

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390511
 研究課題名（和文）組織工学的的手法によるマラッセ上皮遺残細胞と歯髄細胞による歯の再生技術の確立
 研究課題名（英文）Tissue-engineered tooth based on epithelial cell rest of Malassez and dental pulp cells using tissue engineering technology
 研究代表者
 本田 雅規（HONDA MASAKI）
 日本大学・歯学部・専任講師
 研究者番号：70361623

研究成果の概要：今回提案した研究課題を通じて、マラッセ上皮遺残細胞の長期間の培養に成功した。次に培養マラッセ上皮細胞は歯髄細胞と共培養することで、エナメル芽細胞に分化した。さらに、組織工学的的手法に用いて、培養マラッセ上皮細胞と歯髄細胞を移植すると、移植体の中にエナメル質が形成した。これらの結果から、マラッセ上皮遺残細胞がエナメル質形成能力を持っていることが確認でき、予定した研究課題を成就できたと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,100,000 円	2,130,000 円	9,230,000 円
2008 年度	6,200,000 円	1,860,000 円	8,060,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	13,300,000 円	3,990,000 円	17,290,000 円

研究分野：再生医学・幹細胞学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：アメロゲン、エナメル質再生、エナメル芽細胞、歯髄細胞、
 上皮-間葉相互作用、組織工学的的手法、歯の再生、マラッセ上皮遺残細胞

1. 研究開始当初の背景

歯の再生方法が近年、いろいろな施設で報告されている。エナメル質を形成する歯胚上皮細胞は歯冠が完成すると消失する。そこで、新たな細胞源が必要である。

一方で、生体に残っている歯原性の唯一の細胞であるマラッセ上皮遺残細胞の組織形成能を検討した報告は今までに一報もなかった。

2. 研究の目的

われわれは、今までに歯胚細胞から歯牙組織を再生させる技術を開発したが、歯胚以外

の細胞から歯を再生させる技術の確立には至っていない。

成人の歯根表面に生存するマラッセ上皮遺残細胞は、歯原性細胞として唯一、成体の中で残されている上皮細胞である。このマラッセ上皮遺残細胞からエナメル質を形成させる技術を確認することは、より多くの症例に応用できる技術となり得ると考えられる。近年、マラッセ上皮遺残細胞が歯根膜組織から採取できることが報告され、歯根膜細胞と共培養することで、培養・増殖できる。

しかし、マラッセ上皮遺残細胞のみを培養する技術は、まだ確立されていない。そこで

この研究では、マラッセ上皮遺残細胞のみを表現系を維持しながら培養増殖させる術式を確立し、その特性を解析すること、次に、この培養・増殖させたマラッセ上皮遺残細胞のエナメル質形成能を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

従来、マラッセ上皮遺残細胞の形質を維持しながら継代させることに成功した報告はない。今までの報告では、マラッセ上皮遺残細胞を歯根膜組織から採取し培養すると歯根膜細胞が混入する。そこで、トリプシン処理すると、歯根膜細胞は排除され、マラッセ上皮遺残細胞のみとなるものの長期間の継代培養が困難である。

われわれは、3T3細胞と歯胚上皮細胞を混合培養することで、形質を維持しながら長期間の培養に成功している (Honda et al. Arch Oral Biol. 2006, 51:282-90)。そこで、初年度は、マラッセ上皮遺残細胞を歯根膜組織から単離し、3T3細胞をフィーダーレイヤーとした混合培養にて継代し、マラッセ上皮遺残細胞の形質が長期間維持されていることを確認した。

マラッセ上皮遺残細胞を歯根膜組織から容易に分離することに成功し、3T3細胞との共培養は可能であった。細胞を継代した後の形質の維持の確認には、二つの方法で検討した。

第1に、マラッセ上皮遺残細胞からmRNAを採取し、マラッセ上皮遺残細胞特異的な遺伝子の発現をRT-PCRによって比較・解析した。第2に、細胞から分泌されるタンパクの発現を免疫細胞化学的に観察した。

歯髄細胞の培養方法の確立

歯髄組織は、歯根膜組織を採取した後に、歯牙の歯冠部を破切して、歯髄を採取した。酵素処理にて歯髄細胞を単離し、通常の培地に20%の血清にて細胞は増殖した。この培養方法にて細胞がアルカリフォスファターゼ活性 (ALP活性) の上昇を認めることを確認した。これは、培養している細胞硬組織の形成を示唆するものである。次に継代した細胞が表現系を維持していることを歯髄細胞特異的な遺伝子とタンパクの発現をRT-PCRと免疫細胞化学的に解析した。

次に、マラッセ上皮遺残細胞がエナメル芽細胞に分化することを確認するために、*in vivo*にて組織工学的手法を用いてマラッセ上皮遺残細胞と歯髄細胞との上

皮一問葉相互作用によってエナメル芽細胞に分化し、エナメル質を形成することを確認した。

4. 研究成果

初年度において3T3細胞をフィーダーレイヤーとしたマラッセ上皮遺残細胞の培養方法を確立することに成功した。

われわれは、今までに3T3-J2細胞と鐘状期歯胚上皮細胞を混合培養することで、歯胚上皮細胞の初期の形質を維持しながら継代培養に成功している。そこで、同じ手法を用いることで、マラッセ上皮遺残細胞の形質を維持したまま継代培養できることが確認できた。

マラッセ上皮遺残細胞の形質維持の確認には、二つの方法で検討した。第1に、マラッセ上皮遺残細胞からmRNAを採取し、現在までにマラッセ上皮遺残に発現することが知られている細胞特異的な上皮細胞のマーカー遺伝子およびエナメルタンパクのマーカー遺伝子群の発現をRT-PCRによって比較・解析を行った。RT-PCRの結果では、初代マラッセ培養細胞と10継代した培養マラッセ上皮細胞においてその遺伝子発現パターンは類似していた (歯周病学会にて発表)。

さらに、継代した培養マラッセ上皮遺残細胞のタンパクの発現を解析した。継代培養した細胞を、マラッセ上皮遺残細胞から上皮細胞のマーカーとなるサイトケラチンとエナメル関連タンパクのアメロゲニンの発現を免疫細胞化学的に検討したところ、継代培養した培養マラッセ上皮細胞はサイトケラチン14陽性であり、アメロゲニン陰性であり、この発現パターンも初代培養と類似していた (歯科基礎学会にて発表)。

この共培養法で増殖した細胞をRT-PCRにてエナメル上皮細胞関連遺伝子の発現パターンで解析すると、初代マラッセ上皮遺残細胞の形質を維持していることが示唆された。

最終年度において、今回申請した研究課題の最終目的となるマラッセ上皮遺残細胞が歯の形成能を所有しうることを検討した。

初年度に確立した方法でブタ乳歯歯根膜からマラッセ上皮遺残細胞を単離および培養し、その培養マラッセ上皮遺残細胞とブタ第三臼歯歯髄組織から単離した歯髄細胞を共培養することで、マラッセ上皮遺残細胞がアメロゲニンを発現することを免疫細胞化学染色とRT-PCRによって確認した。マラッセ上皮遺残細胞を単

独で培養した場合およびフィーダー細胞と共培養した時はアメロゲニンを発現しなかった。したがって、マラッセ上皮遺残細胞は歯髄細胞と共培養するとエナメル芽細胞に分化することが示唆できる。

次に歯の組織形成能を検討するために、培養マラッセ上皮遺残細胞と歯髄細胞をコラーゲンスポンジの担体に播種してヌードラットの腹部大網に移植した。移植4週後と8週後に試料を取り出して、組織学的及び免疫組織化学的に解析した。移植4週後では、すでに象牙質は再生し、その再生した象牙質上にアメロゲニンに陽性となるエナメル芽細胞が配列していた。さらに、移植8週後においては、象牙質—エナメル質の複合体が再生し、エナメル質はアメロゲニン抗体に陽性であった。これらの結果から、マラッセ上皮遺残細胞は歯髄細胞との上皮—間葉相互作用によって、生体内においてもエナメル芽細胞に分化し、エナメル質を形成できることを確認した。

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)

[雑誌論文] (計9件、全て査読あり)

- ① Honda MJ, Shinmura Y, Shinohara Y. (2009) Enamel Tissue Engineering Using Subcultured Enamel Organ Epithelial Cells in Combination with Dental Pulp Cells. *Cells Tissues Organs*. 189(1-4):261-267
- ② Sumita Y, Asahina I, Kagami H, Honda MJ. (2009) The location and characteristics of two populations of dental pulp cells affect tooth development. *European Journal of Oral Sciences* 117(2):113-121
- ③ Ando Y, Honda MJ, Ohshima H, Tonomura A, Ohara T, Itaya T, Kagami H. (2009) The induction of dentin bridge-like structures by constructs of subcultured dental pulp-derived cells and porous HA/TCP in porcine teeth. *Nagoya J*. 71: 51-62
- ④ Shinmura Y, Tsuchiya S, Hata KI, Honda MJ. (2008) Quiescent epithelial cell rest of Malassez can differentiate into ameloblast-like cells. *J Cell Phy*. 217(3):728-738
- ⑤ Tsuchiya S, Honda MJ, Shinohara Y, Saito M, Ueda M. (2008) Collagen type I matrix affects the molecular and cellular

behavior of purified porcine dental follicle cells, *Cell & Tissue Research*, 331:447-459

- ⑥ Honda MJ, Fong H, Iwatsuki S, Sumita Y, Sarikaya M. (2008) Tooth-forming potential in embryonic and postnatal tooth bud cells. *Med Mol Morphol* 41(4):183-192
 - ⑦ Honda MJ, Nakashima F, Satomura K, Shinohara Y, Tsuchiya S, Watanabe N, Ueda M. (2007) Side population cells expressing ABCG2 in human adult dental pulp tissue. *International Endodontic Journal*, 40(12):949-58.
 - ⑧ Honda MJ, Shinohara Y, Hata KI, Ueda M. (2007) Subcultured odontogenic epithelial cells in combination with dental mesenchymal cells produce enamel-dentin-like complexes structures. *Cell Transplantation*. 16(8):833-47
 - ⑨ Honda MJ, Tsuchiya S, Sumita Y, Sagara H, Ueda M. (2007) The sequential seeding of epithelial and mesenchymal cells for tissue-engineered tooth regeneration. *Biomaterials*. 28:680-689
- [学会発表] (計10件)
- ① Honda M. et al. (July 2-5, 2008) Epithelial cell rest of Malassez have a potential to produce enamel. 86th International Academy of Dental Research, General Session, Toronto, Canada
 - ② Masaki Honda, (February 9-14, 2008) Porcine epithelial cell rest of Malassez have the potential to produce enamel tissue. Gordon Research Conference on CRANIOFACIAL MORPHOGENESIS & TISSUE REGENERATION, iL Ciocco, Italy
 - ③ Masaki Honda, et al. (2007. March 21-24) Tissue engineering of enamel-dentin complex structures. 85th General session & Exhibition of the IADR, New Orleans, USA
 - ④ Honda M, (2007, Nov29) Enamel grow from porcine cultured dental epithelial cells, The 26th Korean Division of the International Association for Dental Research, Seoul, Korea
 - ⑤ Honda M, (2007, Nov. 4-8) Subcultured dental enamel organ epithelial cells in

combination with dental papilla cells produce enamel-dentin like complex structures, 9th International conference of the chemistry and biology of mineralized tissues, Texas, USA

⑥ 本田雅規 (平成 20 年 6 月 7 日) 培養歯胚細胞を用いた歯の再生研究, 平成 20 年度日本歯科大学歯学大会

⑦ 本田雅規 (2007. 4-19-20) 培養歯胚上皮細胞を用いたエナメル-デンチン構造の再生. 第 61 回日本口腔科学会, 神戸

⑧ Honda M (March 5th 2007) Tissue engineered dentin/enamel complex using cultured dental epithelial cells and primary dental papilla/pulp cells. International Symposium on Molecular Destruction and Reconstruction of the Dentin/Pulp Complex and Its Surrounding Tissues, Tokyo

⑨ 新村優佳 (2007 年 9 月 20-22 日), マラッセ上皮遺残細胞はエナメル質を形成する, 第 50 回日本歯周病学会, 東京

⑩ 新村優佳 (2007 年 8 月 29 日-31 日) 長期培養したマラッセ上皮遺残細胞の特性の解析, 第 49 回歯科基礎医学会、札幌

[図書] (計 3 件)

① Honda MJ (2008) Tooth-Tissue Engineering (chapter) in Tissue Engineering Research Trends, Nova Science Publishers, Inc, New York, , 267-279

② 本田雅規 (2008) 組織工学的手法による歯の再生、科学と工業 82(5)19-24

③ 本田雅規 (2007) 歯の再生. 再生医療技術の最前線 (バイオテクノロジーシリーズ), シーエムシー出版, 東京, 227-233

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 雅規 (HONDA MASAKI)
日本大学・歯学部・専任講師
研究者番号: 70361623

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

各務 秀明 (KAGAMI HIDEAKI)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号: 80242866

相良 洋 (SAGARA HIROSHI)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号: 501450

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書