

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861639

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞ニッチという観点から見た歯槽骨創傷治癒メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism identification of alveolar wound healing from the viewpoint of mesenchymal stem cell niche

研究代表者

大野 充昭(Ono, Mitsuaki)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60613156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：創傷治癒過程において、周りの組織から遊走した幹細胞が重要な働きを担っていることが知られている。そこで我々は、拔牙窩創傷治癒部位に多くの幹細胞が集まると推測し、拔牙三日後の拔牙窩より細胞の単離し、骨髄由来間葉系幹細胞と比較検討した。その結果、拔牙窩由来細胞は、骨髄由来間葉系幹細胞と同様に骨芽細胞、脂肪細胞分化能を有している細胞群であった。また興味深いことに、拔牙窩由来細胞は歯根膜組織を再生可能な細胞群であることが、イヌ歯根膜再生モデルにおいて明らかとなった。  
本結果は、歯根膜組織に拔牙窩由来間葉系幹細胞のニッチが存在する可能性が示唆している。

研究成果の概要(英文)：It is well known that stem cells migrate from surrounding tissues and play important roles in wound healing. We hypothesized that stem/progenitor cells could be isolated from granulation tissue in the dental socket, and then collected the tissue 3 days after tooth extraction in mice and beagle dogs. dental socket-derived cells (DSCs) were compared with BMSCs for phenotype characterization. DSCs also presented osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation ability. We also tested the ability of dDSCs to regenerate periodontal tissue. Defects in the dDSC group were regenerated with cementum-like and periodontal ligament-like tissues and alveolar bone. From these data, it is expected that the stem cell niche exists in periodontal tissue.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：幹細胞ニッチ 間葉系幹細胞 拔牙窩 創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

近年、良好な補綴治療を目指して抜歯後の歯槽骨吸収を最小限に止めるための Socket Preservation 法が注目されている。抜歯後においても歯槽骨の高さや幅を維持することができれば、補綴治療の選択肢が広がり、より清掃性や審美的に優れた治療が可能となる。

一方、ビスフォスフォネート (BP) 製剤を投与されている患者が抜歯などの侵襲的歯科治療を受けた後、顎骨壊死を発生する、いわゆる、BP 製剤関連顎骨壊死 (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw: BRONJ) が大きな社会問題となっている。BP 製剤は骨粗鬆治療の第一選択薬であり、その他にも癌の骨転移や骨の脆弱症を特徴とする疾患に対し効果があり、多くの患者が服用している。しかし、BRONJ の病態や治療法が確立されていないため、一度発症すると根治が難しい場合が多い。その結果、BP 製剤投与を受けている歯科患者の多くは、必要な処置 (歯周外科処置、インプラント埋入) を受けることができず、結果的に予知性の高い補綴治療を得るのが困難な状況になっている。

組織再生療を開発するためには、その機能不全モデルである BRONJ の治療法を開発するためにはその機能不全モデルである BRONJ の治療法を開発するためには、再生の場で生じる分子細胞メカニズムを理解する必要がある。例えば、抜歯窩のような組織修復や歯槽骨の恒常性維持のためには組織幹細胞の供給が必要不可欠であることが知られている。そのために、様々な組織や骨髄に未分化間葉系幹細胞がプールされており、組織が損傷を受けるとこの幹細胞ニッチから組織修復部位へ幹細胞がリリースされ、再生の場で増殖、分化するものと推測されている。これまでに、幹細胞ニッチとして、血管内皮細胞 (Medici et.al. *Nature Medicine*, 2010) や、その周囲に存在するペリサイト (Feng et.al. *PNAS*, 2010) が報告されている。これを受けて申請者は、新たな幹細胞供給源と幹細胞ニッチの探索にトライしてきた。そして、抜歯窩創傷

治癒過程にある局所には、組織再生に最適化された幹細胞もしくは前駆細胞が多量に存在するとの仮説に立脚し、治癒途中にある抜歯窩肉芽組織より新たな幹細胞を採取することに世界で初めて成功した (「新規間葉系幹細胞」特許第 4859078 号)。

しかし、未だ抜歯窩の創傷治癒メカニズムは不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

安定した Socket Preservation の治療法開発には、抜歯窩創傷治癒の理解なくしては難しい。本研究計画では、抜歯後の歯槽骨再生機序を、顎骨・歯槽骨創傷治癒モデルを用いて、間葉系幹細胞の供給源および幹細胞ニッチの観点からそのメカニズムを解明すること、さらに、歯周組織再生能を有する新規抜歯窩肉芽組織由来幹細胞を応用した骨・歯周組織再生医療の有用性を評価することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス抜歯窩の組織学的評価

岡山大学動物倫理委員会承認のもと、すべての動物実験を実施した。全身麻酔下にてマウス (3 週齢雌性 C57BL/6) の上顎第一、二臼歯を抜歯し、抜歯 0、1、3、5、7 日後に組織を回収しパラフィン切片および凍結切片を通常法に従い作製した。そして、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色)、間葉系幹細胞マーカーの一つである CD146 の免疫組織化学染色を行い、創傷治癒過程にある抜歯窩に幹細胞が存在するかを免疫組織化学的に評価した。

### (2) マウス抜歯窩肉芽組織からの細胞の分離および細胞の評価

抜歯 3 日後にマウス抜歯窩から肉芽組織を回収し、Outgrowth 法にてマウス抜歯窩由来細胞 (mouse Dental Socket Derived Cells : mDSDCs) を分離した。対照として、同一個体の大腿骨骨髄液から、骨髄由来間葉系幹細胞 (mouse Bone Marrow Stem Cells : mBMSCs) を分離した。mDSDCs が多分化能を有しているかを確認するため、骨芽細胞および脂肪細胞

分化誘導培地にて培養し、アリザリンレッド S 染色、オイルレッド O 染色、および mRNA を回収し、骨芽細胞および脂肪細胞の特異的マーカーであるアルカリフォスファターゼ (Alp) およびペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (Ppar) の発現量を定量性 RT-PCR 法にて評価した。

### (3) 歯周組織再生能の検討

歯周組織再生治療への応用を考慮し、イヌ歯周病モデルにて dDSDCs の歯周組織再生能を検討した。つまり、前もって第四小臼歯を抜歯しておいたイヌ下顎第一大臼歯近心に一壁性骨欠損を作製し、露出した根面のセメント質を完全に除去し象牙質を露出させ、歯周病モデルを作製した。同一個体から採取した dDSDCs を、UPCell<sup>®</sup> および PGA シート (Neoveil, GUNZE) を用い細胞シートを作製し、根面に密着させるように移植した (dDSDCs 群)。対照として、反対側に PGA シートのみを移植した (非移植群)。骨欠損部には  $\beta$ -TCP を移植し、歯肉を緊密に縫合した。8 週後に組織を回収し、HE 染色およびアザン染色にて組織学的に検討した。

## 4. 研究成果

### (1) マウス抜歯窩の組織学的評価

マウス抜歯窩の組織学的検討の結果抜歯後、時間経過とともに抜歯窩内は線維性組織で満たされ、抜歯 7 日後には幼若な骨に置換されている像が観察された。その中でも特に幼若な線維性結合組織によって満たされている抜歯 3 日後の抜歯窩では、骨壁および中央付近に CD146 陽性細胞が多数観察された。

### (2) マウス抜歯窩肉芽組織からの細胞の分離および細胞の評価

抜歯 3 日後の抜歯窩に CD146 陽性細胞が多数存在していたことから、抜歯 3 日後の肉芽組織から Outgrowth 法を用い細胞の分離を行った。初めに、分離した細胞の多分化能を検討するため、骨芽細胞および脂肪細胞分化誘導培地にて培養した。その結果、mDSDCs 群および mBMSCs 群共に、石灰化結節および脂肪滴が形成されていることをアリザリンレ

ッド S 染色およびオイルレッド O 染色にて確認した。また、骨芽細胞および脂肪細胞の分化マーカーである *Alp* および *Ppar* の mRNA の遺伝子発現量はそれぞれの分化誘導培地にて培養することで増加していた。

### (3) 歯周組織再生能の検討

最後に、dDSDCs の歯周組織再生能をイヌ歯周病モデルにて検討した。その結果、dDSDCs 移植群では、セメント質を除去した露出象牙質表面にセメント質様組織、ならびにその周囲に骨様組織が形成され、それら組織をつなぐようにシャーピー線維様組織が両組織に入り込む像が観察された。一方、非移植群では、骨様組織の形成は認められたが、露出象牙質表面には、セメント質様組織の新生は認められず、硬組織内へ線維組織が入り込む像も観察されなかった。

本結果は、歯根膜組織に抜歯窩由来間葉系幹細胞のニッチが存在する可能性が示唆している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakajima R, Ono M, Hara ES, Oida Y, Shinkawa S, Pham HT, Akiyama K, Sonoyama W, Maekawa K, Kuboki T. Mesenchymal stem/progenitor cell isolation from tooth extraction sockets. *Journal of Dental Research*. 93(11):1133-1140, 2014. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

Pham HT. Tryptophan Enhances the Stem Cell Phenotype and Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells in vitro and in vivo. 第33回日本骨代謝学会学術集会. 東京, 日本. 発表日2015.7.24.

Pham HT. Effect of Tryptophan to Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells on the Stemness and Osteogenesis in vitro and in vivo. The 36th Annual Meeting of the

American Society for Bone and Mineral Research.Seattle,USA. 発表日2015.10.12.

Pham HT. Tryptophan Enhances Stemness and Osteogenesis of Bone Marrow Stromal Cells. The 63rd Annual Meeting of JADR. Fukuoka,Japan. 発表日2015.10.30.

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：骨形成促進剤

発明者：窪木拓男、大野充昭、ファン タン  
ハイ,ハラ サトシ エミリオ

権利者：同上

種類：特許

番号：特願2015-69222

取得年月日：27年3月30日

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大野 充昭 (ONO MITSUAKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科  
・助教

研究者番号：60613156

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし