

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593122

研究課題名(和文)形態付与可能な再生3要素複合体ビーズの重度破壊歯周組織再生における有用性

研究課題名(英文) Usefulness of the complex consisting of three regenerative factors, which can be processed and shaped in vitro for regeneration of severely destructed periodontal tissues

研究代表者

柴 秀樹 (SHIBA, Hideki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授

研究者番号：60260668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：人工的に作製された担体を含まず、骨髄間葉系幹細胞(MSC)が産生した細胞外基質を含み、さらに、ex vivoで加工できる球状複合体(ball-shaped MSC complex, B-MS C)を開発した。さらに、骨分化誘導したB-MS Cおよび血管内皮細胞増殖因子の発現促進能を有するLL37は、ラット頭蓋骨骨欠損の再生を促進することから、これらは、歯周組織(骨)再生治療剤になりうるということが判明した。

研究成果の概要(英文)：We developed the ball-shaped mesenchymal stem cell complex (B-MS C) which contains bone marrow-derived MSC, self-produced extracellular matrices and no artificial scaffold, and which can be processed in vitro. Furthermore, the osteogenic-differentiated B-MS C and the synthesized LL37 which increases the production of vascular endothelial growth factor enhanced bone regeneration in the rat calvarial defect model. Therefore, the transplantation of B-MS C and LL37 may represent a novel tissue engineering therapy for regeneration of periodontal tissues (bone).

研究分野：歯周療法学

キーワード：歯周療法学 歯周組織再生 幹細胞 細胞外基質 LL37 再生3要素

### 1. 研究開始当初の背景

再生3要素は、細胞、足場および調節因子である。成果報告者は、三要素のうち、細胞(骨髄間葉系幹細胞:MSC)と調節因子(脳由来神経栄養因子 BDNF)の歯周組織再生における有用性を示してきた。さらに、報告者は再生療法における抗菌ペプチド LL37 の有用性について基礎的研究を行い、LL37 がヒト歯髄細胞のマイグレーションを促進することを示した。

これまでの移植法の欠点は、移植された細胞の機能発現の制御が積極的に行われていないことである。重度に破壊された歯周組織を再生させるために MSC 移植治療を行う場合、足場と調節因子、すなわち、MSC 周囲の環境因子が効果的に MSC の機能発現を促進することのできるような再生3要素複合体を作製する必要がある。MSC 移植による歯周組織再生では、MSC の分化によるセメント質・歯槽骨および歯周靭帯の再生が必要であることから、MSC の分化を直接促進する MSC 周囲の環境の整備とともに、MSC の生存を支えるための血管新生も不可欠である。歯周組織再生療法の適応を広げ、重度に破壊された歯周組織を再生させるためには、MSC の分化促進とともに、細胞の栄養の供給源として、血管新生を誘導する必要がある。抗菌ペプチドである LL37 は細胞機能誘導能に加えて、血管新生作用を有する。しかしながら、MSC の機能発現における LL37 の影響および LL37 による血管新生メカニズムの詳細は不明である。

MSC の足場として MSC が産生した ECM および調節因子として血管新生能を有する抗菌ペプチド LL37 が効果的に MSC の細胞分化を支える環境因子として機能すると推察した。

### 2. 研究の目的

本研究では、形態付与可能な再生3要素複合体(複合体ビーズ)の重度破壊歯周組織の再生法確立の基礎的研究として、MSC が産生した細胞外基質(ECM)で小型球状に加工した MSC 集塊(ball-shaped MSC complex(B-MSC))と LL37 のラット頭蓋骨欠損の再生における有用性を検討した。

### 3. 研究の方法

(1)B-MSC のラット頭蓋骨欠損の再生における有用性

MSC はラット大腿骨髄から分離し、10% 牛胎児血清を含む Dulbecco 's modified eagle medium (DMEM)を用いて培養し、3代継代培養した細胞を実験に用いた。24-well plate に  $7 \times 10^4$  cells/well の密度の MSC を播種し、アスコルビン酸 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 添加培地で7日間培養した。MSC は豊富な ECM を産生しシート状になっていた。シート状の MSC と ECM を折りたたむことによって直径約 1mm の小型球状にした MSC 集塊を B-MSC とした(図1)。

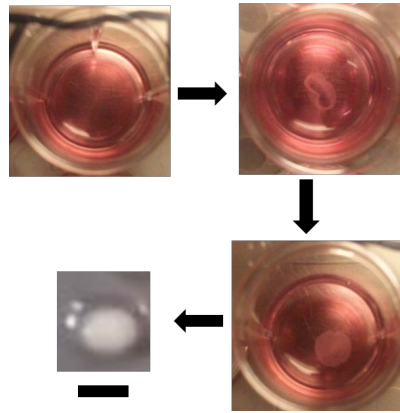


図1 作製された B-MSC  
バ - 長さは 1 mm

引き続き、作製した B-MSC を増殖培地のみ(GM)あるいは骨分化誘導培地(OIM)で5あるいは10日間培養した。

B-MSC による骨再生能を評価するために、ラット頭蓋骨に作製した直径 1.6 mm および 3 mm の骨欠損に B-MSC を移植した(図2)。移植後 14 日後、28 日後で組織切片を作成し HE 染色した。さらに、マイクロ CT 解析によって骨欠損部を観察した。

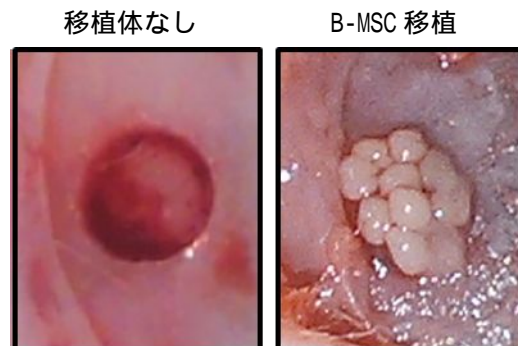


図2 ラット頭蓋骨欠損の形態に合うよう骨欠損部位に移植された複数の B-MSC  
欠損の直径は 3 mm

(2)LL37 によるヒト歯周靭帯細胞の VEGF 発現メカニズム

細胞培養: ヒト歯周靭帯細胞は三光純薬から購入した。10%FBS を添加した DMEM にて培養し、継代数 9 代のヒト歯周靭帯細胞を実験に供した。

VEGF 発現メカニズム解析: コンフルエントなヒト歯周靭帯細胞に LL37 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を無血清下で作用させた。ウェスタンブロット分析によって、リン酸化 ERK1/2 と NF-kappa B p65 発現量における LL37 の影響を調べた。

(3)LL37 によるラット頭蓋骨欠損の再生メカニズム

ラット頭蓋骨に作製した骨欠損に PBS+アテロコラーゲン(コントロール群)あるいは 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の LL37 + アテロコラーゲン(LL37

群)の複合体を移植した。移植8週後、灌流固定を行い、組織標本作製した。STRO-1 (MSCの陽性マーカー)および血管内皮細胞のマーカーであるCD34発現を免疫組織学的に調べた。

#### 4. 研究成果

(1)B-MSCのラット頭蓋骨骨欠損の再生における有用性

B-MSCとしての培養期間中に、B-MSC内部の細胞の生存が確認されたことから、B-MSCという形態での細胞培養が可能であることが示された。

骨分化誘導前のB-MSC内の細胞はSTRO-1陽性かつCD73陽性および骨分化能と脂肪分化能を有しMSCとしての性質を維持していた。

MSCが産生したECMの主体は、免疫蛍光染色によって、I型コラーゲンであることがわかった。

GM(骨分化誘導なし)およびOIM(骨分化誘導あり)で培養したB-MSCの性状を比較した。OIMで培養したB-MSCの骨関連タンパク質発現量(オステオポンチン、ALP)と石灰化量は経時的に増加し、さらにGMと比較して多かった。しかしながら、10日間OIMで培養したB-MSC中のアポトーシス細胞数は、5日間GMあるいはOIMで培養したB-MSCと比較して著しく増加した。

5日間骨分化誘導されたB-MSC一つをラット頭蓋骨に作製した直径1.6mmの骨欠損に移植したところ、B-MSCは、コントロール(MSCとコラーゲンスポンジ複合体)と比較して、術後4週の欠損部に多くの再生骨が観察された。

5日間骨分化誘導されたB-MSCによる大規模骨欠損骨再生を評価するために、ラット頭蓋骨に作製した直径3mmの骨欠損に合うよう複数個のB-MSCを移植し、欠損部の骨再生を組織学的に評価した。OIM群の骨再生量はGM群と比べて多かった(図3)。GM群では、既存骨からのみ骨の再生が認められたが、OIM群では、既存骨からの骨再生に加えて、骨欠損内部からも骨が再生していた(図3)。OIM群の欠損内部の再生骨は層板状で、内部に細胞が封入されていた。さらに、この再生に早期の血管新生が関わることを示した。

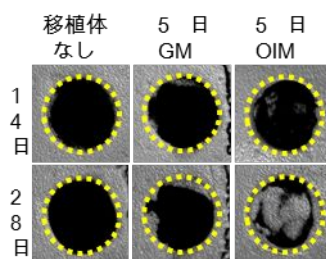


図3 ラット頭蓋骨骨欠損の再生におけるB-MSCの影響

ラット頭蓋骨に作製した直径3mmの骨欠損に合うよう複数個のB-MSCを移植した。

術後14日と28日後のマイクロCT像

移植したB-MSCは術後28日後、骨欠損内部に残存してなかったことから、早期に代謝・分解されたと推察する。B-MSCはMSCとMSC自身が産生するECMという細胞を支える人工の担体を含み、自己由来のものだけで構成されているため、生体適合性と生分解性に優れていると考える。

本研究の結果から、MSC移植によって目的の組織を再生させるためには、MSCが機能を発揮できるようMSC周囲の環境を整備し、さらにMSCの分化をex vivoで制御することの有用性が強く示唆された。

このように、人工的に作製された担体を含まず、MSCが産生した細胞外基質を含み、さらに、ex vivoで加工できるB-MSC移植体を開発した。ex vivoで骨分化誘導したB-MSCは、骨再生を目的とした治療に有用であることを示した。また、本研究では、B-MSCを骨分化誘導したが、筋細胞など他の細胞に分化させ移植することによって、他の分野での再生医療に応用できる可能性もある。

(2)LL37によるヒト歯周靭帯細胞のVEGF発現メカニズム

LL37(合成ペプチド)が培養ヒト歯周靭帯細胞の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)発現に及ぼす影響とその発現メカニズムを明らかにしようとした。これまでに、LL37はVEGF-Aの発現をmRNAおよびタンパク質レベルで促進すること、LL37は、VEGF-Bの発現には影響を及ぼさないこと、および、細胞内シグナル因子であるERKとNF-kappa Bのインヒビターは、LL37によって誘導されたVEGF-A発現の促進を抑制することを明らかにしてきた。本研究においては、ウェスタンブロット分析からLL37はリン酸化ERK1/2とNF-kappa B p65発現量を増加させた(図4)。以上のことから、LL37(合成ペプチド)によって誘導されるVEGF-Aの発現促進にERK1/2とNF-kappa Bが関わることを確定させた。

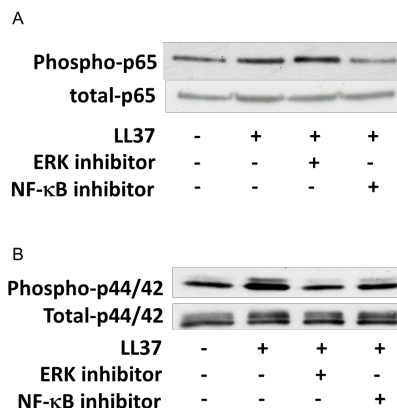


図4 リン酸化 NF-kappa B p65 と ERK1/2 発現量における LL37 の影響  
ウェスタンブロット分析  
A. NF-kappa B p65  
B. ERK1/2

(3) LL37 によるラット頭蓋骨骨欠損の再生メカニズム

LL37 がラット頭蓋骨骨欠損の再生促進を促進することを明らかにしてきた。本研究では、LL37 による骨再生メカニズムを調べた。その結果、LL37 による骨再生促進に、LL37 による多くの STRO-1 (MSC の陽性マーカー) 陽性の細胞および血管内皮細胞のマーカーである CD34 細胞の集積が関わることを明らかにした (図5)。

また、LL37 は培養 MSC の石灰化 (アリザリン染色) には影響を及ぼさなかったが、MSC の増殖を促進した。

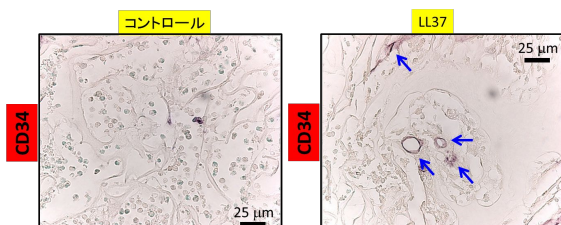


図5 ラット頭蓋骨骨欠損の再生における LL37 の影響  
血管内皮細胞のマーカーである CD34 陽性細胞が LL37 群に認められる。  
: CD34 陽性細胞

これまでの成果と本研究の成果から、LL37 による血管新生促進には、VEGF 発現の促進、血管の管腔形成の促進および CD 陽性細胞の集積が関わるということが明らかとなった。この LL37 による血管新生促進作用に加えて、LL37 による骨髄間葉系幹細胞の増殖促進が骨再生促進に関わるメカニズムとして考えられた。

本研究から、B-MSC と LL37 の移植がラット頭蓋骨骨欠損の再生において有用であることを示した。

現在の歯周組織再生療法に望まれることは適応症の拡大、すなわち重度に破壊された歯周組織を確実に再生することである。本研究は、細胞分化や血管新生という点において、MSC 自身が産生した細胞外基質 (足場) や血管新生因子である LL37 (調節因子) によって、MSC が十分に機能を発揮できる環境を整備し、骨再生が促進されることを示した。

今後、B-MSC と LL37 の複合体、すなわち再生 3 要素複合体を用いれば、歯周組織再生療法の適応症を拡大させ、患者が期待する抜歯適応の歯の保存が可能になり、国民が歓迎する歯周組織再生療法の開発につながる可能性がある。さらに、B-MSC と LL37 の移植は歯

周組織再生療法ばかりでなく、インプラントや整形外科領域の骨の再生にも応用できる治療法であると考えられる。

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 3 件)

Kittaka M., Kajiya M., Shiba H., Takewaki M., Takeshita K., Khung R., Fujita T., Iwata T., Nguyen T.Q., Ouhara K., Takeda K., Fujita T., Kurihara H., Clumps of a mesenchymal stem cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration, *Cytherapy*, in press doi: 10.1016/j.jcyt.2015.01.007., 査読有り

Kittaka M., Shiba H., Kajiya M., Ouhara K., Takeda K., Kanbara K., Fujita T., Kawaguchi H., Komatsuzawa H., Kurihara H., Antimicrobial peptide LL37 promotes vascular endothelial growth factor-A expression in human periodontal ligament cells, *J. Periodont. Res.*, 48, 228 ~ 234, 2013, 査読有り

Kittaka M., Shiba H., Kajiya M., Fujita T., Iwata T., Rathvisal K., Ouhara K., Takeda K., Fujita T., Komatsuzawa H., Kurihara H., The antimicrobial peptide LL37 promotes bone regeneration in a rat calvarial bone defect, *Peptides*, 46, 136 ~ 142, 2013, 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

加治屋幹人、橘高瑞穂、柴秀樹、竹脇学、竹下慶、岩田倫幸、應原一久、武田克浩、藤田剛、栗原英見、骨髄間葉系幹細胞集塊 Clumps of mesenchymal stem cells/extracellular matrix complex を利用した新規組織再生療法開発、第 57 回秋季日本歯周病学会学術大会、平成 26 年 10 月 19 日、神戸市

加治屋幹人、柴秀樹、竹脇学、竹下慶、Khung Rathvisal、Nguyen Quoc Troung、岩田倫幸、應原一久、武田克浩、藤田剛、栗原英見、骨髄間葉系幹細胞集塊 Clumps of a MSC/ECM complex (C-MSC) を用いた新規組織再生治療法の開発、日本歯科医学会 第 30 回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い」、平成 26 年 8 月 30 日、東京

橘高瑞穂、藤田 剛、柴 秀樹、栗原

英見、抗菌ペプチド LL37 はラット頭蓋骨  
骨欠損モデルにおける骨再生を促進する、  
第 54 回歯科基礎医学会学術大会ならび  
総会、2012 年 09 月 16 日、郡山市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴 秀樹 (SHIBA Hideki)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院  
・教授  
研究者番号：6 0 2 6 0 6 6 8

### (2) 研究分担者

藤田 剛 (FUJITA Tsuyoshi)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号：8 0 3 7 9 8 8 3

武田 克浩 (TAKEDA Katsuhiko)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院  
・助教  
研究者番号：1 0 4 5 2 5 9 1

### (3) 連携研究者

なし