

主論文の要旨

**Secretomes from Bone Marrow-derived  
Mesenchymal Stem Cells  
Enhance Periodontal Tissue Regeneration**

〔 間葉系幹細胞培養上清由来成長因子は歯周組織再生を促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻  
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：古川 鋼一 教授)

河合 孝真

## 【緒言】

歯周病とは歯周組織での細菌性あるいは外傷性の炎症性反応が惹起され歯周組織が破壊されるもので、歯の喪失の主因となる疾患である。歯周組織再生療法として、歯周組織再生誘導法、骨移植、エナメルマトリックスタンパク質の移植、FGF-2 や PDGF-BB 等、成長因子の移植、幹細胞移植などが行われてきた。近年では移植細胞から種々の成長因子やケモカイン等のパラクライン因子が分泌され組織再生に深く寄与することが示唆されている。そこで本研究では、パラクライン因子を含む幹細胞培養上清由来液性因子の移植により、歯周組織が再生されることを確認し、そのメカニズムを検討した。

## 【対象と方法】

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs) は Lonza 社より購入したものを使用し、ラット骨髄由来間葉系幹細胞 (rMSCs) は、7 週齢オス Wistar/ST ラット大腿骨より採取した骨髄液から分離培養した。hMSCs を専用培地にて 70~80%コンフルエントになるまで培養し、その後 48 時間の無血清培養を行った。得られた培養上清から死細胞を除去したものを MSC-CM として以下の実験に供した。

MSC-CM 中の成長因子 (IGF-1、VEGF、TGF- $\beta$ 1、HGF、FGF-2、PDGF-BB、BMP-2、SDF-1) の定量解析を、Human Quantikine ELISA kit (R&D)を用いて行なった。Wound healing assay では rMSCs、ラット歯根膜細胞(rPDLSCs)を用い 0.9mm の wound field を形成し、細胞の遊走能、増殖能に対する MSC-CM の効果を評価した。Tube formation assay ではヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)と線維芽細胞との共培養系を使用し、血管新生専用培地 (BM) に MSC-CM、VEGF (10ng/ml)、MSC-CM+Anti-VEGF (10 $\mu$ g/ml) を添加し MSC-CM の血管新生に対する効果を評価した。形成された管腔を CD31 にて免疫組織学的染色を行い、染色された管腔を測定し長さ、分岐数を算出した。MSC-CM にて培養したラット MSCs の骨形成関連遺伝子 (*ALP*、*Osteocalcin*、*Runx2*)及び血管新生関連遺伝子(*VEGF*、*Ang1*、*Ang2*)発現を Real-time RT-PCR 法にて測定した。

48 匹の 10 週齢オス Wistar/ST ラット上顎第一大臼歯口蓋側に  $\phi$  1mm ラウンドバーにて歯周組織欠損を作製した。移植群を、①MSC-CM/アテロコラーゲン(MSC-CM 群)、②PBS/アテロコラーゲン (PBS 群)、③移植なし (Defect 群) の 3 群とし移植実験を行い、2、4 週後に組織学的手法により評価を行った。

## 【結果】

ELISA にて MSC-CM に含まれる成長因子を測定した結果、IGF-1、VEGF、HGF、TGF- $\beta$ 1 を種々の濃度で含有していた (Table 2)。Wound healing assay では、MSC-CM 群は無血清培地群に比べ有意に多い被覆細胞面積を認め、MSC-CM が rMSCs の遊走能、増殖能を上昇させることが明らかになった (Fig. 1)。Tube formation assay では、MSC-CM 群は BM 群と比べ有意に管腔形成が亢進していた。また、

MSC-CM+Anti-VEGF 群ではこれが減弱していた (Fig. 2)。MSC-CM で 48 時間培養した rMSCs における骨形成および血管新生関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法にて測定したところ、通常培地で培養した rMSCs と比べ *ALP*、*Osteocalcin*、*Runx-2*、*VEGF*、*Ang1*、*Ang2* の発現が有意に上昇していることが明らかになった (Fig. 3)。

ラット歯周組織欠損モデルを作製し、移植 2、4 週後に組織学的評価を行った。移植 2 週後の HE 染色像では MSC-CM 移植群で欠損内に新生骨を認めたものの PBS 群、Defect 群ではほぼ認められなかった (Fig. 4)。移植後 4 週では MSC-CM 移植群で欠損内にセメント質を含めた良好な歯周組織再生が確認されたが、PBS 群、Defect 群では一部で新生骨の再生を除き歯周組織の再生は認められなかった (Fig. 5)。

移植後 2 週の免疫組織学的染色では MSC-CM 移植群で血管内皮細胞マーカーである CD31、幹細胞マーカーである CD105、VEGF レセプター 2 のマーカーである Flk-1 の発現の増加を認めた (Fig. 6)。

#### 【考察】

本研究の結果より、MSC-CM が血管新生 (Fig. 2, 6) および幹細胞の遊走 (Fig. 1, 6) を促す事によって歯周組織再生が促進されることが示唆された (Fig. 4, 5)。

Tube formation assay において MSC-CM は HUVEC の管腔形成を促進させたが、MSC-CM に抗 VEGF 抗体を添加したものではこの効果が減弱した。また、移植後 2 週の免疫組織学的染色では MSC-CM 移植群で Flk-1 の発現の増加を認めた事から、MSC-CM が血管新生を促す効果の主体は VEGF であると考えられる。過去の文献では HGF は VEGF の効果を増強するという報告や、TGF- $\beta$ 1 は新生血管の血管周皮細胞安定化に重要な役割があるという報告がある。また、内在性幹細胞や移植された幹細胞の血管周皮細胞への分化が報告されていることから、MSC-CM は VEGF 等によって直接的に血管新生を促進するだけでなく、移植部位への幹細胞遊走を促進し、血管周皮細胞の増殖、遊走を促進することによって間接的に血管新生を促進していることが考えられる。また、IGF-1 は、幹細胞の骨芽細胞への分化や、PI3K 経路を通じて幹細胞の遊走に関与していることが知られている。

以上のことより MSC-CM に含まれるこれら複数の成長因子が歯周組織再生の複数の過程に作用し、歯周組織再生を促した可能性が本研究より示唆された。

#### 【結語】

幹細胞由来液性因子の移植により歯周組織の再生が確認された。またこの効果には血管新生および内在性幹細胞の遊走が関与している可能性が示唆された。