

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670823

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を用いた慢性根尖性歯周炎に対する新規抗炎症療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel anti-inflammatory therapy for apical periodontal disease using mesenchymal cell transplantation

研究代表者

齋藤 正寛 (Masahiro, Saito)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40215562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で根尖性歯周炎における慢性炎症に対する新規抗炎症療法を開発する目的に、間葉系細胞を用いた抗炎症療法を開発した。この目的を達成するために、歯周組織の慢性炎症に関わるmatricellular proteinの開発の解析を行った。その結果、体の弾性機能を司るフィブリリン-1の発現低下が歯周組織の炎症反応を持続させる事を見出した。この結果よりfibrillin-1の減少が根尖性歯周炎に促進的に働く可能性を見出した。また細胞移植療法を開発するために、ヒト顎骨より骨原能力を有する細胞製剤の開発に成功した。本細胞の抗炎症効果は今後開発する事を予定している。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we attempt to develop anti-inflammatory therapy for apical periodontitis. To achieve this purposes, we investigate matricellular proteins which is a extracellular matrix involving acceleration of immune response. We found that reduced expression of fibrillin-1 that regulate tissue elasticity is excavated inflammatory response of periodontal tissue. From these findings, reduction of fibrillin-1 play an important role in the progression of apical periodontal disease. We also established alveolar bone derived immature osteoblast obtained from human alveolar bone. These cells has a high osteogenic ability and bone forming ability in vivo. We are investigating anti-inflammatory effect of these cells.

研究分野：歯科保存学

キーワード：再生医療 細胞移植 抗炎症 細胞外マトリックス 保存系歯学 動物モデル 結合組織疾患 間葉系細胞

### 1. 研究開始当初の背景

難治性の根尖性歯周炎とは、深部に潜む炎症の改善が困難で、通常の治療では臨床症状が一向に好転せずに苦慮する歯内療法困難歯である。この難治性の根尖性歯周炎は、通常の根管治療では排除できない必要な細菌を含む病原因子が引き起こす炎症が原因と考えられている(Fukushima et.al, J Endod, 1990)。近年の臨床歯内療法の進歩により、これまで把握できなかった患歯の病態把握が出来るようになり、難治性根尖性歯周炎の診断と処置を行えるようになった。しかし近年の臨床研究より根尖性歯周炎の悪化と慢性炎症疾患が関連することが報告され(Gomes M et al, JOE 2013)、実際に難治性根尖性歯周炎の罹患率は循環器疾患で高まる事が知られている(Paaqualini et al, JOE 2012)。このように有病者の難治性根尖性歯周炎治療には、慢性炎症の解決を目指した新たな抗炎症治療技術の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

本格的な高齢化社会を迎えた現代社会において、癌、糖尿病、循環器疾患、骨系統疾患を含む有病者の増加が予測されている。これらの疾患は慢性炎症を起こしやすく、そのため保存治療領域においては、難治性根尖性歯周炎を発症するケースが多い。しかし、これら有病者の慢性根尖性歯周炎の治療は未だに有効な手段は確立されてなく、その対策は今後増加する有病者の歯科医療技術の向上にむけて急務と言える。近年、慢性炎症に対する治療技術として、抗炎症を目的とした細胞移植が開始されており、表皮性水疱症で改善効果を示している。そこで本研究計画では、口腔内より抗炎症効果を有する細胞の採取技術の確立と、有病者の慢性根尖性歯周炎に対する抗炎症を目的とした細胞移植治療技術の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究は、有病者における難治性慢性根尖性歯周炎の新規抗炎症治療技術の基盤技術を開発することを目的にしている。そのため、難治性根尖性歯周炎診断のためのバイオマーカーの探索と、間葉系幹細胞を用いた移植プロトコルの確立とその効果の検証を行う。そのため、期間内に以下の項目を達成することを目的としている。

1) 難治性慢性根尖性歯周炎モデルを用いた新規診断技術の開発：露髄モデルを応用して根尖病巣モデル動物を形成し、慢性根尖性歯周炎診断のためのバイオマーカーを同定する。

2) 間葉系幹細胞を用いた新規保存治療技術の開発：1)で開発したモデルにヒト間葉系幹細胞を移植し、根尖性歯周炎の病態が改善するかを、炎症マーカーおよびバイオマーカーの発現を指標に評価する。

### 4. 研究成果

本研究で根尖性歯周炎における慢性炎症に対する新規抗炎症療法を開発する目的に、間葉系細胞を用いた抗炎症療法を開発した。この目的を達成するために、歯周組織の慢性炎症に関わる matricellular protein の開発の解析を行った。その結果、体の弾性機能を司るフィブリリン-1 の発現低下が歯周組織の炎症反応を持続させる事を見出した。この結果より fibrillin-1 の減少が根尖性歯周炎に促進的に働く可能性を見出した。

また細胞移植療法を開発するために、顎骨由来の骨芽細胞の分離培養および抗炎症能力を開発した。その結果、ヒト顎骨より骨原能力を有する細胞製剤の開発に成功した。本細胞は、高い石灰化能力を有し、また生体内で骨再生能力を有していた。本細胞の抗炎症効果は今後開発する事を予定している。

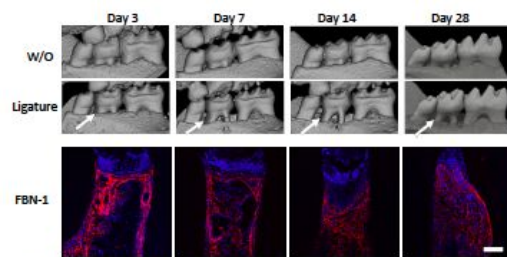


図1 歯周組織破壊過程におけるフィブリリンの発現パターン  
歯周組織破壊実験を行い、術後3日より28日までの過程をμCTで解析(上段中斷)、およびフィブリリン-1(FBN-1)の免疫染色像を示す。FBN-1の歯周組織破壊過程における持続的な発現が観察される。

### 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 4 件)

Umeyama K, Watanabe K, Watanabe M, Horiuchi K, Nakano K, Kitashiro M, Matsunari H, Kimura T, Arima Y, Sampetean O, Nagaya M, Saito M, Saya H, Kosaki K, Nagashima H & Matsumoto M, Generation of heterozygous fibrillin-1 mutant cloned pigs from genome-edited foetal fibroblasts. Sci Rep. 2016 April 14;6:24413. DOI: 10.1038/srep24413 査読有  
Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Yuasa K, Yoshizaki K, Iwamoto T, Saito M, Nakamura T, Fukumoto S. Interaction between Fibronectin and 1 Integrin Is Essential for Tooth Development. PLoS One. 2015 Apr 1;10(4):e0121667. doi: 10.1371/journal.pone.0121667 査読有  
Aino M, Nishida E, Fujieda Y, Orimoto A, Mitani A, Noguchi T, Makino H, Murakami S, Umezawa A, Yoneda T, Saito M. Isolation and

characterization of the human immature osteoblast culture system from the alveolar bones of aged donors for bone regeneration therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2014 Dec;14(12):1731-44. doi: 10.1517/14712598.2014.960387. Epub 2014 Sep 22 査読有  
Oshima M, Inoue K, Nakajima K, Tachikawa T, Yamazaki H, Isobe T, Sugawara A, Ogawa M, Tanaka C, Saito M, Kasugai S, Takano-Yamamoto T, Inoue T, Tezuka K, Kuboki T, Yamaguchi A, Tsuji T. Functional tooth restoration by next-generation bio-hybrid implant as a bio-hybrid artificial organ replacement therapy. *Sci Rep.* 2014 Aug 13;4:6044. doi: 10.1038/srep06044. 査読有

〔学会発表〕(計 25 件)  
シンポジウム

Masahiro Saito, Current strategy for periodontal regenerative therapy. Chulalongkorn-Tohoku joint symposium in dental science 2015, Bangkok, 2015,12.9  
K. Handa, V. Suresh, M. Ishikawa, and M. Saito, Current strategies for bone regeneration therapy in the treatment of periodontal disease. Eight French Reserch Organization-Tohoku University Joint Workshop on Frontier Materials, Sendai, 2015.12.2  
齋藤正寛, 細胞外マトリックス再生を導く新規創薬の開発 ～歯からはじまり大動脈へ～, 第13回日本再生歯科医学学会 学術大会・総会、新潟、2015.8.29  
齋藤正寛, 東北連携を基盤とした歯科再生医療の開発、臨床歯周病学会第 33 回 年次大会、仙台、2015.7.19  
齋藤正寛, 細胞外マトリックス補充療法による新規再生医療技術の開発、抗加齢学会第 15 回総会、福岡、2015.5.29  
Saito, M. Attempt to develop realization of periodontal regenerative therapy. 2014 3<sup>rd</sup> International Symposium on Dental Implantology and Biomaterials of West Coast Strait, Fujian, China, 2014.11.23  
Saito, M. Present state and progression of periodontal regeneration therapy 7<sup>th</sup> WCPPM, Taipei, 2014.10.2  
齋藤正寛 結合組織再生を目指した新規創薬の開発 ～歯からはじまり大動脈へ～日本歯科保存学会秋期学術大会 (第 141 回) 山形、2014.10.31

齋藤正寛 歯周組織再生医療の最前線平成 26 年度日本歯科理工学会 北海道・東北地方会夏期セミナー、帯広 2014 8.2  
Saito, M. Extracellular matrix administration therapy as a potential therapy for microfibril disorder. 第 46 回日本結合組織学会第 61 回マトリックス研究会合同学術集会, 東京, 2014.6.7  
Saito, M. Abnormal microfibril induced by ADAMTSL6 $\beta$  exacerbates inflammatory response of aortic aneurysm. 9th International Symposium on Marfan Syndrome and Related Disorders, Paris, France, 2014.9.26

口頭発表

半田慶介、VENKATAIAH Venkata Suresh、二木正晴、大倉華雪、松山晃文、村上伸也、齋藤正寛、マイクロミニピッグを用いた間葉系細胞移植による歯周組織再生療法の開発について。第 15 回日本再生医療学会総会、2016 年 3 月 17-19 日、大阪。  
IWAMATSU-KOBAYASHI Yoko, ORIMOTO Ai, VENKATAIAH Venkata Suresh, KANEHIRA Masafumi, HANDA Keisuke and SAITO Masahiro, The effect of S-PRG filler eluate on periodontitis models. The 6<sup>th</sup> International symposium for interface oral health science、2016 年 1 月 18 - 19 日、Sendai  
VENKATAIAH Venkata Suresh, ORIMOTO Ai, FUTAGI Masaharu, ZOU Wei, HANDA Keisuke and SAITO Masahiro, Adipose derived stem cell therapy for periodontal tissue regeneration in micro-mini pig model. The 6<sup>th</sup> International symposium for interface oral health science、2016 年 1 月 18 - 19 日、Sendai.  
ADAMTSL6 $\beta$  exacerbates tissue destruction of aortic aneurysm and dissection in marfan syndrome mice model through the progression of ADAMTS4 activity. Masaharu Futagi, Ai Orimoto, Masaki Ishikawa, Keisuke Handa, Masahiro Saito, ASCB, SanDiego, 2015.12.15  
石河 真幸、折本 愛、二木 正晴、半田 慶介、齋藤 正寛、新規歯科再生医療の実現化への挑戦：Pannexin 3 を用いた硬組織再生医療の開発、第 6 8 回 東北大学歯学会、2015 年 12 月 11 日、仙台  
折本 愛、二木 正晴、石河 真幸、半田 慶介、齋藤 正寛、ADAMTSL6 を介したマルファン症候群モデルにおける組織破壊機構の解析。第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2015 年 11 月 12, 13 日、東京。

小林洋子、兼平正史、半田慶介、齋藤正寛、S-PRG フィラー抽出液由来イオンによるマウス歯周炎モデル抑制機構の解析。第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2015 年 11 月 12,13 日、東京  
石河真幸、齋藤正寛、Pannexin 3 は細胞内 ATP と  $Ca^{2+}$ 濃度を調整する、骨芽細胞分化の新規制御因子である。第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2015 年 11 月 12,13 日、東京。  
半田慶介、折本愛、小林洋子、齋藤正寛、マルファン症候群モデルマウスにおける歯周炎の組織破壊機構に関する研究。第 142 回日本歯科保存学会春季学術大会、2015 年 6 月 25, 26 日、北九州。  
KANEHIRA Masafumi, MEHTA Deepak, MOOGI Prashant, SURESH Venkata, RUPESH Maratham C., SAITO Masahiro, SASAKI Keiichi, Randomized, controlled clinical trial on dentin desensitization with a calcium phosphate containing paste. 第 142 回日本歯科保存学会春季学術大会、2015 年 6 月 25, 26 日、北九州。  
折本 愛、半田慶介、村澤祐介、磯貝 善蔵、齋藤正寛、ADAMTSL6 $\beta$ が誘導する微細線維形成によるマルファン症候群モデルマウスの大動脈瘤悪化機構の解析。第 47 回日本結合組織学会、2015 年 5 月 16 日、東京  
IWAMATSU-KOBAYASHI Yoko, ORIMOTO Ai, HANDA Keisuke and SAITO Masahiro  
Effect of S-PRG Filler Eluate on the Tissue Destruction of the Ligature-induced Periodontitis Model  
IADR Boston, USA, 2015.3.12  
IWAMATSU-KOBAYASHI Yoko, ORIMOTO Ai, HANDA Keisuke and SAITO Masahiro, Effect of S-PRG Filler Eluate on the Tissue Destruction of the Ligature-induced Periodontitis Model, JADR 大阪、2014.12.4  
藤枝宜泰、安部翔太、折本愛、半田慶介、齋藤正寛、微細線維の形成異常による大動脈瘤の炎症悪化機構の解析 第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014.11.26  
小林 洋子、安倍 翔太、折本 愛、島内 英俊、齋藤 正寛 S-PRG フィラー抽出液によるマウス歯周炎モデル予防効果の解析、第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2014.10.30  
Masahiro Saito, Makoto Aino, Eisaku Nishida, Akio Mitani, Toshihide Noguchi, Toshiyuki Yoneda, Establishment of a human immature osteoblast culture system obtained from middle-aged donors. IADR Cape Town, South Africa, 2014.6.26  
齋藤 正寛、相野 誠、三谷 章雄ヒト歯槽骨由来未分化骨芽細胞の骨原性維

持に関わるマーカーの探索、第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会、北九州 2014.6.19  
藤枝宜泰、安倍翔太、折本 愛、原 真理、吉田利通、今中恭子、齋藤正寛、マウス大動脈壁発生過程における細胞外マトリックスネットワークの発現パターンニング第 46 回日本結合組織学会第 61 回マトリックス研究会合同学術集会、東京、2014.6.8

〔図書〕(計 1 件)

1. 半田慶介、齋藤正寛：歯周組織再生療法の実用化にむけた技術開発と課題歯科再生・修復医療と材料、シーエムシー出版、東京、2015、72-81

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：歯槽骨由来の未分化骨芽細胞との複合体およびその応用

発明者：齋藤正寛、半田慶介、稲垣雅彦、北川 全

権利者：同上

種類：特許願

番号：特願 2016-8352

出願年月日：2016 年 1 月 19 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 正寛 (SAITO MASAHIRO)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：40215562

### (2) 研究分担者

吉田 恭子(今中 恭子)(YOSHIDA KYOKO)

三重大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00242967

小林 洋子(岩松 洋子)(KOBAYASHI YOKO)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50261524

### (3) 連携研究者

齋藤 忠夫 (SAITO TADAO)

東北大学・農学部・教授

研究者番号：00118358