

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390475

研究課題名(和文)ハニカムマイクロアレイを用いた次世代型歯周組織再生医療の創生

研究課題名(英文)Creation of next generations of periodontal tissue engineering by applying honeycomb microarrays

研究代表者

島内 英俊(Shimauchi, Hidetoshi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70187425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、トポグラフィー作用を有するハニカムマイクロフィルムとCaイオン濃度などの細胞外微小環境の調節技術を組み合わせることで新規スキャフォールドを開発し、歯周組織再生治療テクノロジーを創生しようというものである。その結果、生体吸収ポリマー製ハニカムフィルムによるヒト歯根膜細胞シート作製の可能性を示すと共に、無機イオンによる歯周組織細胞の分化誘導にprostaglandin E2のオートクライン作用が重要であることに加えて、ナノ化ハイドロキシアパタイトによるBMP-2産生誘導を明らかにした。以上の結果、歯周組織細胞の増殖と分化の両方を誘導可能な新規スキャフォールド開発の基盤が確立された。

研究成果の概要(英文)：This research project was aimed to develop the new strategy for periodontal regeneration by combining both technologies of honeycomb microfilm (HF) and conditioning of the extracellular microenvironment for periodontal stem cells. As the result of studies, we indicated that: 1) a biodegradable polymer HF is suitable for the carrier of periodontal ligament cell sheet, 2) autocrine secretion of prostaglandin E2 is essential for the differentiation of periodontal cells stimulated with Ca²⁺ ion and mechanical stress, and 3) nano-hydroxyapatite could upregulated BMP-2 expression independent of ion release. Furthermore, OCP/gelatin composite inlay increased angiogenesis as well as bone regeneration in the rat calvaria defect model. Our research results well established the foundations of new concept scaffold technology that can stimulate both cell proliferation and differentiation.

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：歯周外科学 歯周組織再生 スキャフォールド

1. 研究開始当初の背景

組織工学の3要素は言うまでもなく、(1)細胞、(2)細胞増殖・分化因子(サイトカイン)、(3)スキャフォールドである。歯周組織再生(ペリオドンタルティッシュエンジニアリング)の領域では、(1)については従来から骨髄幹細胞、歯髄・歯根膜の組織幹細胞、脂肪組織幹細胞などの研究が行われてきたが、いずれも採取方法や収量に問題があった。2010年ヒト歯肉線維芽細胞からiPS細胞が初めて作製され(Egusa H. et al, PLoS One, 2010)、その多能性が明らかにされ、新たな細胞ソースとしての可能性が示された。一方、(2)のサイトカインについては、従来のエムドゲインだけでなく、PDGF+ β -TCP(GEM21S[®])やFGF-2などのサイトカイン療法の実用化が進んでいた。しかし(3)スキャフォールドに関する研究についてエポックメイキングなものは見当たらないのが研究開始当時の状況であった。これまでにコラーゲンやヒドロキシプロピルセルロース(HPC)といったゲル状物質あるいは β -TCPのような骨形成誘導能の高い物質がキャリアとして用いられてきたものの、3次元的な細胞増殖誘導や賦形性はみられない。

現在の歯周組織再生の限界は、言うまでもなく再生できる組織量が骨欠損の形態に依存していることである。今の技術では水平性吸収のみならず、骨壁数の少ない大きな垂直性骨吸収を治療することはできない。現状を打破するために、先に述べた組織工学の3要素に立ち返って俯瞰すると、立ち後れたスキャフォールド開発を推進する事が求められる。ペリオドンタルティッシュエンジニアリングを推進するためスキャフォールドに求められる条件として、細胞の立体培養が可能なこと、大きな欠損を再生するためにそれ自体が細胞賦活能を有すること、垂直的・水平的に失われた歯周組織を模倣できる賦形性を有することが上げられ、これらの性質を兼ね備えたスキャフォールドの開発が待たれていた。

2. 研究の目的

我々の研究グループでは、これまで連携研究者の下村政嗣博士(東北大学多元物質研究所)と協力して、全く新たなコンセプトによるハニカムマイクロアレイを用いた培養歯根膜細胞シート療法の開発に取り組んできた。ハニカムマイクロアレイフィルム(ハニカムフィルム)では5~30 μ mという、細胞サイズに相当する小孔が緻密且つ均一に生成されている。その立体構造には海綿骨内の微小な骨梁形態をモチーフとした無数のピラーフレームが形成されており、ここに播種された細胞は増殖の過程で上下左右いずれにも伸展できるので、組織化の際は本来の生体に近い3次元連続構造に発展する。加えてフィルム自体の3次元構造が細胞にとってトポグラフィック効果を有しており、細胞の増殖・分化に影響を及ぼすことが期待される。

これまでの研究により、フィルム内の小孔に歯根膜細胞が侵入して多層の細胞からなるシート状構造が形成され、かつ増殖が活発になることを明らかにした。一方、硬組織再生を担う細胞の増殖・分化は、サイトカインによる誘導やトポグラフィック効果のみならず、細胞をとりまくカルシウムやリン酸といった無機物による微小環境でコントロールされる。我々は、歯髄細胞やセメント芽細胞が細胞外Caを感知して、FGF-2やBMP-2を産生する機構を有することを報告してきた。産生されたサイトカインはオートクラインに作用して細胞の分化や増殖の調節に働いているものと期待され、ハニカムフィルムを用いて作製された細胞シートに、さらにサイトカインや無機物による微小環境の調節を組み合わせることで、より高い効率で歯周組織再生をコントロールできる可能性が期待される。本研究の目的は、上述のスキャフォールド技術と細胞環境コントロールを組み合わせることで、歯周組織再生のための最適条件を明らかにしようというものである。

3. 研究の方法

本研究は、細胞に対してトポグラフィックを有するハニカムマイクロフィルムとCaイオン濃度などの細胞外微小環境の調節技術を組み合わせることで新規スキャフォールドを開発し、進化型の歯周組織再生治療テクノロジーを創生しようというものである。そのため、本研究は以下の研究計画と方法により遂行した。

(1)歯周組織再生に最適なハニカムフィルム(HF)の開発と歯周組織細胞に及ぼすトポロジック効果の検証

これまでの研究においては、主にpolyesterene(Pst)製のHFを使用して歯根膜(PDL)細胞に及ぼす効果を調べてきた。しかしこれは非吸収性材料であり、生体移植に適さないため、poly(ϵ -caprolactane)(PCL)やポリ乳酸などの生体分解性高分子を用いたHFが及ぼすトポロジック効果をPDL細胞に与えるかを以下の系を用いて*in vitro*で検証した。

PDL細胞の高分子HF上での培養による自己組織化の確認

PDL細胞の高分子HFによる増殖・分化誘導の確認

(2)歯周組織再生に適した無機イオン徐放性担体の検討

これまでの研究により、細胞外無機イオン(Ca^{2+} , PO_4^{2-})濃度を上昇させることで、PDL細胞やヒト歯髄細胞などからBMP-2やFGF-2産生が誘導されることを明らかにしてきた。そこで本研究においては、歯周組織再生に応用し得る無機イオン徐放性担体として octacalcium phosphate (OCP)及び nanohydroxyapatite (nano-HA)に着目し、これらが*in vitro*あるいは*in vivo*においてPDL細胞やセメント芽細胞に及ぼす増殖分化誘導作

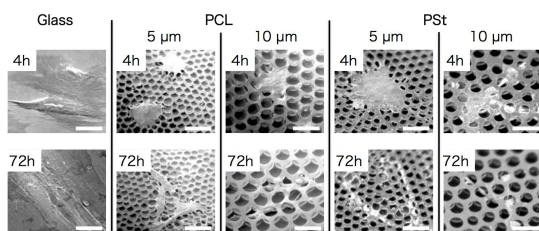
用を引き起こすのかを検証すると共に、そのシグナル伝達機構についても検証した。加えて、歯周組織再生は他の臓器再生とは異なり、常に咬合というメカニカルストレスに曝されているため、力学的影響が細胞内シグナル伝達に及ぼす影響についても調べた。

4. 研究成果

(1)生体分解性高分子を用いた HF が PDL 細胞の増殖分化誘導に及ぼす影響について PCL 製の HF を PDL 細胞の培養に用いて、Pst 製のものと比較検討を行った。

PDL 細胞培養による自己組織化能の比較 PDL 細胞を Pst あるいは PCL 製 HF、ガラス(コントロール)の各基板上で 4-72 時間培養し、HF ポア内への細胞侵入について比較した。その結果、Pst 製では 5, 10 μ m 孔径で細胞の侵入がみられたのに対し、PCL 製では 10 μ m のみに PDL 細胞の侵入を認め、材質の違いにより自己組織化能に違いを生じる可能性が示された(図 1)。しかしいずれの HF も 28 日間培養を延長することで細胞の重層化が起り、細胞シート構造を呈した。

図 1 各基板上での PDL 細胞培養後の電顕像 (FE-SEM 像 X1300, scale bar=20 μ m)

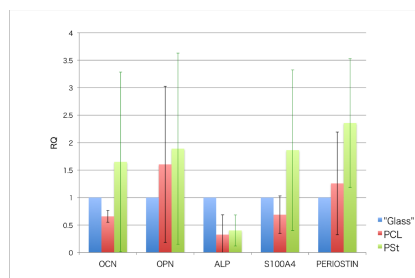


HF による PDL 細胞の増殖・分化応答の誘導

PDL 細胞を PCL 製の平板ならびに 10 μ m 孔径 HF 上で 72 時間培養し、細胞数をカウントした。その結果、PCL 平板では 72 時間で細胞が剥落したのに対し、HF では時間依存的な増殖がみられた。この結果は両基板の対水接触角のデータと一致し、ハニカム構造が細胞接着に適することが示された。

一方、孔径 10 μ m の Pst あるいは PCL 製 HF 上で PDL 細胞を培養し、硬組織産生細胞への各種分化マーカーの発現を調べた(図 2)。

図 2 各基板上での PDL 細胞の分化マーカー mRNA 発現 (72 時間培養)



その結果、PCL 製 HF でも osteopontin (OPN)

発現の上昇がみられるが、Pst 製では加えて osteocalcin (OCN) 発現の上昇もみられることが明らかとなり、材質による差がみられた。この原因として Pst と PCL の硬さの違いの影響が考えられた。

以上の結果から、生体分解性高分子ポリマー製の HF は細胞増殖を安定的に誘導し、細胞シート様の構造を持つ自己組織化を生じるが、さらに硬組織形成細胞への分化誘導を行うためには、何らかの刺激を併用することが必要と判断され、本研究の仮説を裏付けるものとなった。

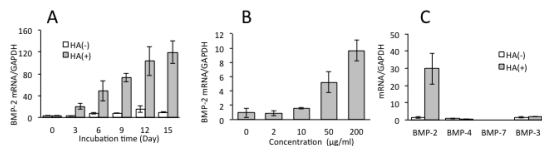
(2)歯周組織再生に適した無機イオン徐放性担体の検討

nano-HA が歯周組織構成細胞の分化に及ぼす作用の検討

より効率的に歯周組織細胞に分化誘導作用を誘導する可能性のある担体として nano 粒子化されたハイドロキシアパタイト (nano-HA) に着目し、PDL 細胞に及ぼす作用を検討した。

PDL 細胞に nano-HA を添加して培養を行うと、図 3 に示した通り濃度・時間依存的に BMP-2 mRNA 発現が誘導され、しかもその作用は他の BMP ファミリー分子にはみられないことが示された。

図 3 nano-HA 添加による BMP-2 発現の特異的上昇



さらにこの発現がいかなる作用によるかを調べるために、nano-HA からの Ca²⁺、PO₄²⁻放出の可能性について調べた(図 4)。

図 4 nano-HA による BMP-2 発現誘導と Ca²⁺、PO₄²⁻イオン放出の関与

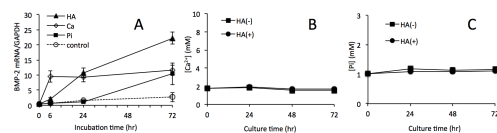


図 4A に示した通り、nano-HA 添加による BMP-2 発現はいずれのイオン単独で加えた場合よりも増加しており、しかも nano-HA から Ca²⁺、PO₄²⁻のいずれの放出もみられないこと(図 4B, C)から、nano-HA による PDL 細胞の BMP-2 発現は nano 粒子としての性状が大きく関わっていることが明らかとなった。

歯周組織構成細胞の分化に関わる細胞内シグナル誘導の検討

さらに Ca イオンによる歯周組織細胞の増殖・分化誘導のシグナル伝達機構を明らかにすることを旨として、Ca イオン刺激によるセ

メント芽細胞の FGF-2 発現上昇のシグナル伝達について詳細に解析を行った。

図5 Ca 刺激による FGF-2 および COX-2 mRNA 発現上昇と PGE₂ 産生誘導

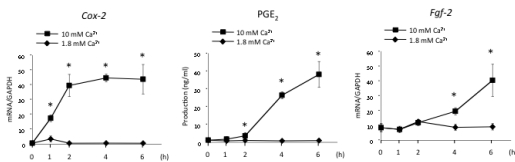
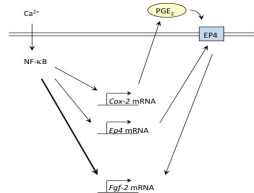


図5に示した通り、セメント芽細胞をCa刺激するとFGF-2遺伝子に加え、COX-2 mRNA発現とPGE₂産生の上昇が認められた。このPGE₂がオートクラインに同細胞に作用する可能性につき調べたところ、図6に示した経路でFGF-2産生が上昇することが明らかとなった。

図6 EP4レセプターを介したCa刺激によるFGF-2産生増強機構



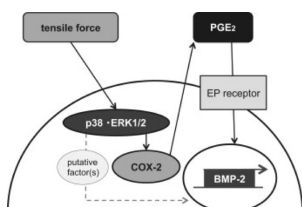
この結果はEP4レセプターアゴニストを用いた歯周組織再生誘導薬の創薬の可能性を示唆するばかりでなく、PGE₂が炎症反応から治癒反応への転換に当たってのキー分子の候補であることを示すものと考えられる。

メカニカルストレスが歯周組織構成細胞の分化誘導に及ぼす影響

歯周組織再生の場の大きな特徴は、常に感染のリスクばかりでなく、咬合力というメカニカルストレスに曝されていることである。そこで、この力がPDL細胞の分化に対してポジティブに作用するのか、それともネガティブに働いているのかを、細胞に伸展刺激を加えて調べた。

その結果、PDL細胞に伸展刺激を加えることでERK1/2, p38 MAP kinaseが活性化されてCOX-2発現が増加し、その結果産生されたPGE₂がやはりオートクラインに作用することでBMP-2産生が上昇するという新たな経路を見いだすに至った(図7)。

図7 メカニカルストレスによるPDL細胞のBMP-2発現誘導機構



OCP/ゼラチン複合体による新生血管増生誘導作用の*in vivo*での検討

OCPはHAの前駆物質であり、その転換過程においてCa²⁺, PO₄²⁻イオンを放出することがすでに知られている。またOCP/ゼラチン複合体による優れた骨再生効果と生体吸収性もすでに報告されており、骨組織再生の有望な担体として期待されており、本研究で作製する細胞シートとの併用も可能である。このような担体を用いた骨組織再生においては、担体内部への血管新生が重要であるため、自己修復しないラット臨界サイズ頭蓋骨欠損モデルを用いて、*in vivo*で骨再生と血管新生の関係を調べた。

その結果、埋入2週目においてOCP/ゼラチン複合体を埋入した場合は、ゼラチンのみあるいは未埋入欠損部に比べて、多くの血管新生が認められ、それ以降の骨新生量の増加に繋がることが示唆された。

(3)研究成果の総括と今後の展望

本研究の遂行により、歯周組織再生に応用可能な歯根膜細胞シート作製のための基板としての生体吸収高分子製ハニカムフィルム(HF)の可能性が明らかになったが、同時に硬組織形成細胞への分化誘導のための生物シグナルを併用することが重要であることが明らかとなった。

このシグナルとしては当初の計画で想定していた無機イオン(Ca²⁺, PO₄²⁻)に加えてnano粒子応用の可能性が示されたばかりでなく、炎症反応と関わりの深いprostaglandin誘導体(選択的レセプターアゴニスト)を用いた薬物療法も可能と考えられた。今後、本研究遂行により得られた知見を最大限活用することにより、臨床応用に向けたトランスレーショナルリサーチの展開に結びつけていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5件)

Suzuki R, Nemoto E, Shimauchi H, Cyclic tensile force up-regulates BMP-2 expression through MAP kinase and COX-2/PGE₂ signaling pathways in human periodontal ligament cells, *Exp Cell Res*, 査読有、323巻、232-241
DOI:10.1016/j.yexcr.2014.02.013.

Kanaya S, Nemoto E, Sakisaka Y, Shimauchi H, Calcium-mediated increased expression of fibroblast growth factor-2 acts through NF-κB and PGE₂/EP4 receptor signaling pathway in cementoblasts, *Bone*, 査読有、56巻、2013年、398-405
DOI:10.1016/j.bone.2013.06.031.

Shimauchi H, Nemoto E, Ishihata H, Shimomura M, Possible functional scaffold for periodontal regeneration, J Dent Sci Rev, 査読有、49巻、2013年、318-330

DOI:10.1016/j.jdsr.2013.05.001.

Suto M, Nemoto E, Kanaya S, Suzuki R, Tsuchiya M, Shimauchi H, Nanohydroxyapatite increases BMP-2 expression via a p38 MAP kinase dependent pathway in periodontal ligament cells, Arch Oral Biol, 査読有、58巻、2013年、DOI:pii:S0003-9969(13)00072-1.10.1016/j.archoralbio.2013.02.014.

Nemoto E, Ebe Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Nakamura T, Tamura M, Shimauchi H, Wnt5a signaling is a substantial constituent in bone morphogenetic protein-2-mediated osteoblastogenesis, Biochem Biophys Res Commun, 査読有、42巻、2012年、627-632、

DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.05.039.

[学会発表](計 2 件)

村上芳敬, 穴田貴久, 島内英俊, 鈴木治, ラット頭蓋規格化骨欠損の骨再生と血管新生における OCP/Gelatin 複合体埋入の効果、第 13 回日本再生医療学会総会、2014 年 3 月 4-6 日、京都市

Kanaya S, Nemoto E, Sakisaka Y, Shimauchi H, Calcium-mediated increased expression of fibroblast growth factor-2 acts through NF- κ B and PGE2/EP4 receptor signaling pathways in cementoblasts, Innovative Research for Biosis-Abiosis intelligent Interface Symposium, 2014 年 1 月 20-21 日、仙台市

Sakisaka Y, Nemoto E, Tsuchiya M, Nakamura T, Tamura M, Shimonishi M, Shimauchi H, Wnt signaling induces differentiation of dental follicle cells, Innovative Research for Biosis-Abiosis intelligent Interface Symposium, 2014 年 1 月 20-21 日、仙台市

Suzuki R, Nemoto E, Shimauchi H, Cyclic tensile force up-regulates BMP-2 expression through MAP kinase and COX-2/PGE2 expression signaling pathways in human periodontal ligament cells, Innovative Research for Biosis-Abiosis intelligent Interface Symposium, 2014 年 1 月 20-21 日、仙台市

村上芳敬, 穴田貴久, 島内英俊, 鈴木治, OCP ゼラチン複合体の骨再生過程における血管新生の評価、第 62 回日本歯科理工学会秋期学術講演会、2013 年 10 月 21-22 日、新潟市

金谷聡介, 根本英二, 島内英俊, セメント芽細胞において細胞外カルシウム刺激は PGE2/EP4 を介して Fibroblast growth factor-2 の発現を増強する、第 56 回日本歯周病学会春季学術大会、2013 年 5 月 31 日-6 月 1 日、東京都江戸川区

鈴木理紗子, 根本英二, 島内英俊, ヒト歯根膜細胞伸展刺激による骨形成タンパク質-2 (BMP-2) の発現誘導、第 56 回日本歯周病学会春季学術大会、2013 年 5 月 31 日-6 月 1 日、東京都江戸川区

島内英俊, 歯周組織再生-医療としての現状と課題、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (招待講演) 2012 年 11 月 26-27 日、仙台市

須藤瑞樹, 根本英二, 金谷聡介, 島内英俊, ナノハイドロキシアパタイトによる BMP-2 発現誘導、第 55 回日本歯周病学会秋季学術大会、2012 年 5 月 18-19 日、札幌市

Iwama N, Ishihata H, Kawano T, Shimauchi H, Shimomura M, Application of honeycomb patterned porous films as functional scaffold for periodontal regenerative therapy, JSPS/APCPI in Yonsei Univ. joint seminar, 2012 年 3 月 8-10 日、韓国・延世大学

岩間張良, 河野喬仁, 石幡浩志, 下村政嗣, 島内英俊, ハニカム状多孔質膜の歯周組織再生療法への応用、第 33 回日本バイオマテリアル学会、2011 年 11 月 21-22 日、京都市

岩間張良, 石幡浩志, 河野喬仁, 下村政嗣, 島内英俊, ハニカムフィルム上における培養ヒト歯根膜由来細胞の形態とその分化、第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会、2011 年 9 月 24 日、下関市

[図書](計 3 件)

Kawano T, Iwama N, Ishihata H, Shimauchi H, Shimomura M, Springer 社, 「Interface Oral Health Science 2011, Preparation and Biomedical application of self-organized honeycomb-patterned polymer films」, 2012 年、22-26

Iwama N, Kawano T, Ishihata H, Shimauchi H, Shimomura M, Springer 社, 「Interface Oral Health Science 2011, Morphology and differentiation of human periodontal ligament cells on honeycomb films」, 2012 年、232-233

Nemoto E, Tada H, Shimauchi H, Springer 社, 「Interface Oral Health Science 2011, Extracellular phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression in human dental pulp cells and human periodontal ligament cells」, 2012 年、143-144

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島内 英俊 (SHIMAUCHI, HIDETOSHI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：70187425

(2) 研究分担者

石幡 浩志 (ISHIHATA, HIROSHI)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：40261523

根本 英二 (NEMOTO, EIJI)
東北大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：40292221

鈴木 治 (SUZUKI, OSAMU)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：60374948

金谷 聡介 (KANAYA, SOUSUKE)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80375097

(3) 連携研究者

下村 政嗣 (SHIMOMURA, MASATSUGU)
東北大学・多元物質科学研究所・教授
研究者番号：10136525