



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	神経堤細胞の賦活化を基盤とする歯周組織再生療法の開発に向けて
Author(s)	友清, 淳
Citation	北海道歯学雑誌, 45, 7-9
Issue Date	2024-09-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93121
Type	journal article
File Information	45_02.pdf



最新の歯学

神経堤細胞の賦活化を基盤とする歯周組織再生療法の開発に向けて

Development of a Novel Regenerative Treatment for Periodontal Tissues through the Activation of Neural Crest Cells

北海道大学大学院歯学研究院 口腔保健科学分野 歯科保存学教室
友清 淳

はじめに

組織工学（ティッシュエンジニアリング）は、1990年代初頭に提唱された生体機能を備えた組織や臓器を人工的に作り出すという理論である¹⁾。ティッシュエンジニアリングにおいては、細胞（cell）、細胞外基質（scaffold）、および形態形成因子（signaling）から構成されるTissue Engineering Triadが重要と考えられており、この概念が提唱されて以降、数多くの研究者がTissue Engineering Triadを基盤とする組織再生を実現させるため研究を行ってきた。さらに筆者らは、ティッシュエンジニアリングに生体模倣技術（バイオミメティクス）の概念を組み合わせた、新しい歯周組織再生療法の創出を目指し研究を進めている。本稿では、筆者らの研究の進捗状況について紹介する。

バイオミメティクスと自己治療/修復

バイオミメティクスは、自然や生物の持つ構造や機能などを解析・模倣することで、その原理を人工物へと応用する技術であり、1950年代にイカの軸索膜からシュミットトリガー回路を開発したOtto Schmittにより提唱された²⁾。バイオミメティクスは工学分野のみならず、材料科学、建築、芸術、医療など様々な分野で応用されており、歯科領域においてもコンポジットレジン、義歯・クラウン等の補綴物、そしてインプラントなどが天然歯を模倣することからバイオミメティクスと捉えられている（図1）。バイオミメティクス研究は様々な分野において発展を見せ、飛躍的に世界規模へと拡大していったことから、製品の互換性や安全性を確保する目的で2012年に国際標準化機構（ISO）により国際標準化が行われた。ISOはプロセス、セルフX、センサー、流体力学、省エネルギー・省資源、環境適応性、行動・生態の8つのカテゴリーをバイオミメティクスの応用が期待できる分野として定義し、さらにセルフXのカテゴリーでは具体的な事例として自己組織化、自己治療/修

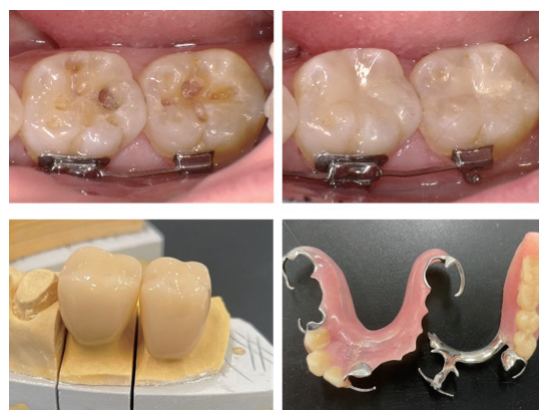
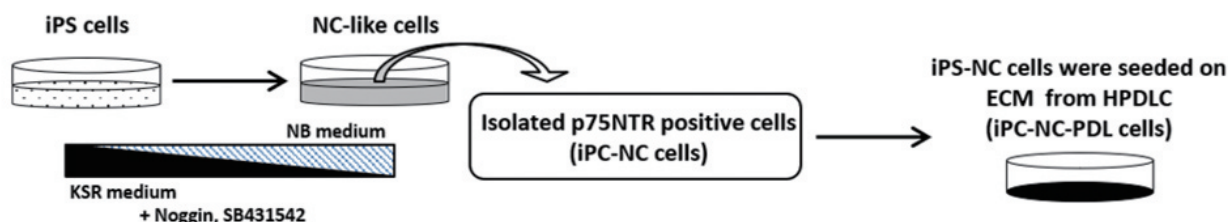


図1 歯科領域におけるバイオミメティクス
コンポジットレジン、クラウン、義歯などは歯や歯肉といった生体を模倣しているためバイオミメティクスに含まれる。

復、自己集合、自己洗浄、セルフシャープニングが示された。筆者らは、この「バイオミメティクスを応用した自己治療/修復」に着目し、バイオミメティクスの歯周組織再生療法創出への応用を着想した。

歯周組織の発生と再生

頭蓋領域における間葉系組織の大部分は、神経管周囲の神経堤から遊走する神経堤細胞（NC）に発生を由来する。したがって、歯槽骨、セメント質、歯根膜（PDL）といった歯周組織もNCに発生を由来する。またティッシュエンジニアリングにおけるTissue Engineering Triadの細胞成分においては、自己増殖能と多分化能によって定義される幹細胞が重要な役割を果たすことが知られている。PDLには体性幹細胞の一つである歯根膜幹細胞（PDLSC）が存在するが、興味深いことにPDLSCはPDLだけでなく包括的な歯周組織を形成する能力を有することが明らかとなっている³⁾。さらにPDLSCも、PDLと同様にNCから分化することで発生する。これらの内容は、PDLSCが歯周組織全体の再生において中心的役割を果たすこと、およびNCが

図2 iPSCからiPSC-NCおよびiPSC-NCからiPSC-PDLSCへの分化誘導法⁶⁾

らPDLSCへの分化が歯周組織発生過程の一部であることを示すものである。

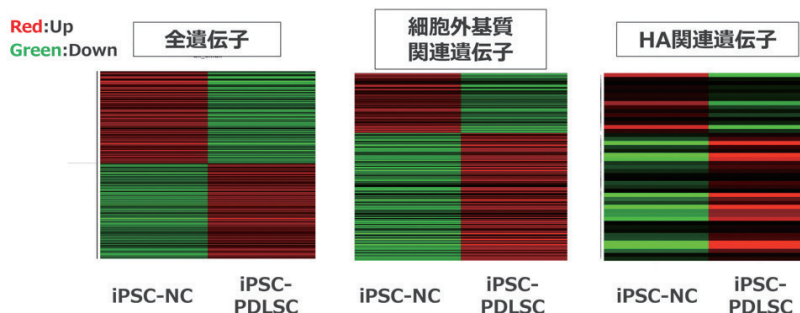
神経堤細胞から歯根膜幹細胞への分化過程の模倣

遊走後のNCは、PDLSCをはじめ様々な細胞へと分化したのち組織を形成する。したがって大部分のNCは、組織の発生後にNCとしての特徴を消失することとなるが、筆者らは発生後のPDLにもNC様の細胞が残存することを明らかにした⁴⁾。そこで筆者らは、PDL内のNCを賦活化しPDLSCへと分化誘導することで、PDLSC数の増加を通じて歯周組織の再生を誘導するという新しい観点からの歯周組織再生療法を着想した。しかしながら、ヒト成体内に存在するNC数は少数であることから、それらを正確に分取し研究に使用することは困難であった。そこで筆者らは、細胞源として人工多能性幹細胞 (iPSC) に着目した。iPSCは2006年に山中伸弥教授らにより樹立された幹細胞であり、複数の遺伝子の導入を通じて、分化した体細胞を胚性幹細胞様細胞へと転換させたものである⁵⁾。このiPSCの樹立により、多能性を有する幹細胞を大量に研究に使用することが可能となったことから、筆者らはヒトiPSCを神経堤細胞様細胞 (iPSC-NC) へと分化誘導し、さらにそれらを歯根膜幹細胞様細胞 (iPSC-PDLSC) へと分化誘導する方法を確立することができた⁶⁾ (図2)。この方法の確立により、パイオミメティクス、すなわちヒトにおいてPDLSCの発生に類似した過程を模倣することが可能となった。そこで

iPSC-NCとiPSC-PDLSCを用いてマイクロアレイ解析を行い、iPSC-NCがiPSC-PDLSCへと分化する際に重要な役割を果たす遺伝子群について解析を行った。興味深いことに、細胞外基質関連遺伝子において、iPSC-PDLSCで発現上昇するものが数多く認められ、さらにヒアルロン酸 (HA) 関連遺伝子でその傾向が顕著であった⁷⁾ (図3)。また、ヒト神経堤細胞様細胞株であるSK-N-SH細胞 (SKC) を歯根膜幹細胞様細胞 (SKC-PDLSC) へと分化誘導した結果、iPSCと同様にHA関連遺伝子の上昇を認めた。これらの結果から、NCからPDLSCへの分化には、HAが重要な役割を担うことが推察された。

低分子量ヒアルロン酸による神経堤細胞の賦活化

HAには様々な分子量のものが存在することが知られているが、 1×10^6 Da以下の低分子HAが間葉系幹細胞の分化を促進することが報告されている⁸⁾。そこで 8×10^5 DaのHA存在下にてSKCをSKC-PDLSCへと分化誘導したところ、HA非存在下と比較して*COL I*, *FBN*, *OPG*, *POSTN*といった歯根膜細胞関連遺伝子の発現上昇が確認された。興味深いことに、高分子量HA、すなわち 2×10^6 DaのHA存在下にて分化誘導したSKCでは、これらの遺伝子発現の上昇は確認されなかった。この結果は、全てのHAがNCからPDLSCへの分化を促進する訳ではなく、低分子量のHAが特異的に分化促進作用を示すことを示唆するものであった。HAから構成される足場材としてHAハイドロゲルが市販さ

図3 マイクロアレイ解析によるiPSC-NCとiPSC-PDLSC間の遺伝子発現パターンの比較⁷⁾

全遺伝子 (左) の比較では、iPSC-NCで発現量の高い遺伝子数とiPSC-PDLSCで発現量の高い遺伝子数は同程度であるが、細胞外基質関連遺伝子 (中央) およびHA関連遺伝子 (右) においては、iPSC-PDLSCで発現量の高い遺伝子数が増加している。赤：発現の上昇している遺伝子、緑：発現の減少している遺伝子。

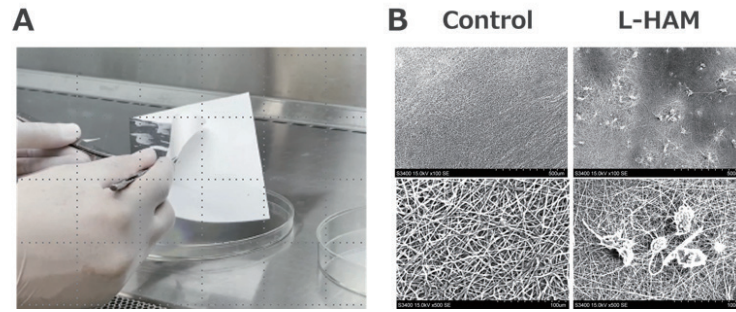


図4 L-HAMのキャラクターゼーション

A) L-HAM取り扱い時の写真。L-HAMの厚みは薄く、作業感覚は紙に類似する。B) Polycaprolactoneのみにて作製したコントロール膜（左）およびL-HAM（右）の走査型電子顕微鏡像。L-HAMではコントロールでは認められないHA様の粒子が認められる。上段：100倍，下段：500倍。

れているが、これらは様々な分子量のHAから構成されているため、NCに対してPDLSCへの分化誘導作用を示すかは不明確である。さらにハイドロゲルを生体へと移植した場合には、細胞分化を誘導する前に移植部位から流出してしまうことが予想される。そこで筆者らは、低分子量のHAのみで構成されるとともに移植部位に長期間保持される足場材の創出を計画した。まずナノファイバー電界紡糸システムを応用し、生体吸収材料であるPolycaprolactoneに 8×10^5 DaのHAを混合したものを繊維化した。次にそれらを製織することで、低分子量HA含有ナノファイバーメッシュ（L-HAM）を作製した⁷⁾（図4）。このL-HAMとSKCの共培養を行った結果、L-HAMに近接するSKCに細胞死は認められず、またカルチャーディッシュ全体においても、L-HAM非存在下で培養したSKCと同程度の生存が確認された。さらにL-HAM存在下でのSKCでは*COL 1*, *FBN*, *OPG*, *POSTN*といった歯根膜細胞関連遺伝子の発現上昇も確認された。これらの結果から、L-HAMは高い細胞親和性を示すことに加え、NCのPDLSC分化を誘導する可能性が示唆された。

おわりに

L-HAMの有効性はin vitroでは実証されているものの、in vivoでは実証されていないため、今後歯周組織傷害モデル動物への移植を行ったのち歯周組織再生能評価を行うことを計画している。また本研究のような、分子生物学的な知見を基盤とする新しい治療法や材料の開発に、引き続き尽力して行きたいと考えている。

参考文献

- 1) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. Science 260 : 920-926, 1993.
- 2) Vincent JF, Bogatyreva OA, Bogatyrev NR, Bowyer A, Pahl AK : Biomimetics: its practice and theory. J

R Soc Interface 3 : 471-482, 2006.

- 3) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S : Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet 364 : 149-155, 2004.
- 4) Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Monnouchi S, Wada N, Kono K, Yamamoto N, Koori K, Teramatsu Y, Akamine A : A multipotent clonal human periodontal ligament cell line with neural crest cell phenotypes promotes neurocytic differentiation, migration, and survival. J Cell Physiol 227 : 2040-2050, 2012.
- 5) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126 : 663-676, 2006.
- 6) Hamano S, Tomokiyo A, Hasegawa D, Yoshida S, Sugii H, Mitarai H, Fujino S, Wada N, Maeda H : Extracellular Matrix from Periodontal Ligament Cells Could Induce the Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells to Periodontal Ligament Stem Cell-Like Cells. Stem Cells Dev 27 : 100-111, 2018.
- 7) Alhasan MA, Tomokiyo A, Hamano S, Sugii H, Ono T, Ipposhi K, Yamashita K, Mardini B, Minowa F, Maeda H : Hyaluronic Acid Induction Promotes the Differentiation of Human Neural Crest-like Cells into Periodontal Ligament Stem-like Cells. Cells 12 : 2743, 2023.
- 8) Kim J, Park Y, Tae G, Lee KB, Hwang CM, Hwang SJ, Kim IS, Noh I, Sun K : Characterization of low-molecular-weight hyaluronic acid-based hydrogel and differential stem cell responses in the hydrogel microenvironments. J Biomed Mater Res A 88 : 967-975, 2009.