

依 頼 論 文

◆特集：臨床イノベーションのための若手研究者の挑戦：治療，検査法の新たな展開

間葉系幹細胞を用いてインプラント周囲における上皮封鎖性は改善出来るか？

熱田 生

The effect of Systemically-administered Mesenchymal Stem Cells with Peri-implant Mucosa

Ikiru Atsuta, DDS, PhD

抄 録

歯科用チタンインプラントにおいて、歯肉貫通部での上皮封鎖は、細菌などの侵入を防ぐなどの働きから治療成功への重要な鍵と考えられている。しかし同部位における低封鎖性も報告されており、特に長期症例で生じるトラブルを防ぐためその改善が望まれている。一方近年になって、間葉系幹細胞はその高い増殖能と幅広い分化能から再生治療における細胞の供給源となる一方、炎症を調整する制御能から自己免疫疾患などの治療法として歯科領域でも注目されている。本研究ではこの幹細胞をインプラント周囲に応用し、上皮封鎖性の向上に有効かを明らかにする。

和文キーワード

インプラント，間葉系幹細胞，上皮細胞，上皮封鎖性，細胞治療

I. 背 景

歯科インプラント治療は歯牙欠損患者に対する最も有効な補綴治療の選択肢となっている。1960年代にBrånemark博士らによって「オッセオインテグレーション」というチタン-骨の結合に関する概念が提唱されて以来¹⁾，多くの研究が重ねられ現在のインプラント治療は確固たる地位を獲得している。しかし長期経過症例に目を向けたとき依然解決されるべき問題が残されているようにも思える。

その中で最も注目すべきはインプラント周囲軟組織の存在であろう。インプラント周囲における軟組織は天然歯と類似した封鎖構造を有するにも関わらず明らかに脆弱である^{2,3)}。インプラント周囲粘膜は感染リスクの高さに加え、生じた炎症は天然歯周囲と比較して容易に骨へと波及しインプラントの支持骨を吸収させる⁴⁾。そのため細菌性の感染に対する局所防御の改善こそが周囲炎や粘膜退縮を防止し長期にわたるインプラント治療の成功に貢献出来るかもしれない。

今までもインプラント周囲における軟組織封鎖性の向上を目指した研究は数多くなされてきた⁵⁻⁷⁾。ただコスト面や安全性の点で臨床応用まで多少の距離があるのも事

実である。そこで本実験では、間葉系幹細胞 (MSC) によりインプラント治療の長期機能維持を目指すこととした。

MSCはオッセオインテグレーションが提唱された時期とほぼ同じ1960年代に同定された細胞で、優れた多分化能と増殖能を有する幹細胞の一種である⁸⁾。特に分化の幅は広く、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞など様々であり⁹⁾，組織再生に有効な選択肢である¹⁰⁾。2000年代になると顎骨骨折や歯周病由来の骨欠損、顎補綴時など口腔領域での再生治療として用いられるようになった。

現在では、幹細胞の新たな投与効果として免疫細胞の制御能が明らかとなった。これによりリウマチや膠原病など自己免疫疾患、大腸性ポリープなどの炎症、さらには乳癌など悪性腫瘍の治療にも効果的とされている¹¹⁻¹³⁾。このようなMSCの特徴的な働きはインプラント周囲軟組織の封鎖性向上にも活用出来ないものであろうか。以下の実験でその有効性を明らかにする。

II. 方 法

1) 動物実験：全身投与されるMSCは4週齢の雄性Wistarラット骨髄から採取された。また6週齢実験モデルは、上顎右側第一臼歯を抜歯後、即時に純チタン製イ

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座インプラント・義歯補綴科

Section of Implant and Rehabilitative Dentistry, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science Kyushu University

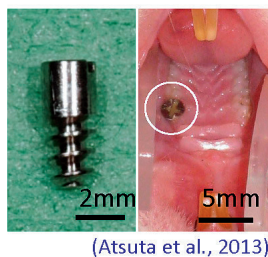


図1 Photograph of the experimental implants (left panel). Photograph of the implant in the rat oral cavity (right panel).
実験用インプラント (左) およびインプラントモデルラット口腔内写真 (右).

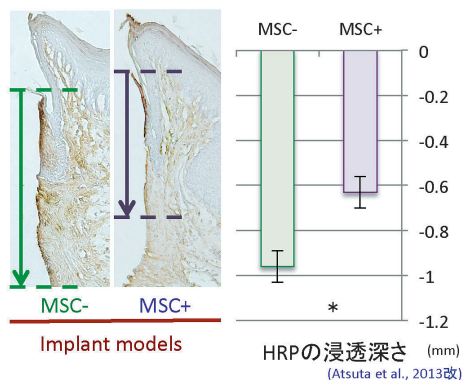


図3 Light micrographs of the PIE around the experimental implants with MSC injection after HRP penetration. In the case of MSC injected group, a strong DAB reaction based on HRP was only seen in the upper PIE. Bar = 100 μ m. * P <0.05 versus Con.
HRP 浸透実験. 歯肉溝またはインプラント周囲溝へ滴下された HRP は無処理群では結合組織付近まで, MSC 処理群では歯冠側に限局して観察された. (図中下向き矢印: 上部から滴下された HRP の浸透深さを示す).

ンプラント (図1) を埋入され, その24時間後に MSC が尾静脈より全身投与された. そして埋入4週後に軟組織の免疫組織化学的に観察した. さらにその封鎖性は西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP; 分子量約41,000) をインプラント周囲溝に30分間持続投与し, その浸透深さを組織上で観察することで評価した. また図4で示す実験では GFP 遺伝子導入ラットを用いた.

2) 培養実験: 出生4日齢の Wistar ラット口腔粘膜より採取した上皮組織から上皮細胞 (OECs) を単離した. その後3日間だけ単独で培養し, 同数の MSC など各種指定条件で共培養した. そして OECs が MSC から受ける影響についてアポトーシス (Apoptosis marker/FACs), 細胞増殖能 (Brd-U assay), 接着能 (Adhesion assay) などで評価した.

III. 結 果

1) 動物実験: 埋入4週後のモデルで, インプラント-周囲上皮界面における接着の指標としてラミニン-332の局在を観察した (図2). 背景でも記した通りインプラント周囲上皮の接着構造は根尖側2/3に限局していたが, MSC 投与によりインプラント体界面全体に観察された. また上皮封鎖能を直接評価する HRP の浸漬実験でも, MSC 投与群における HRP の侵入阻害能が上昇していた (図3).

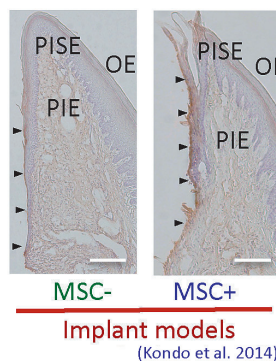


図2 Ln-332 distribution during the formation of peri-implant epithelium (PIE) following MSC injection. After 4 weeks, the PIE was completely formed in both groups. Ln was scarcely expressed along the upper portion of the implant-PIE interface. Ln was weakly expressed along the BM. Hematoxylin staining. Bar = 100 μ m.
ラミニン-332の局在. ラミニンは天然歯および MSC 処理群においては上皮組織界面全体に発現を認めたが, 無処理インプラントでは根尖側1/3に限局した局在を観察した. (ES: エナメル質が存在していたスペース, JE: 付着上皮, OSE: 歯肉溝上皮, IS: インプラントの存在していたスペース, PIE: インプラント周囲上皮, PISE: インプラント周囲溝上皮, OE: 口腔上皮).

MSC 全身投与によるインプラント周囲上皮の封鎖性改善は, 投与された GFP 陽性 MSC がインプラント周囲上皮と結合組織界面付近に集積することで説明出来る (図4). ただしこの集積も1週間を過ぎると観察されない.

2) 培養実験: OECs の単独培養 (Cont), MSC との共培養 (Co-cul), さらに共培養時に Trans-well® を使用し, MSC との細胞接触を遮断して共培養 (Trans-well) の3群を作製した. Cont 群と比較して Trans-well 群では OECs の生存性が上昇した. また増殖性および接着性でも有意な増加が認められた (図5).

IV. 考 察

1) 動物実験: インプラントと周囲上皮界面におけるラミニン-332の発現量増加や HRP の侵入抑制を示した実験結果は, MSC の全身投与がインプラント周囲での封鎖性を局所的に上昇させたことを示す. この機序として MSC の集積がある (図3). 実際, 腫瘍や創傷部位への MSC 集積に加えサイトカインなどの分泌による治癒促進効果が報告されている^{14, 15)}. 本研究でもインプラント埋入という行為が炎症を惹起させ, MSC の集積を促したのかもしれない. ただしその集積が1週間と比較的短期間であるにも関わらず, 埋入4週間後でも上皮封鎖性を高く維持していた. MSC が消失してもなぜ効果は持続したのだろうか?

2) 一つの可能性として投与 MSC が宿主側の MSC の性質を変えた事である¹⁶⁾. 病的な状況下にある MSC は病態を悪化させる病的性質を有する事も知られており¹⁷⁾, 本研究のように全身的な MSC 投与はインプラント体周囲の病的な MSC に対し炎症抑制や治癒促進を促す一方, 上皮細胞には MSC が発現するサイトカインの効果で接着性向上などの直接的影響を及ぼしているのかもしれない¹⁸⁾.

V. 結 論

全身投与された MSC はインプラント周囲の上皮細胞に対して直接作用し, 封鎖性を向上することが示唆され

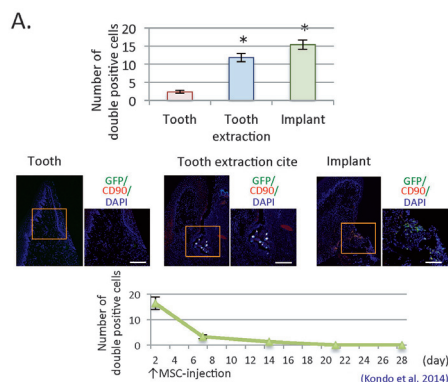


図 4 Accumulation of GFP-transgenic injected MSCs after tooth extraction or implantation. Around the experimental implants, injected MSCs selectively accumulated at the extraction site or peri-implant tissue. However, no double-positive MSCs (GFP⁺/CD90⁺) were observed in gingival mucosa. Bar = 100 μ m.

全身投与された MSC の集積。GFP で緑に蛍光ラベリングされた MSC はインプラント埋入一日後、またはそれに相当する日程で尾静脈より投与された。結果としてインプラント周囲上皮組織と結合組織の境界付近に局限して MSC が GFP および MSC マーカー CD90 陽性細胞として観察された。またこの集積は一時的で 1 週間後にはほぼ認められなくなった。

た。このような MSC による細胞治療はインプラント周囲組織における外部刺激への抵抗性を保ち、インプラント体の口腔内での長期安定化に貢献するかもしれない。

文 献

- Brånemark PI, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lundkvist S, Rockler B. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials* 1983; 4: 25-28.
- Atsuta I, Yamaza T, Yoshinari M, Goto T, Kido MA, Kagiya T, et al. Ultrastructural localization of laminin-5 (gamma2 chain) in the rat peri-implant oral mucosa around a titanium-dental implant by immuno-electron microscopy. *Biomaterials* 2005; 26: 6280-6287.
- Ikeda H, Yamaza T, Yoshinari M, Ohsaki Y, Ayukawa Y, Kido MA, et al. Ultrastructural and immunoelectron microscopic studies of the peri-implant epithelium-implant (Ti-6Al-4V) interface of rat maxilla. *Journal of periodontology* 2000; 71: 961-973.
- Schou S, Holmstrup P, Stoltze K, Hjorting-Hansen E, Kornman KS. Ligature-induced marginal inflammation around osseointegrated implants and ankylosed teeth. *Clinical oral implants research* 1993; 4: 12-22.
- Atsuta I, Ayukawa Y, Furuhashi A, Ogino Y, Moriyama Y, Tsukiyama Y, et al. In Vivo and In Vitro Studies of Epithelial Cell Behavior around Titanium Implants with Machined and Rough Surfaces. *Clinical implant dentistry and related research* 2013.
- Atsuta I, Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, Jinno Y, Koyano K. Evaluations of epithelial sealing and peri-implant epithelial down-growth around "step-type" implants. *Clinical oral implants research* 2012; 23: 459-466.
- Okawachi H, Ayukawa Y, Atsuta I, Furuhashi A, Sakaguchi M, Yamane K, et al. Effect of titanium surface calcium and magnesium on adhesive activity of epithelial-like cells and fibroblasts. *Biointerphases* 2012; 7: 27.
- Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research* 1961; 14: 213-222.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.

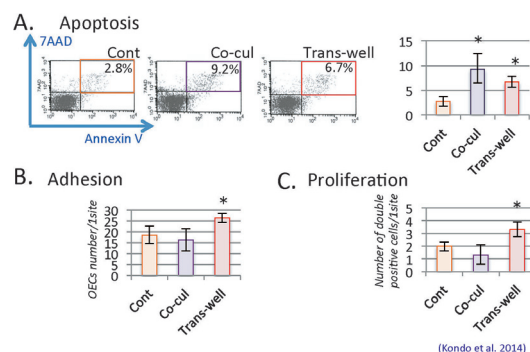


図 5 Relationship between MSCs and OECs in co-culture (A) Apoptosis analysis by FACS. Apoptosis of OECs was detected and quantified by FACS after annexin V and 7AAD staining. (B) The rate of adhesion of OECs as determined by adhesion assay. (C) Rate of proliferation as determined by Brd-U assay. Each data point represents the mean $\pm$ SD of two parallel experiments. *; $P < 0.05$ versus Cont.

MSC が上皮細胞に与える影響。上皮細胞の単独培養 (Cont), MSC と上皮細胞の直接的共培養 (Co-cul), Trans-well[®] を使用し MSC と上皮細胞との直接的接触を阻害した間接的共培養 (Trans-well)。結果, Co-cul 群では上皮細胞のアポトーシスが促進されるが, Trans-well 群では Cont よりも有意に接着性, 増殖性, 生存性の上昇が認め MSC 上皮活性の促進効果が示された。

- Adzick NS, Longaker MT. Scarless fetal healing. Therapeutic implications. *Annals of surgery* 1992; 215: 3-7.
- Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, et al. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell stem cell* 2012; 10: 544-555.
- Sun L, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Hou Y, Zhao S, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2009; 27: 1421-1432.
- Wang L, Zhao Y, Liu Y, Akiyama K, Chen C, Qu C, et al. IFN-gamma and TNF-alpha Synergistically Induce Mesenchymal Stem Cell Impairment and Tumorigenesis via NFkappaB Signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2013.
- Lyngbaek S, Ripa RS, Haack-Sorensen M, Cortsen A, Kragh L, Andersen CB, et al. Serial in vivo imaging of the porcine heart after percutaneous, intramyocardially injected 111In-labeled human mesenchymal stromal cells. *The international journal of cardiovascular imaging* 2010; 26: 273-284.
- Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells* 2009; 27: 2624-2635.
- Kozorovitskiy Y, Gould E. Stem cell fusion in the brain. *Nature cell biology* 2003; 5: 952-954.
- Atsuta I, Liu S, Miura Y, Akiyama K, Chen C, An Y, et al. Mesenchymal stem cells inhibit multiple myeloma cells via the Fas/Fas ligand pathway. *Stem cell research & therapy* 2013; 4:111.
- Chen WL, Chang HW, Hu FR. In vivo confocal microscopic evaluation of corneal wound healing after epi-LASIK. *Investigative ophthalmology & visual science* 2008; 49: 2416-2423.

著者連絡先: 熱田 生

〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1

Tel: 092-642-6441

Fax: 092-642-6380

E-mail: atyuta@dent.kyushu-u.ac.jp