

# 論 文 内 容 要 旨

Clumps of MSCs/ECM complexes can induce  
periodontal tissue regeneration via direct  
differentiation

(Clumps of MSCs/ECM complexes は自身の分化能  
によって歯周組織再生を促進する)

主指導教員：水野 智仁 教授

(医系科学研究科 歯周病態学)

副指導教員：加藤 功一 教授

(医系科学研究科 生体材料学)

副指導教員：谷本 幸太郎 教授

(医系科学研究科 歯科矯正学)

曾根 久勝

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【目的】

歯周炎によって生じた限局的な組織欠損に対して、遮蔽膜を用いる GTR 法や、bFGF などのサイトカイン投与は、残存組織中の細胞機能を制御し歯周組織の再生を誘導できる。しかし、III 級根分岐部病変や水平性骨欠損を有する重度歯周組織欠損では、残存組織中の細胞数が決定的に不足するため、GTR 法やサイトカイン投与は適応できない。そのような重篤な歯周組織欠損の再生には、患部に不足している機能的な細胞を、外部から補充する細胞治療法の開発が必要である。

私達の研究室では、自己複製能を有し、歯周組織構成細胞に分化可能な間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells (MSCs)) に着目し MSCs と自身が産生する細胞外基質 (Extracellular matrix (ECM)) によって構成される細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs) を樹立した。C-MSCs は直径約 1 mm の立体構造を持ち、人工足場材料を用いることなく様々な組織欠損形態に適合した細胞移植が可能で、組織再生において有用である [1]。特にビーグル犬 III 級根分岐部病変に対する自家骨髄由来 C-MSCs の移植が効果的な歯周組織再生を誘導することが報告されている [2]。さらに SCID マウス頭蓋冠欠損モデルに対してヒト由来 C-MSCs を移植したところ、移植された細胞が欠損部にとどまり、骨芽細胞・骨細胞に分化しながら骨再構築を行うことが示されている [3]。

この C-MSCs を歯周組織再生療法として臨床応用するためには、その再生メカニズムを正確に理解する必要がある。再生メカニズムの検証には、上述したビーグル犬を用いた実験系では観察期間が長期間に及ぶため好ましくない。さらに、SCID マウスでは歯周組織欠損を作製することが困難であり、同様に歯周組織再生メカニズムの検証には適さない。したがって、本研究ではラット歯周組織欠損モデルを作成し、ここに同系ラット骨髄由来 C-MSCs を移植することで、その歯周組織再生効果と、移植された細胞の振る舞いについて組織学的に観察した。

## 【方法】

F344 ラット大腿骨から分離した MSCs を 10 cm dish で約 7 日間、sub confluent になるまで培養させた。1 回目の継代は同様の 10 cm dish を用いて  $1.0 \times 10^6$  cell /dish で播種し sub confluent になるまで培養させた。2 回目の継代では 24 Well Plate に  $2.0 \times 10^5$  cells/well の高密度で播種し、十分な基質を産生させるためにアスコルビン酸を添加した Growth medium を用いて 4 日間培養した。得られた細胞シートを well の底から鈍的に剥離し、デキサメタゾン ( $10 \text{ nmol/l}$ )・アスコルビン酸 ( $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ )・ $\beta$ グリセロフォスフェート ( $10 \text{ mmol/l}$ ) 含有の培地で 5 日間浮遊培養を行うことで、細胞集塊 C-MSCs を得た。細胞追跡のため C-MSCs 作製には、細胞膜

を蛍光標識する PKH-26 を添加することで、PKH26-C-MSCs を樹立した。

F344 ラット歯周組織欠損モデルは、下顎第一大臼歯遠心根が露出するように 2.0 mm×3.0 mm×1.0 mm の歯槽骨を削除し、露出させた遠心根のセメント質を SRP にて除去した。作製したラット歯周組織欠損モデルに人工材料を用いることなく、10～12 個の C-MSCs を直接移植した。移植 3 週間後にマイクロ CT を用いて骨再生量を定量し、また組織学的解析によって歯周組織再生の評価を行った。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いて移植された PKH26 陽性細胞の分布を観察した。

### 【結果】

マイクロ CT の解析から、移植無し群と比較して、C-MSCs 移植群において明らかな歯槽骨の再生が認められた。HE 染色による組織学的評価では、C-MSCs 移植群で新生セメント質と歯槽骨、さらにそれらをつなぐ歯周靭帯が観察された。さらに、アザン染色によって新生セメント質に埋入するシャーパー繊維を認めた。一方、移植なし群ではこれらの新生セメント質や歯周靭帯の再生は認められず、線維性結合組織を認めるのみであった。

再生した組織中の PKH26 陽性細胞の分布を観察したところ、移植した PKH26 陽性細胞は骨表面、骨基質内部、歯周靭帯及び根面部に認められた。またこれらの部位には宿主由来の PKH26 陰性細胞も同時に認められた。

### 【結論】

ラット歯周組織欠損モデルへの C-MSCs の移植は歯周組織再生を促進することが示された。またその C-MSCs による歯周組織再生メカニズムは、移植された細胞が宿主の細胞と協調しながら、セメント芽細胞、歯根膜細胞、骨芽細胞へと分化したことによると考えられる。

### 参考文献

- [1] Kittaka, M et al., *Cytotherapy*. 2015; 17: 860–873.
- [2] Takewaki, M et al., *J. Dent. Res.* 2017; 96: 984–991.
- [3] Motoike, S et al., *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20: 3970.