



Title	間葉系幹細胞の同種移植による歯周組織再生療法の開発
Author(s)	河上, 和馬
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96003
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (河 上 和 馬)

論文題名

間葉系幹細胞の同種移植による歯周組織再生療法の開発

論文内容の要旨

【研究目的】

我々の研究室では、重度歯周病に対する新たな歯周組織再生療法として、脂肪組織由来多系統前駆細胞（Adipose tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cell : ADMPC）を用いた治療法の開発に取り組んでいる。これまでに、歯周病患者の皮下脂肪組織より単離・培養したADMPCを、フィブリンゲルを足場材として歯周組織欠損部に自己移植することにより、有意な歯周組織の再生が誘導されることを明らかにした。細胞治療には自己移植と同種移植があり、自己移植は自身の細胞を用いるため安全性が高い一方で、治療効果には細胞特性に依存した個人差が生じる可能性がある。対照的に、同種移植では、治療効果の高い細胞を予め選別して用いることが可能であり、良好な治療効果を安定的に得られるといった長所が期待される。また、治療期間の短縮や治療費の低減の観点から、急性移植片対宿主病やクローン病に伴う複雑痔瘻に対する同種間葉系幹細胞製剤が社会実装されてきた前例がある。我々の研究室においても、東北大学との共同研究にて実施した非臨床研究においてADMPCの同種移植による歯周組織再生効果を報告している。しかしながら、ADMPCの同種移植による歯周組織再生効果がどのような分子機序により成立するかについては未だ十分な情報がない。そこで本研究ではADMPCの同種移植による歯周組織再生療法の有効性とその作用機序を解明することを目的に*in vivo*と*in vitro*の両面で解析を行った。

【材料と方法】

ADMPC同種移植による歯周組織再生効果と移植細胞の動態を明らかにするため、ラットADMPC同種移植モデルを用いた解析を行った。まず、Sprague-Dawley系ラット（SDラット）の皮下脂肪組織からADMPCを単離・培養し、幹細胞マーカーの発現をフローサイトメトリー解析するとともに、各分化誘導培地を用いて培養した後に、アリザリンレッド染色およびオイルレッドO染色により多分化能を評価した。次に、SDラットの上顎第一臼歯近心口蓋側分岐部に作製した歯周組織欠損に対し、SD-Tg (CAG-EGFP) ラット (GFPラット) から単離・培養したADMPC (GFP-ADMPC) を、フィブリンゲルを足場材として同種移植した。なお、対照側にはフィブリンゲルのみを埋植した。移植2か月後の顎骨を採取し、μCT解析およびアザン染色による組織学的解析により歯槽骨の再生と新付着の獲得を評価した。さらに、経時的に顎骨を採取し、Cubic技術による組織透明化処理後に、ライトシート顕微鏡を用いてGFPシグナルを検出するとともに、Tunel染色によりアポトーシス細胞を検出した。

次に、ADMPCのアポトーシスが歯周組織の再生に及ぼす影響を検討するために、*Bcl2*をGFP-ADMPCに強発現させた細胞 (*Bcl2*-ADMPC) を作製した。*Bcl2*-ADMPCにおける*Bcl2*発現をRT-PCR法およびウェスタンブロット法にて確認するとともに、*in vitro*にてアポトーシス抵抗性をアクチノマイシンD誘導性Caspase 3/7発現を指標に確認した後、同細胞を歯周組織欠損部に同種移植し、対照側にはコントロール遺伝子を導入したGFP-ADMPC (ctrl-ADMPC) を移植した。移植7日後の顎骨を採取し、上記と同様に被移植部位におけるGFPシグナルを検出することで*in vivo*におけるアポトーシス抵抗性を確認した。続いて、移植2か月後の顎骨を採取し、上記と同様の方法により*Bcl2*-ADMPCの同種移植による歯周組織再生効果を評価した。

さらに、アポトーシスADMPCのマクロファージによるエフェロサイトーシスとその後に生じる変化について検討するため、*in vitro*解析を行った。すなわち、SDラットから骨髓細胞を採取し、M-CSF存在下で培養することによりマクロファージを誘導する一方で、アクチノマイシンDを用いてGFP-ADMPCのアポトーシスを誘導した。その後、アポトーシス誘導あるいは非誘導ADMPCをマクロファージと共培養しタイムラプスイメージングを行った。さらに、ADMPCとマクロファージをそれぞれ異なる蛍光色素で標識した後、上記と同様に共培養し、タイムラプスイメージングを行うとともに、フローサイトメトリー解析にて両蛍光色素を有するDouble Positive (DP) 細胞の比率と、マクロファージにおけるCD163の発現を解析した。

【結果】

ラットの皮下脂肪組織より単離したADMPcが間葉系幹細胞マーカーであるCD54、CD90を発現すること、および同細胞を分化誘導することによりアリザリンレッド染色陽性の石灰化ノジュール形成、あるいはオイルレッドO染色陽性の脂肪滴形成が確認された。GFP-ADMPcの同種移植2か月後の顎骨のμCT解析から、GFP-ADMPc移植側において、対照側と比較し有意な歯槽骨の再生が認められた。また、アザン染色による組織学的解析の結果、GFP-ADMPc移植側において対照側と比較し有意に多い新付着の獲得が認められた。ライトシート顕微鏡観察の結果、被移植部における移植細胞由来のGFPシグナルが移植7日後まで認められ、移植2週間後では検出域以下であった。また、Tunel染色による組織学的解析の結果、移植4日後、7日後に被移植部位にTunel陽性細胞が認められ、移植2週間後には観察されなかった。

Bcl2-ADMPcにおける遺伝子レベルおよびタンパクレベルでの*Bcl2*の発現の上昇が確認された。*Bcl2*-ADMPcはctrl-ADMPcと比較してアクチノマイシンD誘導性Caspase 3/7の活性が有意に低下することが確認された。また、対照側と比較し、*Bcl2*-ADMPcの同種移植において強いGFPシグナルが検出された。*Bcl2*-ADMPcの同種移植2か月後のμCT解析から、歯槽骨の再生が対照側と比較し有意に低下していた。また、アザン染色による組織学的解析の結果、*Bcl2*-ADMPc移植側における新付着の形成が、対照側と比較し有意に低下していることが明らかとなった。

アポトーシス誘導あるいは非誘導GFP-ADMPcとマクロファージとの共培養をタイムラプス観察した結果、アポトーシス誘導群において、マクロファージによりGFPシグナルが取り込まれる像が観察された。一方で、異なる蛍光で標識したADMPcとマクロファージとの共培養をタイムラプス観察した結果、マクロファージがアポトーシス誘導ADMPc由来の蛍光シグナルを取り込み、DP細胞となる像が観察された。フローサイトメトリー解析から、アポトーシス誘導ADMPcとマクロファージを共培養した群でアポトーシス非誘導群と比較してDP細胞の比率が増加した。また、アポトーシス誘導ADMPcとマクロファージを共培養したDP細胞においてのみCD163の発現が認められた。

【結論と考察】

本研究結果から、ADMPcの同種移植による歯周組織再生療法の有効性を見出すとともに、その再生機序の一端を移植細胞のアポトーシスとその生体内処理機構の観点から解明した。

本研究では、ラット歯周組織欠損にADMPcを同種移植することにより有意な歯槽骨の再生と新付着の獲得が認められた。この結果は、ADMPcの同種移植による歯周組織再生効果を強く示唆するものと考えられる。また、GFP-ADMPc移植後のライトシート顕微鏡観察像ではGFPシグナルが被移植部位において移植7日後まで観察され、14日後には検出域以下であった。さらに、移植7日後の観察像では、GFPシグナルが被移植部位から、周囲の組織に拡散せず、同部位に集積した状態を維持していたこと、さらに被移植部位でTunel陽性細胞が観察されたことに加え、*Bcl2*-ADMPcの移植部位に対照側と比較して強いGFPシグナルが観察された結果を考え合わせると、同種移植したADMPcは被移植部位に留まったまま移植後14日以内にアポトーシスすることで消失したものと考えられる。

続いてアポトーシス抵抗性を示す*Bcl2*-ADMPcを同種移植した結果、被移植部位における長期生存が示唆されるとともに、歯周組織再生効果は対照群と比較し有意に低下したことから、ADMPcのアポトーシスが歯周組織再生過程に積極的に関与することが示唆された。

さらに、*in vitro*解析にて、アポトーシス誘導ADMPcをエフェロサイトシスしたマクロファージにCD163の発現が認められたことから修復型に変化したことが示唆された。これまでに、我々の研究室ではADMPc由来の液性因子によるTrophic効果が歯周組織の再生に寄与することを明らかにしてきたが、今回の研究結果から歯周組織に移植したADMPcのアポトーシスが、マクロファージによるエフェロサイトシスを介して歯周組織の再生に寄与する可能性が明らかとなった。今後は*in vivo*解析により、ADMPc同種移植による歯周組織再生効果に対するエフェロサイトシスの影響を明らかにする必要があると考えている。

本研究の成果は、今後のADMPcの同種移植製剤の開発とその実用化につながる基盤情報として活用されるものと期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (河 上 和 馬)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	村上 伸也
	副 査	教授	山城 隆
	副 査	准教授	波多 賢二
	副 査	講師	竹内 洋輝

論文審査の結果の要旨

本研究は、脂肪組織由来多系統前駆細胞（以下、ADMPC と略す）の同種移植による歯周組織再生効果と同効果の作用機序における ADMPC のアポトーシスの関与について検討したものである。

ラット歯周組織欠損モデルを用いた *in vivo* 解析から、ADMPC の同種移植が有意な歯周組織の再生を誘導することが明らかになるとともに、被移植部位における ADMPC のアポトーシスが組織再生に積極的に寄与することが示唆された。また、*in vitro* 解析の結果から、アポトーシスが誘導された ADMPC をエフェロサイトーシスしたマクロファージが、修復型の表現型を示すことが明らかとなった。

以上の研究結果は、ADMPC 同種移植による歯周組織再生効果とその作用機序の一端を明らかにし、幹細胞移植による歯周組織再生療法の研究開発に重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。