

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592128

研究課題名（和文） 口腔内組織をソースとした歯槽骨再生用幹細胞の探索

研究課題名（英文） Isolation of stem cells for alveolar ridge augmentation from oral tissues

研究代表者

井上 俊二（INOUE SHUNJI）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40291447

研究成果の概要：本研究は顎の骨を再生させるために必要な細胞を患者自身から探索する研究である。骨を再生させるために必要な細胞は通常骨髄から採取されるが、採取時に強い痛みを伴うために、抜いて不要となった歯の神経や余分な歯肉から簡単に骨になる細胞を本研究では探索した。その結果、歯の神経の細胞や歯肉の細胞からも CD166 タンパクを多く発現する細胞には強く骨になる性質があることが判明した。これらの細胞は安全に骨の再生医療に用いることが期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	600,000	4,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：骨再生、幹細胞、再生医療、顎堤増生

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者の増加、歯周病の蔓延により歯の喪失後に高度に歯槽骨（顎堤）が吸収することは、その後の補綴修復治療に大きな妨げとなっている。インプラントの埋入も困難となり、義歯も不安定になる。研究開始当初注目されている再生医療では、腸骨から採取した骨髄液から間葉系幹細胞を培養して、これを骨分化させ、吸収した顎堤に移植することで顎堤を増生させることに成功している。

しかし、歯科医にとって腸骨から骨髄穿刺により骨髄液を採取することは日常業務からはかけ離れており、骨髄液をソースとした再

生医療が今後即座に普及することは望めない。歯科医が日々接している口腔領域の組織から顎骨再生用の細胞を採取することが、今後再生医療を口腔領域で普及させる最短の方法であると考えられた。実際、眼科領域では口腔内の上皮細胞を利用して角膜の再生に成功し、臨床応用も始まっていた。従って口腔内の組織には、骨芽細胞や骨髄間葉系幹細胞以外にも骨に分化できる細胞が存在している可能性は非常に高い。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では歯槽骨（顎骨）へ分化しうる細胞を、最も侵襲の少ない方法で口腔

内から採取する方法を検討した。これらの細胞の性質を追求していくことで、骨分化のみならず、他の医学領域に熱望されている様々な細胞、例えば神経細胞や血管内被細胞等への分化能についても見出すことにつながると考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞表面抗原を用いた抗体陽性率の検出

##### ① 歯髄と歯肉組織の採取

歯髄は智歯の抜歯ならびに矯正治療の便宜抜歯、そして歯肉にはインプラント 2 次オペ時の歯肉も患者の同意を得て用いた。(広島大学歯学部倫理委員会承認済み)。50ml 遠心管に Medium A を用意し、手術により供給された歯牙を Medium A 中に入れて実験室に移動した。実験室において、クリーンベンチで滅菌手袋を装着の上、歯牙に生理食塩水をかけながら、ダイヤモンドディスクで歯牙を分割していき、抗生物質を最終濃度 1%、およびウシ胎仔血清 (以下 FBS) 10% 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (以下 DMEM) (Medium B) に浸しながら、歯髄組織を採取した。

##### ② 細胞の分離

本実験では、採取した組織をメスにて細切りにした後、90mm 径の培養皿に Out-growth 法にて播種して 37°C で 5%CO<sub>2</sub> 気相下にて培養を行なったものと、同じく採取した組織をメスにて細断後、コラゲナーゼタイプ I 3mg/ml (Invitrogen), ディスパーゼ 4mg/ml (Invitrogen) ならびに Medium B の酵素処理にて 90mm 径の培養皿に播種し、37°C で 5%CO<sub>2</sub> 気相下にて培養を行なったものを使用し、その後、口腔内常在菌であるマイコプラズマを除去するため、マイコプラズマ除去剤 (MC-210) (DS ファーマバイオメディカル株式会社) でメディウムチェンジ時に 0.5µg/ml の濃度になるように添加し、3 週間培養を続け、PCR 法を用いてマイコプラズマの除去を確認した。マイコプラズマが除去できたのを確認した後、さらに培養を続け、継代数 3 までの細胞を凍結した。

#### (2) Fluorescence-activated cell sorting (FACS Calibur) による陽性率の検出

上で採取・分離した細胞を、Medium B を用いて 90mm 径の培養皿に 5,000 個/cm<sup>2</sup> で播種し、37°C で 5% CO<sub>2</sub> 気相下にて培養した。実験には継代数 3 までのものを 90%コンフルエントまで培養後に使用した。細胞表面抗原の標識として CD73, 74, 106, 146, 166, 271, STRO-1 に対する抗体を使用した。90% Confluent 時の 90mm 径の培養皿に播種した細胞を、PBS で 2 回洗浄し、0.2% EDTA 2ml 添加し、37°C で 5% CO<sub>2</sub> 気相下にて置き、細胞が剥げたのを確認後、PBS (0.5%BSA, 2mlEDTA 含有) (以下

Buffer) を添加し、遠心分離機にて遠心した。その後、FCR Blocking Regent (Miltenyi Biotec, Germany) 10µl、細胞 80µl、各種一次抗体 CD73, CD106, CD146, CD166, CD271, STRO-1 をそれぞれ 10µl、計 100µl を滅菌されたエッペンチューブにいれ、4°C で 15 分間反応させた。その後、Buffer 1ml 添加し、遠心分離機にて遠心。上清を吸引後、Buffer 80µl、FCR Blocking Regent 10µl、二次抗体として 100 倍希釈した Anti-IgG1, Mouse, Rat-Mono (Z41) PE (フナコシ) 10µl、計 100µl を混ぜ、4°C で 15 分間反応させた。その後、Buffer 1ml 添加し、遠心分離機にて遠心し、上清吸引後、Annexin V Binding Buffer 10X Concentrate (BD Biosciences) 200µl、WATER (SIGMA) 800µl を添加し、Polystyrene Round-Bottom Tube (FALCON, Meylan Cedex, France) に移し、FACS Calibur) にて抗体陽性率の検出を行なった。

#### (3) Magnetic Cell Sorting (MACS) による細胞の分離

90% Confluent 時の 90mm 径の培養皿に播種した細胞を、PBS で 2 回洗浄し、0.2% EDTA 2ml 添加し、37°C で 5% CO<sub>2</sub> 気相下にて置き、細胞が剥げたのを確認後、PBS 100ml, 0.5%BSA, 2mlEDTA (以下 Buffer) を添加して遠心した。その後、FCR Blocking Regent (Miltenyi Biotec, Germany) 10µl、細胞 80µl、一次抗体 CD74, CD106, CD146, CD166, CD271, STRO-1 それぞれ 10µl、計 100µl を滅菌されたエッペンチューブにいれ、4°C で 15 分間反応させた。その後、Buffer 1ml 添加し、遠心分離機にて遠心。上清を吸引後、Buffer 80µl、FCR Blocking Regent (Miltenyi Biotec, Germany) 10µl、二次抗体として 100 倍希釈した Anti-IgG1, Mouse, Rat-Mono (Z41), PE (フナコシ) 10µl、計 100µl を混ぜ、4°C で 15 分間反応させた。その後、Buffer 1ml 添加し、遠心分離機にて遠心し、上清吸引後、Buffer 70µl、FCR Blocking Regent (Miltenyi Biotec, Germany) 10µl、二次抗体として STRO-1 では、Rat Anti-Mouse IgM Microbeads (Miltenyi Biotec, Germany)、その他の一次抗体では、Rat Anti-Mouse IgG1 Microbeads (Miltenyi Biotec, Germany) を 20µl、計 100µl にし 4°C にて 15 分間反応。その後、Buffer 1ml 添加後、遠心分離機にて遠心し、上清吸引後、MACS にて抗体の陽性細胞群、陰性細胞群を分離した。予め、Medium B を入れたチューブを用意しておき、カラムを磁石にはめ、Buffer 500µl での洗浄を 4 回ずつ繰り返し、これを非結合フランククションとしてまとめた。最後にカラムを磁石から外し、Buffer を 1ml 添加して細胞を溶出し、結合フランククションとしてまとめた。

#### (4) *in vitro* における骨分化の検討

MACS により抗体陽性細胞、抗体陰性細胞に分

分離した細胞を Medium B を用いて、MICROTEST™ 96well プレート平底にて抗体陽性細胞、陰性細胞、歯髄オリジナル細胞をそれぞれ 2 万個/ml ずつ培養した。上記の培地で Confluent まで培養した細胞を、骨分化誘導にかけた。骨分化誘導培地には 1% Antibiotic-Antimycotic,  $10^{-8}$ M Dexamethasone (以下 Dex), 10mM -glycerophosphate, および 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid 2-phosphate (SIGMA), 10% FBS を添加した Minimum Essential Alpha Medium (以下  $\alpha$ -MEM) を、各 well に加えて、3 日ごとに培地交換を行いながら 37°C で 5% CO<sub>2</sub> 気相下にて培養した。その後一定期間後にアリザリンレッド染色とアルカリフォスファターゼ活性 (ALPase) を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 歯髄細胞の結果

###### ① FACS による抗体陽性率

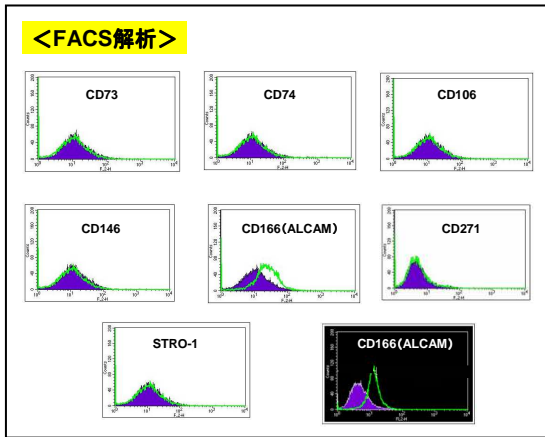


図 1：歯髄細胞の抗体陽性率  
CD166 については 2 株の細胞においても他の抗体に比較して抗体の陽性率が高かった。

###### ② MACS 分離細胞の石灰化

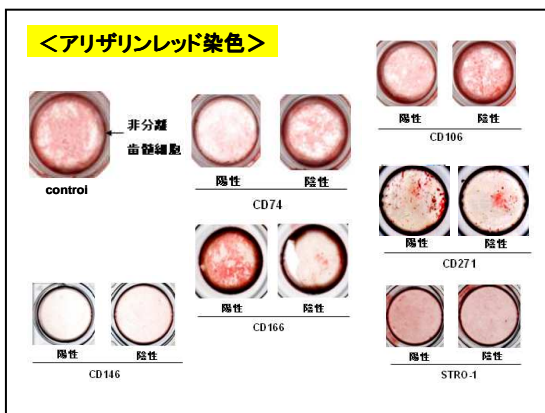


図 2：各抗体と MACS システムで分離した細胞のアリザリンレッド染色像

CD166 陽性細胞群は陰性細胞群に比較して強い石灰化を示したが、逆に CD74 陽性細胞群は陰性細胞群に比較して石灰化が弱かった。

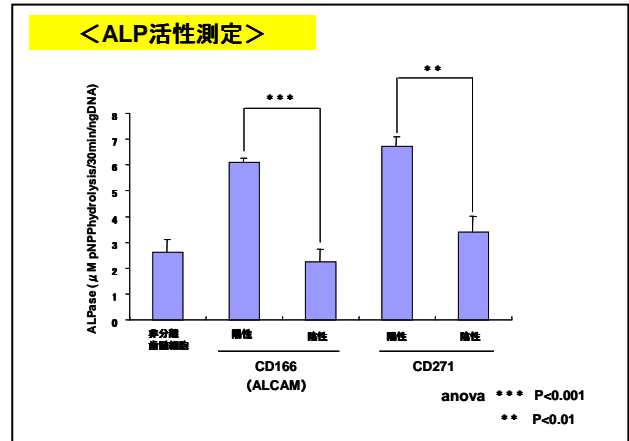


図 3：各抗体と MACS システムで分離した細胞のアルカリフォスファターゼ活性  
CD166 陽性細胞群は陰性細胞群に比較して有意に高いアルカリフォスファターゼ活性を示した。間葉系幹細胞のマーカとして市販されている CD271 の陽性細胞群でも同様に高いアルカリフォスファターゼ活性を示した。

以上の結果から CD166 は歯髄から石灰化能の高い細胞を分離するために有効な細胞表面マーカーであることが始めて示された。

##### (2) 歯肉細胞の結果

###### ① FACS による抗体陽性率

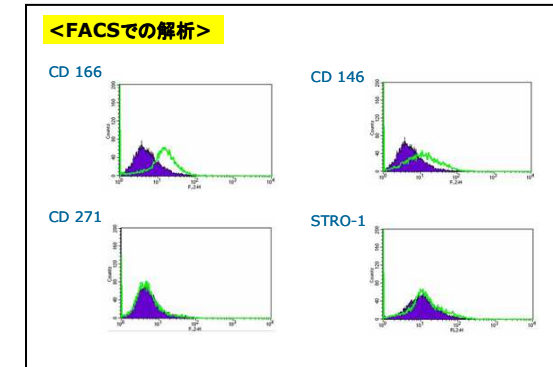


図 4：歯肉細胞の抗体陽性率  
歯肉の細胞群では CD166&146 陽性細胞が多く検出された。

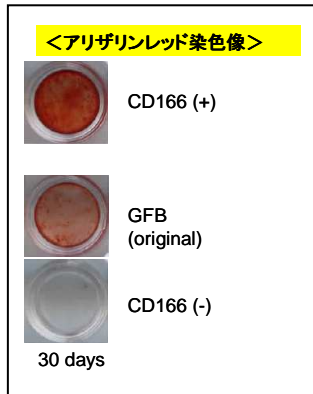


図5：CD166 と MACS システムで分離した歯肉細胞のアリザリンレッド染色像  
歯肉細胞も CD166 陽性細胞群は陰性細胞群に比較して明らかに強い石灰化を示した。

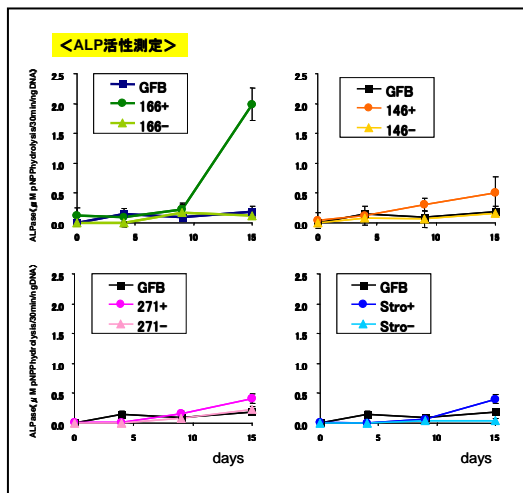


図6：各抗体と MACS システムで分離した細胞の経時的なアルカリフォスファターゼ活性  
CD166 陽性細胞群は骨分化誘導 15 日後には陰性細胞群や非分離細胞群に比べて明らかに高いアルカリフォスファターゼ活性を示した。このような明らかな差は他の抗体では認められなかった。

以上をまとめると、

- ① FACS にて歯髄、歯肉細胞を抗体を用いて分析したところ、両細胞とも CD166 に最も陽性率が高かった。
  - ② MACS システムで分離した CD166, 271 陽性の歯髄細胞群は、陰性細胞群に比べ、高い骨分化能を示したが、CD146, STRO-1 による細胞分離の効果は認められなかった。
  - ③ MACS システムで分離した歯肉の細胞で、CD166 陽性細胞群は特に高い ALP 活性を示した。
- つまり CD166 は、歯髄、歯肉細胞中から骨分化能の高い細胞を分離するのに適した抗体

の一つであることが示された。

・得られた成果の国内外における位置づけとインパクト：

CD166 は線維芽細胞には通常発現している表面抗原であることは周知であったが、これを MACS システムと組み合わせることで歯肉の線維芽細胞からも高骨分化細胞が獲得できたことは世界で初めての知見である。

・今後の展望：

CD166 が歯髄は歯肉細胞からの高骨分化能細胞の分離に有効であることが示されたが、今後はこのように分離した細胞の生体内での分化能を確認する必要がある。また、例えば肺や皮膚のような他の線維芽細胞でも CD166 を用いて MACS で分離した細胞がどのような性質をもつのかについても検討する必要がある。このような点を解決していけば、遺伝子導入をせずとも自己細胞から簡単・安全に再生医療用の細胞を獲得できることが期待される。

## 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. 西村正宏ら、細胞表面抗原を用いた口腔内組織からの骨分化可能細胞の分取、第 38 回日本口腔インプラント学会、2008 年 9 月 14 日 (東京)

2. 西村正宏ら、口腔内細胞からの ALCAM を指標とした骨分化細胞の分取、第 41 回広島大学歯学会総会、2008 年 6 月 15 日 (広島)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 俊二 (INOUE SHUNJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：40291447

(2) 研究分担者

西村 正宏 (NISHIMURA MASAHIRO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：00294570

以下の者は H19 年度まで参画

濱田 泰三 (HAMADA TAIZO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：50034244

(3) 連携研究者