

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号： 14401  
 研究種目： 挑戦的萌芽研究  
 研究期間： 2010～2011  
 課題番号： 22659379  
 研究課題名（和文）：非侵襲性歯周組織再生療法の開発-磁性化幹細胞デリバリーシステムの応用-  
 研究課題名（英文）：Development of novel minimal intervention methods for periodontal tissue regeneration therapy  
 研究代表者  
 山田 聡 (YAMADA SATORU)  
 大阪大学・歯学部附属病院・講師  
 研究者番号： 40359849

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞デリバリーシステムを歯周組織再生療法に応用することにより、患者への負担が少なく効率性の高い新規の非侵襲性歯周組織再生療法を樹立するための足がかりとなる方法・技術の開発を目指し、組織幹細胞への外来基質の効率的な取り込み方法について比較検討を行った。その結果、歯周組織再生に重要な役割を担う歯根膜幹細胞を対象とした場合、エレクトロポレーション法が最も効率性の高い方法であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In order to develop novel minimal intervention therapies for periodontal tissue regeneration in the future, in this study, we investigated which methods are the most effective for introducing exogenous molecules into mesenchymal tissue stem cells for periodontal tissue regeneration. We found that the electroporation method is the most effective, especially utilizing periodontal ligament stem cells. We could conclude these information might be a first step to developing the future regeneration therapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	0	1,300,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	450,000	3,250,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・歯周治療系歯学

キーワード： 歯周組織再生療法

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞移植を含む複数の新規歯周組織再生医療が近未来に確立されることが確実視され、多くの歯周病患者の QOL が向上するものと期待されている。一方、医療の高度化および人口高齢化により、種々の全身疾患を抱えた患者や高齢者への歯周治療の必要性がますます高まっている。そのため、局所的には歯周組織再生療法の適応であっても、全

身的な問題から歯周外科処置が不可能なケースが今後も増加するものと考えられる。高度高齢化社会を迎える日本において、患者に優しく安全で予知性の高い歯周組織再生医療を提供することは、これまで以上に社会的急務となるものと予想される。

我々はこれまでに、歯根膜の組織特異性を分子・遺伝子レベルから解明し、FGF-2 や脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた新規の歯

周組織再生療法の研究開発を展開することにより歯周組織の細胞分子基盤に基づく多面的な歯周組織再生研究を推進している。しかし全ての再生療法は外科処置を伴うものであり、患者の全身的风险によってはその適応が制限を受けることになる。そこで本研究課題では、外科的処置を全く必要としない安全かつ効率性の高い新しい概念の非侵襲性歯周組織再生療法を発想するに至った。歯周組織再生療法は、最も橋渡し研究が進んだ再生治療の一つと言える。しかしながら、手術の低侵襲性について考えてみると、従来の歯周組織再生療法は、歯周外科処置およびその侵襲を伴った術式が必要とされている。従って、患者への負担を限りなく低減した歯周組織再生治療法の開発には、既存の概念とは全く異なった新しい発想が求められる。医学分野では、内視鏡やカテーテルを用いた低侵襲外科処置がめざましい発展を遂げ、患者への手術負担が激減し、QOLの向上が図られている。これら幹細胞技術と本研究課題の成功により確立される歯周組織再生療法技術とを合わせることで、全身的な問題から歯周組織再生治療を受けることができなかつた重度有病者や高齢者に対しても、体に優しく安全で予知性の高い歯周組織再生医療を提供することが可能となり、「口」が支えるQOLの維持向上に果たす効果は計り知れないと思われる。

## 2. 研究の目的

本研究は、必要とされる幹細胞を活躍すべき微小環境へ磁力を利用して搬送する細胞デリバリーシステムを開発し、歯周組織再生療法に応用することにより、患者への負担が非常に少なく効率性の高い新規の非侵襲性歯周組織再生療法を樹立する足がかりとなる方法、技術の開発を目指した挑戦的萌芽研究である。

## 3. 研究の方法

(1) 間葉系幹細胞の硬組織形成分化能解析  
マウス歯根膜幹細胞株 MPDL6 および MPDL22、マウス歯肉線維芽細胞株 MG/B6、マウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1、マウス線維芽細胞株 NIH3T3、胎生 13.5 日のマウス胎児から樹立した間葉系幹細胞 (MEF) をそれぞれ石灰化誘導培地 (10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid 含有 10% FCS  $\alpha$ -MEM) にて長期培養し、経日的に硬組織形成細胞への分化指標となるアルカリフォスファターゼ (ALPase 活性) およびアリザリン染色による石灰化物形成を解析した。

### (2) トランスフェクション実験

レーザーにより緑色発光を示す GFP 発現ベクターをトランスフェクション試薬を用いて細胞内へ導入することにより、いずれの

方法が最も効率よく細胞内導入を行うことができるのかを検討した。リポフェクション法として、Effectine、エレクトロポレーション法として Nucleofector、センダイウイルス法として Genome one を用いた。宿主細胞は、MPDL22、HEK293、EPC19 細胞を用いた。各細胞へ pMaxGFP をトランスフェクションし、48 時間後にレーザー共焦点顕微鏡にて観察した。視野中の GFP 陽性細胞をカウントすることにより、導入効率を計算した。

### (3) レンチウイルスによる取り込み試験

歯根膜細胞および HEK293 細胞に新しい細胞トランスフェクション法であるレンチウイルス法を使って、GFP 発現ベクターを遺伝子導入し、トランスフェクション法の効率を検討した。導入効率の解析には、経日的にレーザー蛍光顕微鏡を用いて生細胞の状態を GFP 陽性細胞数を測定した。

### (4) 外来基質取り込み細胞の分化機能解析

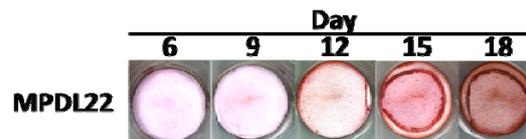
外来基質である GFP を細胞内に取り込ませた細胞の生存率については、培養皿に付着した GFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡にて観察することにより判定した。さらに、付着している細胞を回収しトリパンブルー染色により、生細胞、死細胞数を測定した。また、外来基質の溶媒となる DMSO の細胞分化過程における細胞障害性を解析するために、トリパンブルー染色による生細胞、死細胞数の測定、および歯根膜細胞を DMSO 添加の石灰化誘導培地にて硬組織形成細胞へと分化誘導を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 間葉系幹細胞の硬組織形成分化能解析

各細胞の硬組織形成細胞への分化能を評価した結果、MPDL22 と MC3T3-E1 は、ALPase 活性および石灰化物形成能の著明な上昇を示し、MPDL6、MG/B6、NIH3T3、MEF は、ALPase 活性および石灰化物形成能の上昇は示さなかった。従って、硬組織形成分化能を有する MPDL22 と MC3T3-E1 が歯周組織再生に適した細胞株として有用であることが示された。図 1 に MPDL22 の硬組織形成細胞への分化過程における石灰株形成を解析したアリザリンレッド染色像を示す。

図 1 MPDL における硬組織形成細胞分化



### (2) トランスフェクション実験

表 1 に示すように Nucleofector を用いたエ

レトロポレーション法が、全ての細胞株において最も高い導入効率を示すことが明らかとなった。上記間葉系幹細胞株への磁性化コロイドを導入する方法として、エレクトロポレーション法を用いた電気的導入法が適していることが示された。図2では、レーザー共焦点顕微鏡にて観察された緑色に発光する GFP 陽性 MPDL22 を示す。

表1 トランスフェクション効率実験

使用細胞 試薬名	MPDL22	293	ECP19
Effectine	×	◎	○
Nucleofector	○	◎	○
Genome one	×	○	○

Transfection efficiency

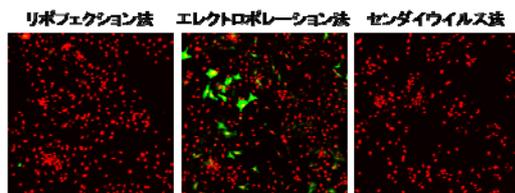
× : 0%、○ : 0-50%、◎ : 50%以上

Effectine : リポフェクション法

Nucleofector : エレクトロポレーション法

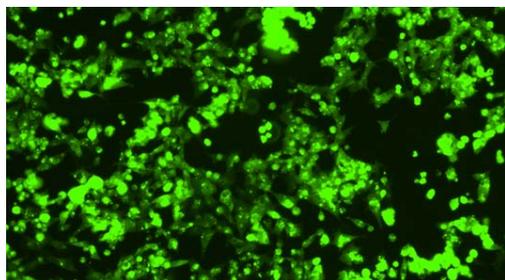
Genome one : センダイウイルス法

図2 MPDL22 における GFP 導入効率



(3) レンチウイルスによる取り込み試験  
細胞の種類により導入効率が異なっており、HEK293 細胞においては、非常に高い効率での外来基質の導入が示された (図3)。一方、歯根膜細胞においては、導入効率は非常に低いことが明らかとなった。

図3 HEK293 細胞におけるレンチウイルストランスフェクション法



トランスフェクション後、6日目の顕微鏡像。緑色に発光する GFP 陽性細胞が観察されている。

(4) 外来基質取り込み細胞の分化機能解析

トランスフェクションの条件によって、細胞生存率が異なることが明らかとなった。細胞培養系への基質溶媒添加は、歯根膜細胞の生存率 (図4)、歯根膜細胞分化過程における ALPase 活性 (図5) および硬組織形成細胞への分化過程 (図6) へは影響を及ぼさないことが明らかとなった。

図4 DMSO 添加群による細胞生存率

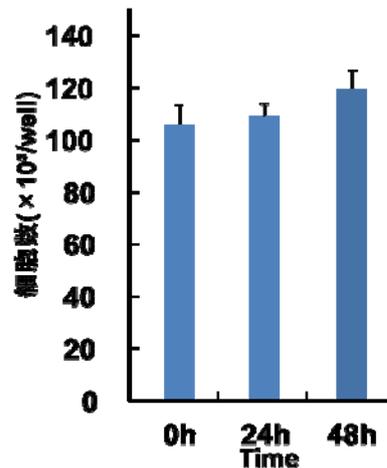


図5 DMSO 添加群における ALPase 活性

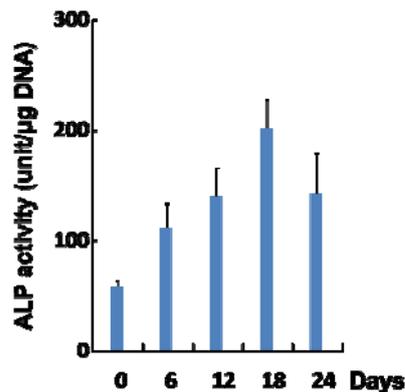
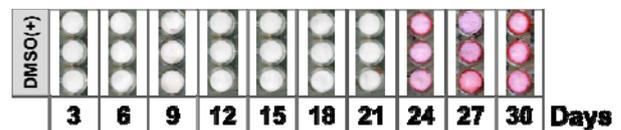


図6 DMSO 添加群におけるアリザリンレッド染色像



5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

① S. YAMADA, Analysis of a novel gene, FLJ25143 identified by human periodontal ligament cDNA library. 9th Asian Pacific

Society of Periodontology  
Meeting, 2011. 9. 10. 香港

②N. OZAKI, S. YAMADA, C. FUJIHARA,  
T. TAUCHI, T. KAJIKAWA, T. AWATA, Y.  
OZAWA, S. MURAKAMI, Analysis of  
Cathepsin K in human periodontal  
ligament cells. 第58回国際歯科研究学会日  
本部会 (JADR) 、2010. 10. 19. 小倉市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 聡 (YAMADA SATORU)  
大阪大学・歯学部附属病院・講師  
研究者番号：40359849

### (2) 研究分担者

野崎 剛徳 (NOZAKI TAKENORI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：30263304

橋川 智子 (HASHIKAWA TOMOKO)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：00362682  
(H23. 3.31.まで分担者として参画)

### (2) 研究協力者

梶川 哲宏 (KAJIKAWA TETSUHIRO)  
大阪大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：90611252

尾崎 亘弘 (OZAKI NOBUHIRO)  
大阪大学・歯学部附属病院・専修歯科医  
研究者番号：80632132