

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592976

研究課題名(和文) ヒト間葉系幹細胞を用いた効率的な歯槽骨再生療法の開発

研究課題名(英文) Cocktails of certain growth factors that induce differentiation of periodontal ligament cells

研究代表者

隈部 俊二 (KUMABE, SHUNJI)

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：30288774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜由来細胞を用い、成長因子カクテルによる骨形成細胞誘導法を検討した。BMP-2、FGF-2、IGF-1、インシュリンのうち数種類のカクテルを培地に添加し、歯根膜細胞を培養した。培養後21日までの細胞数の測定およびALPase染色、さらに転写因子の発現を免疫組織化学的染色によって検索し、分化誘導能を検討した。その結果、IGF-1、インシュリン、BMP-2、デキサメタゾンカクテル培地を用いると、分化誘導開始後7日以後から顕著にRunx2およびOsterix免疫陽性細胞が認められた。骨形成細胞誘導にはBMP-2、デキサメタゾン、IGF-1、インシュリンの組み合わせが有効であることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：To establish a model in vitro that demonstrates the differentiation of periodontal ligament (PDL) mesenchymal cells into osteoblast(OB)-like cells, to regenerate alveolar bone for the implant dentistry. We isolated mesenchymal cells from the PDL. The cells were maintained in the medium by adding different combinations of growth factors and hormones for 7, 14, 17 or 21 days. Growth factors and hormones of 100ng/ml BMP-2, 100nM dexamethasone (DEX), 100ng/ml IGF-1, 50ng/ml bFGF and 5µg/ml insulin were used. We examined the existence of anti-Runx2 and anti-Osterix immunoreactive cells in the cultures through the process of immunohistochemistry. In this instance, we used the media that contained the BMP-2, DEX, IGF-1 and insulin, the cells were induced to differentiate into OB-like cells after the day 17th. The result suggests that a cocktail of BMP-2, DEX, IGF-1 and insulin significantly induced the PDL mesenchymal cells to differentiate into osteogenic OB-like cells.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：間葉系幹細胞 成長因子 歯槽骨 再生

## 1. 研究開始当初の背景

我が国は現在世界一の長寿国である。平均寿命の上昇に伴い生活の質 (QOL) の向上が盛んに唱えられ、特に歯科領域においては「噛んで食べる」ことに対する重要性が近年ますます強調されている。咀嚼による唾液分泌の促進や脳細胞の活性化 (Funakoshi et al., 1989)、大脳皮質の覚醒作用 (Rogar et al., 1956, Shinagawa et al., 2004、長谷川ら, 2005) も報告され、咀嚼は生命維持に欠かせない機能であることがいえる。

一方 2005 年の厚生労働省歯科疾患実態調査によると、75 歳以上の半数以上が残存歯数 9 本以下であり、「噛んで食べる」ことによる QOL ならびに日常生活動作 (ADL) の向上を図るには補綴治療が不可欠であることが明らかになった。補綴治療において近年盛んに行われているのが口腔インプラント治療である。インプラント体と骨との付着が成功すれば天然歯に近い形で咀嚼することが可能で、QOL ならびに ADL の向上に繋がる。

インプラント治療の成功のカギを握るのは骨芽細胞のインプラント体への初期付着であり、インプラント体を埋入してからできるだけ早期に、安全に行われることが求められる。

しかし生体に含まれる幹細胞は少量であり、さらに既存の誘導法では全ての幹細胞を骨芽細胞へ分化させることは不可能であるため、より効率的な分化誘導法の開発および臨床への応用が求められている。

今回我々は生体外で安全かつ早期に、大量に、しかも効率よく幹細胞を骨芽細胞へ分化させ、それらを生体に戻すことによって可能な限り早期に骨芽細胞がインプラント体に付着して骨形成を開始することを目指し、多種類の growth factor の組み合わせによる効率的な骨芽細胞誘導実験を行った。

## 2. 研究の目的

間葉系細胞から骨芽細胞への効率的な誘導法を確立することは、歯槽骨再生ならびにインプラント療法の開発に最も求められることの一つである。しかし生体に含まれる幹細胞は少量で、既存の誘導法では全ての幹細胞を骨芽細胞へ分化させることは不可能である。このため、より効率的な分化誘導法の開発および臨床への応用が求められている。

現在、医学領域で臨床応用が行われている成長因子 (growth factor) は 12 種類存在する。そこで本研究では、この成長因子を用い、最も効率的に骨芽細胞を誘導する組み合わせを検索することを目的とする。

### (1) 骨芽細胞分化を効率的に誘導する growth factor カクテルの検索

骨芽細胞分化を効率的に誘導する Growth factor の候補は、ヒトリコンビナント BMP-2、insulin、insulin-like growth factor-1、testosterone、parathyroid hormone、interleukin-1 receptor

antagonist、growth hormone、17 $\beta$ -estradiol、triiodothyronine、1 $\alpha$ -25-dihydroxy vitamin D3、FGF-2、dexamethasone で、過去の研究論文で至適とされる濃度を用いる。これらは、現在医学領域で臨床応用が行われている因子である。

### (2) 最適な growth factor カクテルの骨芽細胞誘導能至適濃度の検討

初代もしくは継代 1 回の細胞のみを使用した。骨芽細胞誘導能の評価は、培養 7、10、14、17、21 日後の細胞数 (細胞増殖) と ALP 活性 (骨芽細胞分化) で検討し、高値を示した組み合わせを growth factor カクテルの候補とする。

## 3. 研究の方法

当初ヒト抜去歯から歯根膜を採取し、歯根膜由来細胞の初代培養を行った後に、成長因子カクテルを用いて分化誘導実験を実施する予定であった。

実験にはヒト抜去歯が大量に必要であるが、ヒト細胞資源は有限で、短時間に多くの抜去歯を入手することは難しい。また年齢や性別も揃えられず、細胞の条件を一定にしづらいため、非効率である。

一方、一部の成長因子カクテルに関しては、実験開始までに我々は実験などで使用することがなく、本実験において初めて使用することになった。このため、実験を効率よく進めていくためにも、成長因子について事前に予備実験を行い、確認しておく必要が生じた。

そのため、まず予備実験として年齢および性別の条件を一定にしたラット歯根膜由来細胞を用い、各種成長因子カクテルを添加して分化誘導の可否を検討することとした。

我々は本実験を以下に大別して行った。

### (1) 培養法の確立

Wistar ラット (雄性、5 週齢) の歯根膜から細胞を採取し、培養法を確立した。細胞は継代を繰り返すと分化してしまうため、初代もしくは継代 1 回の細胞のみを使用した。

培地には 10% FBS、2mM L-Glutamine、1x の抗菌薬を予め添加して基礎培地とし、対照群はこの組み合わせを用いて培養を行った。実験群はこの培地に成長因子を添加して実験に用いた。

### (2) growth factor 検索と骨芽細胞誘導能の評価

本研究開始当初は、骨芽細胞を効率的に誘導するため fractional factorial design (一部実施法) を用いて検討する予定であった。しかし、成長因子受容体の有無を確認した方がさらに効率よく実験を進めることができることから、今回は RT-PCR 法を用い、骨芽細胞に存在する成長因子受容体の mRNA の発現を確認した。

### (3) growth factor の至適濃度検討

(2) で発現が確認された成長因子受容体の mRNA 量から、特に高値を示した成長因子について検討を行った。参考文献等で候補を絞り込んだ成長因子の濃度について検討し、その濃度と等量、倍量、3 倍量、5 倍量、0.5 倍量、0.2 倍量、0.1 倍量の成長因子を用いて分化実験を行った。

### (4) 骨芽細胞に誘導した細胞の骨芽細胞分化マーカーの発現検討

今回我々は、間葉系幹細胞より骨芽細胞への分化に必須である Runx2、また Runx2 の下流で発現し、前骨芽細胞から未熟な骨芽細胞の分化にかかわっている Osterix の 2 つの転写因子の発現について検討を行い、分化の程度を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) growth factor 検索と骨芽細胞誘導能の評価

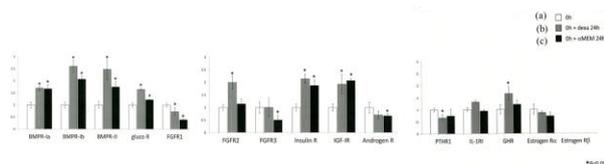


図 1：各成長因子受容体 mRNA の発現検討

間葉系幹細胞を 24 時間まで培養した際、BMP-2、bFGF、insulin および IGF-1 の 4 種類の成長因子受容体の mRNA の発現量が多かった (図 1)。そこで、BMP-2、bFGF、insulin および IGF-1 に dexamethasone を加え、実験を実施することにした。

### (2) growth factor の至適濃度検討

BMP-2 ならびに dexamethasone 単独で培養したときより、BMP-2 100 $\mu$ M および dexamethasone 100nM を組み合わせて培養した方が、ALP およびアリザリンレッド S による顕著な染色像が得られた。また顕著な染色像は培養開始後 14 日目以降に観察された。

BMP-2 300 $\mu$ M 以上および dexamethasone 300nM 以上の組み合わせでは分化誘導後 7 日以内に死滅した。一方、BMP-2 の 0.5 倍量、0.2 倍量、0.1 倍量を培地に添加した実験では、実験期間終了時点まで細胞の観察が可能であった。しかし、0.2 倍量以下では、実験期間中に著しい分化の兆候は認められなかった。

等量添加および倍量添加の場合は、分化に顕著な差は認められなかった。また、BMP-2 無添加培地では、実験期間中に分化に至ることがなかった。従って、効率の問題や生体への影響を鑑み、BMP-2 100 $\mu$ M および dexamethasone 100nM を培地へ添加して用いた。

成長因子は insulin 5 $\mu$ g/ml、insulin-like growth factor-I (IGF-1) 100 ng/ml、basic

fibroblast growth factor (bFGF) 50ng/ml の 3 種類を用い、以下のような群を形成して、群間比較を行った。

- ① Control group
- ② BMP-2、dexamethasone、insulin group
- ③ BMP-2、dexamethasone、IGF-1group
- ④ BMP-2、dexamethasone、insulin、IGF-1group
- ⑤ BMP-2、dexamethasone、IGF-1、bFGF group

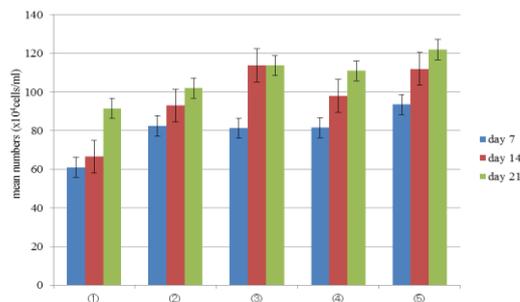


図 2：各実験群の細胞増殖検討

位相差顕微鏡を用いて観察を行うと、全ての群において経時的に細胞が増加していた (図 2)。グループ④ (BDII)では、培養開始後 7 日において石灰化塊が出現し、17 日において顕著に認められた。一方、グループ⑤ (BDIF)では、培養開始後 21 日でも石灰化塊の出現が認められなかった。従って、グループ①、②、③、④において分化誘導実験を行い、(3) 骨芽細胞に誘導した細胞の骨芽細胞分化マーカーの発現について検討を行った。

### (3) 骨芽細胞に誘導した細胞の骨芽細胞分化マーカーの発現検討

今回我々は、間葉系幹細胞より骨芽細胞への分化に必須である Runx2、また Runx2 の下流で発現し、前骨芽細胞から未熟な骨芽細胞の分化にかかわっている Osterix の 2 つの転写因子の発現について検討を行い、分化の程度を確認した。

その結果、Runx2 については、分化誘導後 17 日においてグループ④ (BDII)において Runx2 免疫陽性の細胞塊が散見された。しかし、グループ① (control) では、Runx2 免疫陽性の細胞塊はほぼ確認できなかった。

一方、Osterix については、分化誘導後 17 日においてグループ④ (BDII)において Osterix 免疫陽性の細胞塊が散見された。

しかし、グループ① (control) およびグループ② (BDInsulin) では、Osterix 免疫陽性の細胞塊はほぼ確認できなかった。

以上 (1) から (3) より、以下のことが示唆される。

①歯根膜由来細胞は、分化誘導開始後約 2 週間から 3 週間で骨芽細胞への分化成熟を迎える。

②歯根膜由来細胞の骨芽細胞への効率的な分化誘導を行う場合、BMP-2、dexamethasoneカクテル、またこのカクテルにIGF-1ならびにinsulinを加えた4種の成長因子のカクテルが有効であることが示唆される。

③歯根膜由来細胞の骨芽細胞への分化誘導を行う場合、BMP-2、dexamethasone、IGF-1ならびにインシュリンは骨形成細胞の分化誘導に促進的に働く。一方でFGF-2は細胞増殖に促進的に働くことから、目的に合わせて添加する成長因子の組み合わせを検討する必要があることが示唆される。

## 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2件)

①MORISHITA A, KUMABE S, NAKATSUKA M、IWAI Y、A histological study of mineralised tissue formation around implants with 3D culture of HMS0014 cells in Cellmatrix Type I-A collagen gel scaffold in vitro、Okajimas Folia Anatomica Japonica、査読有、Vol.91、No.3、2014、pp.57-71、[https://www.jstage.jst.go.jp/article/ofaj/91/3/91\\_57/pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/ofaj/91/3/91_57/pdf)

②NAKATSUKA M、UENO K、KUMABE S、IWAI Y、The Fate and Contribution of HMS0014 cells cultured on Cellmatrix® Type I-A scaffold、Journal of Electron Microscopy Technology for Medicine and Biology 査読有、Vol.28、No.1、2014、pp.31-40

[学会発表] (計2件)

①中塚美智子、隈部俊二、細矢明宏、上田甲寅、松田哲史、岩井康智、歯根膜由来細胞の分化誘導に有用な成長因子の検討、第69回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2015.5.14、大阪国際会議場 (大阪市)

②KUMABE S、NAKATSUKA M、HOSOYA A、MATSUDA Y、UEDA K、IWAI Y、Cocktails of certain growth factors that induce differentiation of periodontal ligament cells、第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会合同大会、2015.3.24、神戸国際会議場 (神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

隈部 俊二 (KUMABE, Shunji)  
大阪歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：30288774

### (2) 研究分担者

中塚 美智子 (NAKATSUKA, Michiko)  
大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70368158

乾 千珠子 (山本 千珠子)

(INUI-YAMAMOTO, Chizuko)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・助教

研究者番号：00419459