系幹細胞由来タンパク抽出物による新規歯周組織再生治療
3. 学会等名 第66回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 彭 一豪、岩崎剣吾、田口洋一郎、梅田 誠
2. 発表標題 間葉系幹細胞抽出物は歯根膜細胞の増殖を誘導する
3. 学会等名 第575回 大阪歯科学会例会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 彭 一豪、岩崎 剣吾、田口 洋一郎、梅田 誠
2. 発表標題 間葉系幹細胞抽出物は歯根膜線維芽細胞の増殖を促進する
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩崎剣吾、石川 烈
2. 発表標題 細胞シート技術を用いた歯周組織を有するインプラント作製の可能性
3. 学会等名 第10回バイオインテグレーション学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------