

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659922

研究課題名（和文） iPS細胞を用いた歯周組織再生型インプラントの開発

研究課題名（英文） Development of the dental implant with a periodontal tissue using stem cells

研究代表者

野口 和行 (NOGUCHI KAZUYUKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90218298

研究成果の概要（和文）：本研究は、エナメルマトリックス蛋白を表面固定したチタン（Ti EMD）上での幹細胞の動態を調べることを目的とした。本研究では iPS 細胞の間葉系幹細胞への分化がうまくいかなかったため、ヒト間葉系幹細胞（hMSC）とヒト歯根膜細胞（hPDL）を用いた。Ti EMD 上で培養することで、hMSC と hPDL いずれも VEGF の産生が亢進した。歯根膜細胞のマーカーである *Periostin* と *PLAP-1* の mRNA 発現解析では、hMSC と hPDL ともに Ti EMD 上で培養することで *Periostin* と *PLAP-1* の発現が亢進した。

研究成果の概要（英文）：Enamel matrix derivative (EMD) plays an important role in periodontal tissue regeneration by inducing angiogenesis. The present study was aimed to evaluate the kinetics of human mesenchymal stem cells (hMSC) or human periodontal ligament fibroblasts (hPDLs) on the titanium surface with biochemical treatment, namely, with or without EMD immobilization. EMD could be easily immobilized by tresyl chloride-activation technique. In the both hMSCs and hPDLs, the production of VEGF was significantly increased on titanium surface with EMD immobilization than other control groups. Furthermore, the mRNA levels of *Periostin* and *PLAL-1*, which were the markers of a periodontal ligament, were up-regulated in both hMSCs and hPDLs on titanium surface with EMD immobilization than other control groups. Further refinement of this approach will facilitate the development of clinically relevant methods for PDL regeneration on titanium implants in humans.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯周組織、エナメルマトリックスタンパク、幹細胞、インプラント

1. 研究開始当初の背景

現在臨床で用いられているインプラントの骨との結合は、1985年に Brånemark らによって提唱された「オッセオインテグレーション」によるものである。その獲得にはインプラント体の表面性状が大きく影響するが、オッセオインテグレーション促進に向けた表面性状の研究は多角的に行われており、

我々もまた、様々な表面処理を施したチタンやジルコニア上での骨芽細胞の動態について報告してきた。近年、オッセオインテグレーションの早期獲得を目指し、周囲の骨芽細胞を活性化する因子をインプラント体表面に応用する生物学的アプローチが取られ始めた（*Curr Pharm Des.* 2008;14(22)2201-11）。また、Marei らは、

抜歯窩にインプラントを即時埋入する際、未分化な間葉系幹細胞を同時に移植することでインプラント体周囲にセメント質、歯根膜、骨の歯周組織が再生したことを報告している (*J Oral Implantol.* 2009; 35(3):106-29)。また、Hayakawaらはチタン表面にタンパク質を表面固定する方法 (トレシルクロリド法) を確立した (*J Biomed Mater Res.* 2003; 67A: 684-688)。

2. 研究の目的

本研究は、インプラント周囲に歯根の発生過程を忠実に再現させるためにエナメルマトリックス蛋白を固定して歯周組織獲得をインプラント周囲にも求め、幹細胞を用いた「歯周組織再生型インプラント」開発の基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

1) トレシルクロリドによるチタンのトレシル化とエナメルマトリックスタンパクの固定化

チタンのトレシル化はHayakawaらの方法 (トレシルクロリド法、*J Biomed Mater Res.* 2003; 67A: 684-688) に準じて行った。すなわち、チタンディスクの表面をトレシルクロリドで覆い、37°Cにて48時間放置した。次にアセトン、アセトン：水=50：50の溶液、水でチタン表面を洗浄した。乾燥させた後、3mg/mlのエナメルマトリックスタンパクで覆い、37°Cにて24時間反応させた。その後、PBSで3回洗浄し実験に用いた。

2) 細胞培養

ヒト歯肉線維芽細胞 (hGF)：歯肉組織は、保存不可と診断された歯もしくは歯周外科を必要と診断された歯の辺縁部歯肉を抜歯/歯周外科時に局所麻酔下で、No.15の替刃メスにて1mm x 3mm程度採取した。採取した歯肉組織片は、抗生物質溶液 (100 mg/ml penicillin G, 100 U/ml Streptomycin) で5回漱いだ後、6well ディッシュに貼りつけ、10% FBS含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を培養液として初代培養した。実験には継代数3代~5代の培養細胞を用いた。

ヒト歯根膜細胞 (hPDL)：智歯の抜歯の後、Somerman, M. J.らの方法に従って行った。すなわち、歯根の中央1/3の部分に付着している健全な歯根膜組織を、メスにて掻き取り、得られた組織を、抗生物質 (100 mg/ml penicillin G, 100 U/ml Streptomycin) を含むリン酸緩衝液にて5回漱いだ後、組織の小片を6well ディッシュに貼りつけ、10% FBS含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を培養液として初代培養した。実験には継代数3代~5代の培養細胞を用いた。

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC)：LONZAより購入し、データシートに従い間葉系幹細胞増殖培地にて培養した。

ヒト歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞：当研究室で樹立した iPS 細胞を用いた。すなわち上記 hGF (継代数 1~3 代) に 5 つの遺伝子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *LIN28* 及び *NAVOG*) をレトロネクチン法にて導入することで iPS 細胞を作製した。樹立した iPS 細胞についてはその多分化能を確認済み。iPS 細胞の間葉系幹細胞様細胞への分化は Mahmood1 らの方法 (*Journal of Bone and Mineral Research* Vol. 25 No. 6, 2010, 1216-1233) に準じた。

3) 細胞生存率の測定

エナメルマトリックス蛋白を表面固定したチタンディスク上での細胞生存率は、LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (invitrogen) を用いて、Tali® Image-Based Cytometer にて測定した。

4) VEGF 測定

各種細胞は、24well plate (チタンディスク有/無) に 1.5×10^4 cells/well (8×10^3 cells/cm²) の濃度で播種した。播種してから24時間後と48時間後に培養上清を回収し、ELISA法にてVEGFの濃度を測定した。

5) *Periostin* と *PLAP-1* の mRNA 発現

4) の細胞数を計測した後に、その細胞より SideStep II Cell Lysis Analysis Kit (Agilent Technologies) を用いて RNA を回収した。DNase 処理後に SideStep II QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies) を用いて cDNA を合成し、Real-Time PCR 法にて *Periostin* と *PLAP-1* の mRNA 発現を解析した。使用したプライマーは次の通りである。
: *Periostin* forward: 5' - GATGGAGTGCCTGTGGAAAT-3' ; *Periostin* reverse: 5' - AACCTCCTCACGGGTGTGTC-3' ;
PLAP-1 forward: 5' -TCGAAAATGGGAGTCTTGCT-3' ; *PLAP-1* reverse: 5' - CTTTGGCACTGTTGGACAGA-3' ;
GAPDH forward: 5' -GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3; *GAPDH* reverse: 5' -GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'

4. 研究成果

● iPS 細胞の間葉系幹細胞様細胞への分化

Mahmood1 らの方法 (*Journal of Bone and Mineral Research* Vol. 25 No. 6, 2010, 1216-1233) に準じて、iPS 細胞の間葉系幹細胞様細胞への分化を試みた。

まず、分化させた細胞を骨分化培地で培養した。図1に示すように、骨分化の指標の一つである *Cbfa1* の遺伝子発現を確認すること

ができた。

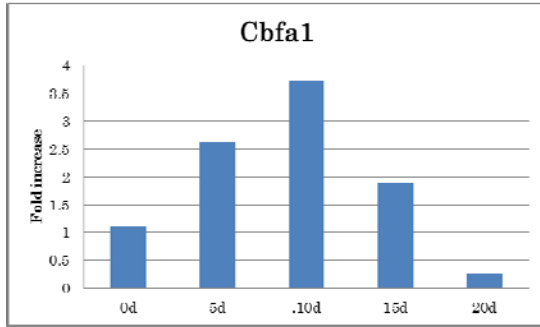


図1 iPS 細胞の間葉系幹細胞様細胞への分化を試み、その細胞を骨分化培地で培養したときの Cbfa1 発現

しかしながら、アルカリフォスファターゼ染色陰性であり、また石灰化を Alizarin Red 染色にて評価したが、石灰化物の沈着を認めることはできなかった。

次に、脂肪分化培地にて脂肪細胞への分化を試み Oil RedO 染色をした。その結果、わずかに染色されるものの、顕著に染色されることはなかった。

以上のことから、本研究においては iPS 細胞の間葉系幹細胞様細胞への分化は成功しなかった。

そこで、以後の実験ではヒト間葉系幹細胞 (hMSC)、ヒト歯根膜細胞 (hPDL)、ヒト歯肉線維芽細胞 (hGF) を使用することとした。

●hMSC のエナメルマトリックス蛋白を表面固定したチタンディスク上での細胞生存率

エナメルマトリックス蛋白を表面固定したチタンディスク上での hMSC の細胞生存率を細胞播種 24 時間後と 48 時間後で測定したところ、コントロール群 (通常培養) と比較しても差は認められなかった。また、死細胞はほとんど認められなかったことから、エナメルマトリックス蛋白を表面固定したチタン上での細胞毒性はないと考えられた。

●エナメルマトリックス蛋白を表面固定したチタンディスク上での各種細胞の VEGF 産生

まず、hGF についてエナメルマトリックス蛋白を表面固定したチタンディスク上での VEGF 産生を検討した。図2に示すように、未処理のチタンディスク (TiCont) とトレシル化したチタンディスク (TreTiCont) はコントロール (Cont、通常培養) と比較して、VEGF 産生に影響を及ぼさないことが確認された。また、エナメルマトリックス蛋白を表面固定したチタンディスク上 (TreTiEMD) での hGF の VEGF 産生はコントロール群と比較して有意に亢進しており、その産生亢進は通常のエナ

メルマトリックスタンパク刺激 (cont EMD) と同様の結果であった。

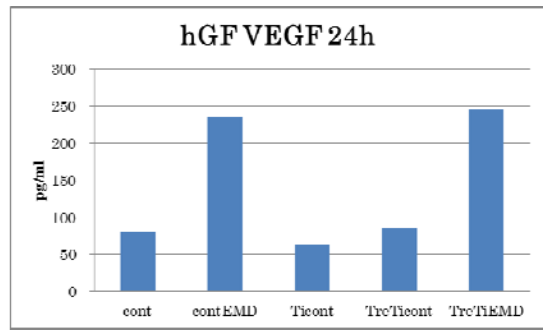


図2 hGF のエナメルマトリックス蛋白を表面固定したチタンディスク上での VEGF 産生

cont:プラスチックディッシュ上での通常培養、cont EMD:通常培養でのエナメルマトリックス蛋白刺激、TiCont:未処理のチタンディスク、TreTiCont:トレシル化したチタンディスク、TreTiEMD:トレシル化したチタンディスクにエナメルマトリックス蛋白を表面固定

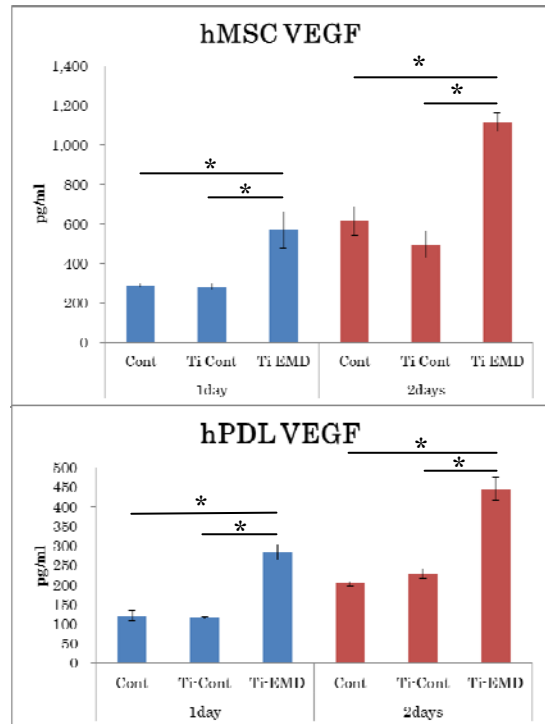


図3 hMSC と hPDL のエナメルマトリックス蛋白を表面固定したチタンディスク上での VEGF 産生

Cont:プラスチックディッシュ上での通常培養、TiCont:未処理のチタンディスク、TiEMD:トレシル化したチタンディスクにエナメルマトリックス蛋白を表面固定 $p < 0.05$

次に、hGF の知見を基にして hMSC と hPDL についてもその VEGF 産生を検討した。図3に示すように、hMSC と hPDL いずれにおいても1日後と2日後で、コントロール群 (Cont)

と未処理のチタンディスク群 (Ti Cont) では VEGF 産生に差は無かった。一方、エナメルマトリックス蛋白を表面固定したチタンディスク群 (Ti EMD) では、コントロール群 (Cont と Ti Cont) に比べて有意に VEGF の産生が亢進した。また、細胞数を調べた結果、1 日後では、いずれの細胞もエナメルマトリックス蛋白を表面固定したチタンディスク群 (Ti EMD) では、コントロール群 (Cont と Ti Cont) に比べて有意に増加していたが、2 日後では各群間に差は無かった。このことから、VEGF 産生亢進は細胞数によるものではなく、エナメルマトリックス蛋白の影響であると考えられた。

● *Periostin* と *PLAP-1* の mRNA 発現

歯根膜細胞のマーカーとされている *Periostin* と *PLAP-1* の mRNA 発現を Real-Time PCR 法にて解析した。図 4 に示すように、hMSC においては Ti EMD 群で 2 日後に *Periostin* と *PLAP-1* の発現が亢進していた。一方、hPDL においては、*Periostin* が Ti EMD 群で 1 日後、2 日後ともに発現亢進が認められた。*PLAP-1* については、Ti EMD 群で 2 日後に発現亢進が認められた。

以上のことをまとめると、Ti EMD 群では hMSC と hPDL いずれにおいてもコントロール群と比較して有意に VEGF の発現を亢進した。このことは、チタンディスク表面に固定されたエナメルマトリックス蛋白が機能していることを示している。VEGF は血管新生を促進することが知られているが、血管が新生することにより、骨髄由来の間葉系幹細胞が動員され、組織再生において非常に重要な役割を果たしている。歯根膜細胞のマーカーである *Periostin* と *PLAP-1* の mRNA 発現解析では、hMSC と hPDL ともに Ti EMD 上で培養することで *Periostin* と *PLAP-1* の発現が亢進した。したがって、in vitro の系における本研究結果から、Ti EMD は幹細胞を用いた「歯周組織再生型インプラント」開発の基盤となることが期待される。

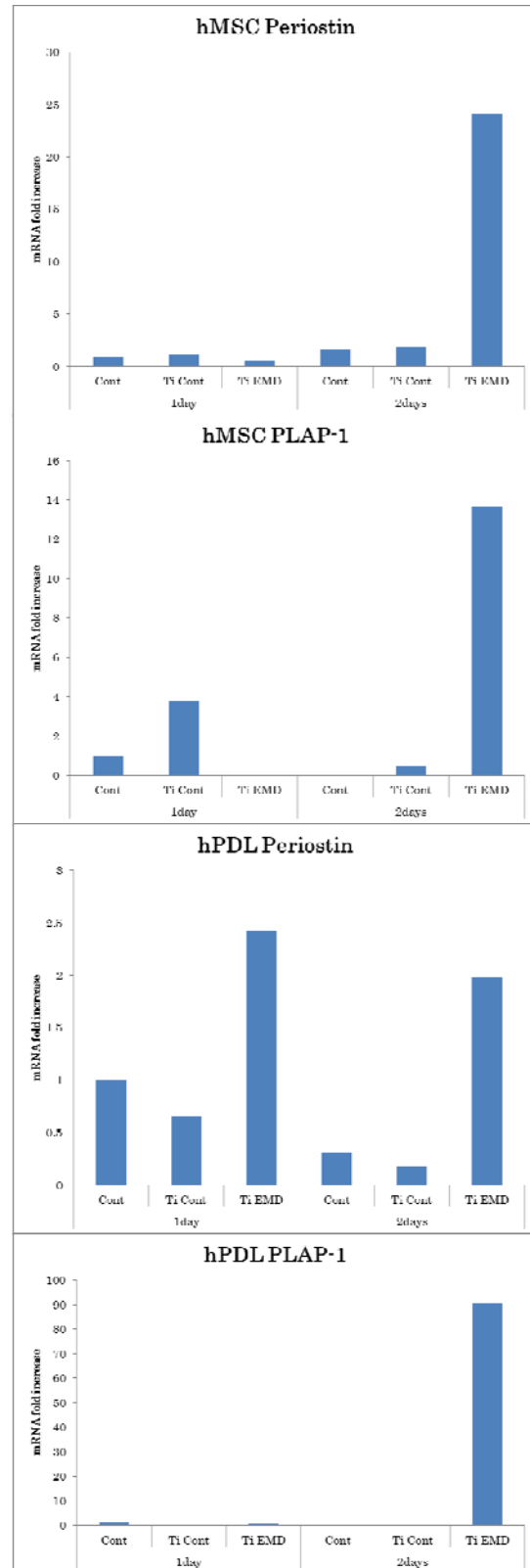


図 4 hMSC と hPDL の *Periostin* と *PLAP-1* の mRNA 発現

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1件)

Kenji Sakoda, Yumiko Nakajima, Kazuyuki Noguchi Enamel matrix derivative induces production of vascular endothelial cell growth factor in human gingival fibroblasts Eur J Oral Sci 2012; 120: 513-519 査読有り

[学会発表] (計1件)

Sakoda K, Nakajima Y, Noguchi K. Enamel matrix derivative induces VEGF production in human gingival fibroblasts The 60th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Niigata December 14(Fri), 15(Sat), 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 和行 (NOGUCHI KAZUYUKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90218298

(2) 研究分担者

迫田 賢二 (SAKODA KENJI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70419654