

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20542

研究課題名(和文) 歯髄疾患の治療を目指した神経分化誘導羊膜上歯髄由来細胞シートの作成

研究課題名(英文) Making of a neurodifferentiation amnion sheet of dental pulp cell aiming at treatment of the dental pulp disease

研究代表者

本城 賢一(honjo, kenichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：00756877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生物学的材料として様々な医療領域分野で注目されている羊膜を基質とした羊膜上歯髄由来細胞シートを応用し、歯髄疾患の新たな治療法の開発を目的としている。
羊膜上に歯髄由来細胞を培養し、神経細胞へと分化誘導した羊膜上培養歯髄由来細胞シートを作成した。作成した培養シートを約20週齢 Fischer 344ヌードラット(雄)の歯髄を露出させた臼歯へ移植した。約4週間後、顎骨ごと採取。組織学的・免疫組織学的検討を行ったところ移植した培養シートの局在を認めしたが、周囲組織の形態的变化は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Making of a neurodifferentiation amnion sheet of dental pulp cell and aiming for the development of the new treatment for dental pulp disease. I cultured dental pulp cell on the amnion and differentiated to nerve it. I transplanted a culture sheet to the molar tooth of approximately 20 weeks of age Fischer 344 nude rats (male). Approximately four weeks later, performing examination of the histologic immunohistology, accepted the local existence of the culture sheet. But the morphological change of the organization did not accept it.

研究分野：再生医療

キーワード：歯髄由来細胞 羊膜 培養細胞シート 神経分化誘導

1. 研究開始当初の背景

歯の健康は QOL 向上のために必須であり、歯の寿命を延長させることは歯科臨床において大きな課題の一つである。現在の歯科臨床において、齲蝕や外傷によって生じた歯髄炎の治療は、原因である炎症性歯髄組織を機械的に除去、人工物を充填し、再感染を防ぐ治療方法が行われている。しかしながら、それだけでは口腔内からの細菌の微小漏洩を完全に防ぐことができず、また歯髄炎の進行により失われた歯髄組織の再生は期待できない。歯髄炎症例に対して新たな再生医療的治療法の確立が期待されている。そこで、研究代表者は炎症性歯髄組織を機械的に除去した部位に、生物学的材料として、様々な医療領域分野で注目されている羊膜を基質とし、神経分化誘導を行った羊膜上培養歯髓由来細胞シートを用いることに着想した。

羊膜は、胎盤の最表層を覆う薄膜で、免疫学的に胎児を母体から隔離する特異な機序が存在する。また分娩後に胎盤よりほぼ無菌的に採取され、胎盤は分娩後に通常廃棄される組織で、倫理的、技術的に入手が容易である。基底膜において型コラーゲンおよびラミニンの発現がみられるなど、細胞の培養基質として妥当な組織であると考えられる。さらには血管成分を含まないため、移植後の免疫反応を軽減することが可能である。各種細胞の培養基底膜として適し、皮膚移植、腔形成術、腹部手術の際の癒着・癒痕防止、皮膚熱傷後などの創部の被覆による治癒促進、さらには眼表面の再建などの手術療法に用いる報告があり、その移植材料としてだけでなく、培養基質としても高い有用性・有効性が注目されている。また、歯髄組織は、歯の内部に位置、外部からの有害刺激が少ないことや、従来、抜歯後に医療廃棄物として処理されていた智歯などから比較的簡便に入手が可能であること、また、幹細胞が多く含まれ、多分化能を有していることから、細胞ソースとして有用であると考えられる。

これまでに羊膜の有用性に注目し、この羊膜を細胞培養基質として用いた研究を行ってきた。すでに当大学医学倫理審査委員会の許可 (RBMR-R-19) を得、羊膜を基質とした培養口腔粘膜上皮細胞シートの作成方法を確立した。さらに口腔粘膜上皮欠損患者に対しての臨床応用を行い、拒絶反応等の異常なく良好な結果を得た。また、この細胞培養系を歯髓由来細胞の培養に応用し羊膜上培養歯髓由来細胞シートを作成することに成功している。

これら研究成果に加え、臨床応用可能な神経分化誘導させた羊膜上培養歯髓由来細胞シート作成の最適化、また羊膜独自の有用性を併せ持つ新たな培養シートとしての検討を加えたい。

2. 研究の目的

今回、齲蝕や外傷などの外来刺激により惹

起された歯髄炎の新たな再生医療的治療法の開発を目標とし、神経分化誘導を行った羊膜上培養歯髓由来細胞シートを作成、最適化する。さらに人為的に作製した歯髄炎モデル実験動物へ同細胞シートを移植し組織学的・免疫組織学的検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 羊膜の入手および保存方法

安定した羊膜の供給が得る為に、特定非営利活動法人・再生医療支援機構・近畿羊膜バンク (京都) からの研究用羊膜の譲渡・供給 (平成 21 年 3 月 16 日付承認、受付番号: 09-03) を受けた。抗菌薬を含む洗浄液で洗浄した後、保存液中に浸した状態で -80 の冷凍庫で保存した。採取後から保存までの過程は、すべてクリーンベンチ内で清潔操作にて行った。なお、羊膜は採取から保存まで清潔操作で行っており無菌的と考えられる。なぜなら 3 ヶ月間凍結保存した羊膜からは細菌・真菌は検出されなかったためである。

(2) 歯髓の採取、培養および羊膜上での歯髓由来細胞の培養

当大学附属病院歯科所属の歯科医師により、抜歯術予定患者から歯髓を採取した。具体的には、智歯や歯科矯正治療の便宜抜歯等により抜去された歯牙を抗菌薬添加 PBS(-) にて洗浄後、セメントエナメル境で切断、歯髓組織のみを無菌的に採取し、培養液 (10% FBS/DMEM 抗菌薬添加) 中にて初代培養後、3~4 代の継代培養を行ったものを歯髓由来細胞とした。羊膜上にこれら歯髓由来細胞を播種・培養、羊膜上培養歯髓由来細胞シートを作成した。10% FBS/DMEM 抗菌薬添加培養液を用いて培養した培養歯髓由来細胞シートを Control 群とし、神経分化誘導培地を用い培養した同細胞シートを神経分化誘導群とした。

(3) 羊膜上培養歯髓由来細胞シートの組織学的および免疫組織学的検討

作成した培養シートについて組織学的・免疫組織学的検討を行った。

・組織学的検討...ヘマトキシリン-エオジン染色を行い組織学的に検討した。

・免疫組織学的検討...間葉系細胞マーカー (Vimentin)、細胞増殖マーカー (Ki-67)、神経細胞マーカー (-Tubulin、MAP-2) の局在について検討した。

(4) 羊膜上培養歯髓由来細胞シートの移植

作成した培養シートは、実験動物 (Fischer 344 ヌードラット 雄) へ移植し、組織学的・免疫学的検討を行った。移植方法は、実験動物の臼歯の咬合面を削合し歯髓露出した歯髓炎モデルへ移植した。具体的に、神経細胞へと分化した羊膜上培養歯髓由来細胞シートを羊膜ごと露髓面に静置し、約 4 週間後、歯牙ごと移植片を採取。マイクロ CT で画像評価を加えた。また粘着フィルムを用いることにより、非脱灰硬組織の凍結切片が作製可能な川本法を用いて、凍結切片を作製。ヘマ

トキシリン-エオジン染色にて組織学的検討、神経細胞マーカー(β-Tubulin、MAP-2)や象牙芽細胞マーカー(DSPP)の局在について免疫組織学的検討を行い、移植後における露髄歯髄への生着および形態的变化を組織学的に評価した。

4. 研究成果

神経分化誘導を行い作成した羊膜上歯髓由来細胞は、Vimentin、Ki-67 陽性細胞の局在を認めた。また、神経細胞マーカーであるβ-Tubulin、MAP-2の発現を認めた(図1)。

神経分化誘導培養を行い作成した羊膜上培養歯髓由来細胞は、羊膜上において歯髓としての性質を保持しつつ増殖していた。さらに神経細胞マーカーの発現を認めたことより、羊膜上においても歯髓由来細胞は神経分化能を有することを示した。

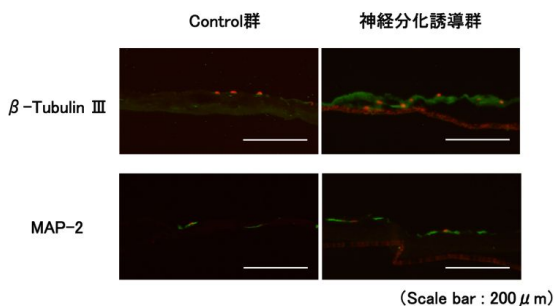


図1：神経細胞マーカー(β-Tubulin、MAP-2)における免疫蛍光染色

上記にて得られた培養シートを臼歯の咬合面を削合し歯髓露出した歯髓炎モデル(Fischer 344ヌードラット雄)へ移植した。移植約4週間後、歯牙ごと移植片を採取。ヘマトキシリン-エオジン染色像で培養シートの局在を認めたが、神経細胞マーカーであるβ-Tubulin、MAP-2、象牙芽細胞マーカーであるDSPPの発現は認めなかった(図2)。また、マイクロCTにおいて明らかな形態的变化は認めなかった。(図3)

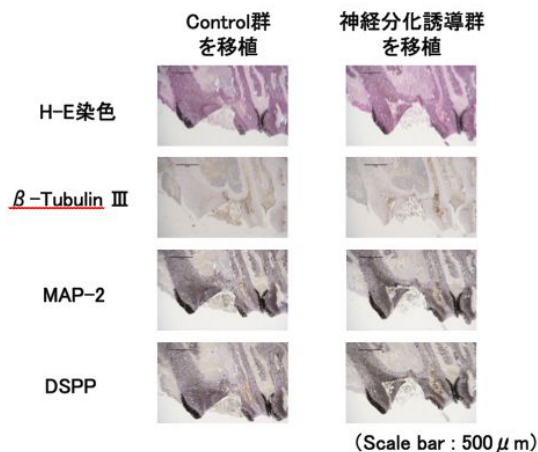


図2：羊膜上培養歯髓由来細胞シートの移植

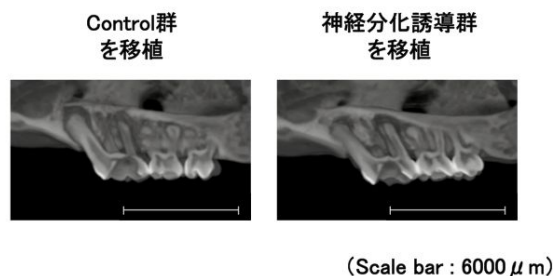


図3：マイクロCT像

以上より、神経分化誘導した羊膜上培養歯髓由来細胞シートが作成可能であり、新たな再生医療的治療法の開発へと繋がる可能性が示されたが、移植方法や治療法への応用はさらなる検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

山本俊郎、本城賢一、堀口智史、佐藤良樹、遠藤悠美、足立圭司、大迫文重、雨宮傑、中村亨、金村成智、神経分化誘導した羊膜上培養歯髓由来細胞シートの作成、第147回日本歯科保存学会2017年度秋季学術大会、2017年10月26~27日、マリオス(岩手県盛岡市)

本城賢一、山本俊郎、佐藤良樹、足立圭司、大迫文重、雨宮傑、金村成智、羊膜上培養歯髓由来細胞シートの神経分化誘導、

平成 29 年度 日本歯周病学会 60 周年記念
京都大会、2017 年 12 月 16～27 日、国立京
都国際会館（京都府京都市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本城 賢一 (Honjo Kenichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究

院)・特任助教

研究者番号：00756877

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし