

# 学 位 論 文 全 文 要 約

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)

曾根 久勝  
広島大学大学院医歯薬保健学研究科  
博士課程 医歯薬学専攻

2021年度

主指導教員：水野 智仁 教授  
(広島大学大学院 医系科学研究科 歯学専門プログラム  
歯周病態学研究室)

## 【目的】

歯周病は歯周病原細菌の感染とそれに対する宿主の免疫応答の結果生じる炎症性疾患である。歯周病が進行すると歯牙を支える歯槽骨の吸収および歯周靭帯の損傷といった歯周組織破壊を引き起こすことで、最終的には歯牙の喪失をもたらす。その結果、審美障害だけでなく発音・構音障害さらには咀嚼機能低下といった機能障害を招くこともある。歯周治療では、歯周基本治療として Tooth Brushing Instruction (TBI) およびスクレーピング・ルートプレーニングを行うことによって、原因となっている細菌の除去を行う。さらに、歯周基本治療のみで改善の認められない場合は、歯周外科手術に移行する治療が行われている。これらの歯周治療によって感染源の除去による炎症の改善は可能であるが、破壊された歯周組織の再生は一部の歯槽骨欠損状態を除いて困難である。現在行われている歯周組織再生療法として遮蔽膜を用いる GTR 法や、BFGF などのサイトカイン投与がある。これら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

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 nmol/l)・アスコルビン酸(50  $\mu$ g/ml)・ $\beta$ グリセロフォスフェート(10 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 $\times$ 3.0 mm $\times$ 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 10 日及び 21 日後にマイクロ CT にて石灰化・骨化の程度を観察し、組織学的解析を行った。

#### 【結果】

10 日目の移植群では欠損内部に豊富な I 型コラーゲンとドナー由来細胞移植細胞が観察された。21 日目の移植群では、C-MSCs 移植によるセメント質、歯周靭帯をともなう歯周組織再生を認め、再生された歯周組織内に宿主由来細胞だけでなく多くのドナー由来細胞が観察された。

#### 【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., *Cytherapy*. 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.