

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11140

研究課題名(和文)新規ハイブリッド担体を用いた口腔粘膜由来幹細胞による歯髄と象牙質複合体の再生

研究課題名(英文) Regeneration of dental pulp/dentine composite by oral mucosal cells in novel hybrid scaffold

研究代表者

柿木 栄幸 (KAKIGI, Hideyuki)

大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)

研究者番号：40642830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの口腔粘膜細胞をDexamethasoneと-Glycerophosphateを添加、培養した結果、石灰化物が沈着した。骨髄細胞に比べて微量であったが、口腔粘膜細胞が硬組織形成性の細胞に脱分化した可能性が示唆された。口腔粘膜細胞の増殖と硬組織形成性細胞への再分化を誘導する因子のスクリーニングを行い、シアノコバラミンに効果がある結果が得られた。

口腔粘膜細胞を播種したアルギン酸スポンジを円筒状の多孔質ハイドロキシアパタイト担体に挿入してラット背部に皮下埋入した。この二相性担体に極めて微量のオステオカルシンが検出され、骨の形成が示唆された。粘膜下結合組織細胞が分化した可能性も考えられる。

研究成果の概要(英文)： Addition of dexamethasone in culture medium of rat oral mucosal cells obtained induced small amount of calcified nodule deposition. The quantity was too small in comparison with bone marrow cells. This result suggested the possibility that oral mucosal cells might dedifferentiate to hard tissue forming cells. The factor which induced the proliferation of oral mucosa cells and those re-differentiation to hard tissue forming cells was examined. And cyanocobalamin revealed an effect.

Oral mucosa cells with seeding of a sponge made from alginic acid inserted in the cylindrical porous hydroxyapatite scaffold with a hollow center. In the subcutaneously implanted biphasic scaffold, a small amount of osteocalcin was detected. Submucosal connective tissue cells might differentiate to osteogenic cells.

研究分野：歯内治療

キーワード：口腔粘膜細胞 Dexamethasone -Glycerophosphate 二相性担体 In vivo In vitro

1. 研究開始当初の背景

整形外科領域の臨床では骨の再生のために必要な幹細胞を腸骨から採取することが多い。しかしながら、歯科領域で歯髄・象牙質複合体を再生するために腸骨から幹細胞を得ることは問題がある。すなわち、腸骨からの骨髄幹細胞の採取には身体への大きな侵襲を伴う。そのため、歯あるいは歯髄の再生に腸骨からの幹細胞採取が受け入れられるとは考えにくい。したがって、歯髄・象牙質複合体再生のための幹細胞の採取源を確立する必要性は大である。

歯の硬組織あるいは歯髄の再生では口腔内由来の細胞を用いるのが妥当である。多くの研究では乳歯や便宜抜髄された歯髄から幹細胞を得る試みが主であった。また、これまでに *in vitro* で歯胚から歯に成長させる研究が相次いでいるが、臨床での応用に際しては歯胚の採取も摘出という外科的侵襲を幼少期に強いることになる。

外胚葉系組織のエナメル質と間葉系組織である象牙質あるいは歯髄の再生では上皮細胞と間葉細胞の混合培養が必要である。しかし、それは困難で、それらを単独で培養した後に組み合わせて歯を再生することも実現していない。また、歯の再生能力を有する歯胚上皮細胞の培養も容易ではない。

一方、最近、再生歯髄の臨床応用が報告されており、また、iPS細胞による歯の再生への応用も期待されている。それでも、再生した歯の臨床応用はまだ遠く、さらに多くの研究の積み重ねを必要とする現状で、現在においても歯の再生を臨床に応用するに至っていない。

このような背景で今回の実験を計画、実施した。

2. 研究の目的

象牙質の再生には一般に象牙芽細胞に分化する幹細胞が必要であるが、象牙芽細胞に分化する幹細胞は言うまでもなく、骨芽細胞を得るための幹細胞を得る手段さえ、歯科領域では非常に少ない。また、極めて多数の幹細胞が骨を再生するために必要である。

幹細胞の採取源を末梢血中あるいは口腔粘膜に求めて、歯科領域でも容易に幹細胞を分離し、*in vitro* で速やかに骨芽細胞あるいは象牙芽細胞の増殖を実現させて効果的な骨あるいは象牙質の再生を誘導し、最終的には歯の再生を目的とした。

医科での骨再生には腸骨から骨髄細胞が採取されている。しかしながら、腸骨からの骨髄細胞の採取は侵襲が大で、歯科保存領域では困難である。骨髄由来幹細胞を得難いことが歯の再生の臨床応用を遅らせる原因の一つと考える。そこで、幹細胞が容易に得られるセルソースが必要であり、口腔粘膜をセルソースとして口腔粘膜から分離した細胞を幹細胞に効率的に再分化させることが可

能にする手段を求めて、その方法を確立すること、そして、ホルマリン処理ポリビニルアルコール (PVF) スポンジあるいは生分解性アルギン酸スポンジを多孔質ハイドロキシアパタイト (HA) 中空部に挿入した新規ハイブリッド担体を用いてその外層部に象牙質、内層部に歯髄を含む再生歯髄・象牙質複合体を、さらに、その外層部表面に結合組織を再生して歯根膜組織を再現し、臨床応用の可能な歯髄・象牙質複合体を完成させることを目的とした。また、口腔粘膜細胞由来幹細胞の分化・増殖促進作用を有する必須アミノ酸をスクリーニングで決定して幹細胞増殖の促進を達成することを合わせて目的とした。

3. 研究の方法

(1) ハイブリッド担体の作製

直径 40mm のステンレス製円筒にアルギン酸ゲルを流し込んで凍結し、真空乾燥によって連通性のある 300~500 μ m の径の気孔を有する円柱状のスポンジを作製した。

円筒状多孔質ハイドロキシアパタイトの中空部にアルギン酸ゲルから作製した円柱状アルギン酸スポンジを挿入してハイブリッド担体し、また、市販のシート状 PVF スポンジを円筒形に切り抜いて多孔質ハイドロキシアパタイト中空部に挿入してハイブリッド担体とした。

(2) 骨髄細胞および口腔粘膜由来細胞

Fischer 344 ラット後肢骨髄から骨髄細胞を得た。また、口蓋粘膜および頬粘膜を切除し、その粘膜片 (3×3mm) をトリプシン処理して細胞を分散させ、さらに培養・増殖させた。

(3) 分化促進因子のスクリーニング

少数の幹細胞からの骨形成を計るため、幹細胞の増殖と分化を促進する因子としてシアノコバラミン、N-アセチル-L-システイン、トレオニン、そして、トランスフェリンを選択し、骨髄細胞の培養液に添加して nodule 形成量を比較した。分析はカルシウム量の定量で行った。

(4) *In vitro* での口腔粘膜由来細胞による nodule 形成

口腔由来の幹細胞を粘膜から得る可能性を探り、その増殖と分化を促進させる因子として有効と判断されたシアノコバラミンとシステインを添加した口腔粘膜由来細胞の培養を行った。

(5) *In vivo* でのハイブリッド担体内骨形成

中空を有する円筒状の形態の多孔質ハイドロキシアパタイト担体にアルギン酸スポンジあるいは PVF スポンジを挿入したハイブリッド担体の中空部スポンジに口腔粘膜細胞を播種し、ラット皮下に埋入して硬組織形成に関わる *in vivo* の実験を行って、オステオカルシンを定量した。

4. 研究成果

骨髄細胞および口腔粘膜由来細胞が速やかに幹細胞に分化・増殖し、それらが硬組織形成性細胞あるいは骨芽細胞に再分化する効果を示す因子のスクリーニングの予備試験として、*in vitro*の骨形成実験を6-ウェル培養プレートでデキサメタゾン、さらに、 β -グリセロフォスフェイトとビタミンCを添加した口腔粘膜細胞の培養を行った。対象として骨髄細胞を用いた。その結果、骨髄細胞と比較すると極めて微量であったが口腔粘膜由来細胞の培養で石灰化物の沈着が認められた。

*In vitro*で硬組織形成を促進するための因子としてシアノコバラミン、N-アセチル-L-システイン、トレオニンそしてトランスフェリンを選択し、ラット大腿骨骨髄細胞に対しての効果を調べた。硬組織誘導因子としてのデキサメタゾン、さらに、 β -グリセロフォスフェイトとビタミンCとともにシアノコバラミン、N-アセチル-L-システイン、トレオニンあるいはトランスフェリンをそれぞれ添加してラット大腿骨骨髄細胞を培養した。その結果、シアノコバラミンおよびN-アセチル-L-システインに培養プレートへの石灰化物の沈着が認められ、これらに効果があると認められた。

シアノコバラミンおよびN-アセチル-L-システインが*in vitro*でラット大腿骨骨髄細胞による石灰化物形成に効果を示すことを確認した上で、ラットから採取した口腔粘膜細胞の培養液中にシアノコバラミン、N-アセチル-L-システイン、トレオニン、あるいは、トランスフェリンを個々に添加し、培養した。その結果、選択したシアノコバラミン、N-アセチル-L-システイン、トレオニン、そして、トランスフェリンのなかで、シアノコバラミンとN-アセチル-L-システインを添加したウェルに少量の石灰化物の沈着が見られたことから、N-アセチル-L-システインが口腔粘膜細胞の増殖促進と硬組織形成性細胞への脱分化に有効であることが示唆された。さらに、口腔粘膜細胞の培養液中にN-アセチル-L-システインの10 ng/wellから1000 ng/wellまで濃度依存的に石灰化物が形成された。口腔粘膜細胞の増殖の促進と硬組織形成性細胞への脱分化にN-アセチル-L-システインが有効に働く可能性が示された。

ラット口腔粘膜細胞の採取と培養・増殖の手法はこの一連の実験で確立した。

しかしながら、このような因子を添加しても粘膜由来細胞の増殖には長い培養期間が必要であった。スクリーニングを行ったN-アセチル-L-システインは硬組織形成に関与する可能性は認められたが顕著な硬組織の形成ではなかった。

また、円筒状の多孔質ハイドロキシアパタイト担体の中空部にアルギン酸スポンジまたはPVFスポンジを挿入したハイブリッド担体で中空部のスポンジに口腔粘膜細胞を播種してラットの皮下に埋入した*in vivo*の実験

を行った。アルギン酸スポンジあるいはPVFスポンジに骨髄細胞を播種したポジティブコントロールとしてのハイブリッド担体と口腔粘膜細胞を播種したハイブリッド担体には、細胞を播種しないハイブリッド担体と比べてオステオカルシン量に有意差が認められた。しかしながら、口腔粘膜細胞を播種した担体に検出されたオステオカルシンは極めて微量であった。

この結果は口腔粘膜由来の細胞が骨形成に関わったことを示唆している。外胚葉系である口腔粘膜細胞による骨形成に生体内で関与した生理活性物質の解明が必要である。また、粘膜細胞とともに粘膜下結合組織細胞が混在し、皮下埋入した担体内で分化して骨形成を生じた可能性も否定できないと考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

- ① Masataka Yoshikawa, Hideyuki Kakigi, Ayano Miyamoto, Sadaomi Sugimoto, Keisuke Nakai, Hideaki Ikenaga, Takeshi Inamoto, Hiroshi Maeda, *In Vivo Estimation of Osteogenesis by Bone Marrow Cells in a Bi-Phasic Scaffold and in Each of Its Components*, Journal of Biomedical Science and Engineering, 査読有, Vol.9, No.11, 2016, pp. 501-514. doi.org/10.4236/jbise.2016.911045
- ② Masataka Yoshikawa, Hideyuki Kakigi, Hiroshi Maeda, Ikuo Nishikawa, Hideaki Ikenaga, Takeshi Inamoto, Norimasa Tsuji, *Bone Formation in a Scaffold Composed of Cylindrical Hydroxyapatite and Tryptophan- or Lysine-Coated Sponge in Vivo*, Journal of Biomedical Science and Engineering, 査読有, Vol. 8, No. 6, 2015, pp. 389-398. doi.org/10.4236/jbise.2015.86037

[学会発表] (計 3件)

- ① Masataka Yoshikawa, Hideyuki Kakigi, Norimasa Tsuji, Takayoshi Yabuuchi, Hiroshi Maeda, *Osteogenesis by bone marrow cells in a bi-phasic scaffold consisting of circular cylindrical porous hydroxyapatite and acetalized polyvinyl alcohol sponge *in vivo**, 4th International Conference on Competitive Materials and Technology Processes, 2016年10月3~7日.
- ② 宮本綾乃, 杉本貞臣, 中井啓介, 前田博史, 好川正孝, 辻 則正, 藪内崇督, *骨髄細胞による骨形成へのデキストラランコーティ*

ングの効果、日本歯科保存学会 2015年度
秋季学術大会（第143 回）、2015年11月12
～13日.

- ③ Masataka Yoshikawa, Hideyuki Kakigi,
Norimasa Tsuji, Takayoshi Yabuuchi,
Hiroshi Maeda, *In vivo* bone formation by
bone marrow cells in bi-phasic scaffold
consisting of a porous hydroxyapatite
with a sponge、International Bone
-Tissue-Engineering Congress 2015、2015
年10月8日～10日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿木 栄幸 (KAKIGI, Hideyuki)
大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)
研究者番号：40642830

(2) 研究分担者

前田 博史 (MAEDA, Hiroshi)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：00274001

好川 正孝 (YOSHIKAWA, Masataka)
大阪歯科大学・歯学部・客員准教授
研究者番号：70148451