

平成21年 5月12日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592285

研究課題名（和文） 根未完成歯からの多分化能幹細胞の単離と骨再生医療への応用

研究課題名（英文） Multilineage cells from human tooth with immature apex and their application for bone tissue engineering

研究代表者

山口 聡 (YAMAGUCHI SATOSHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00280628

研究成果の概要：

発生途上にあるヒト根未完成歯の根尖部歯髄組織より初代細胞培養を行ったところ活発に増殖する細胞集団が得られた。この細胞集団は生体外にて硬組織形成細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、神経細胞に分化できる多分化能を持つことが判明した。また、この細胞集団は動物の体内にて骨組織、象牙質組織を形成できるという結果も得られた。これらの結果よりヒト根未完成歯の根尖部歯髄組織は再生医療における貴重な細胞供給源と成りうるということが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：歯、歯髄、骨、再生医療

1. 研究開始当初の背景

疾患や外科的手術により失われた組織を患者自身の細胞を用いて修復する再生医療の研究が盛んに行なわれるようになった。再生医療研究においては自己複製能が高く、多種の細胞に分化できる幹細胞の採取が非常に重要である。幹細胞の供給源としては骨髄が代表的であるが、骨髄における幹細胞存在頻度の低さ、骨髄穿針の侵襲などを考えると他の幹細胞供給組織を見いだすことが望まれていた。

2. 研究の目的

我々は歯科、口腔外科の特徴を活かし細胞供給源として歯髄に注目し、歯髄から幹細胞を採取し種々の細胞に分化させ、再生医療に応用することを目指して研究を行ってきた。特に発生途上にある根未完成歯の根尖部歯髄に着目した。根未完成歯は発生途上にある歯牙で、その根尖部では今まさに歯根、歯髄、歯周組織といった組織が形成中であり、いろいろな分化、発生段階にある細胞が存在していると推測したためである。

3. 研究の方法

東京医科歯科大学歯学部附属病院口腔外科外来にて治療目的に抜歯された根未完成第3大臼歯を患者の承諾を得て用いた。歯髓組織を1mm角の小片にし、outgrowth培養にて初代培養を行った。初代培養にて増殖した細胞を継代培養し、第3継代目の細胞を細胞表面マーカーの解析、分化誘導実験および動物への移植実験に用いた。移植の際の担体には多孔性ハイドロキシアパタイトを用い、免疫不全動物の皮下に移植した。移植後12週目に複合体(担体+細胞)を取り出し、組織学的検討を行った。

4. 研究成果

まず我々は発生途上にある根未完成歯の根尖部歯髓に着目した。この部位は歯根完成といったダイナミックな生物学的反応が今まさに起こっている部位であり組織形成に関与する興味深い細胞が存在すると予測したためである。根未完成歯根尖部歯髓組織を用いた初代培養では培養後4-5日後に組織周囲に細胞が出現し、その後も増殖を続け細胞シートを形成していった。細胞の増殖は非常に活発で、1mm角の歯髓組織より培養21日後には平均で約 3.5×10^5 個の細胞が得られた。

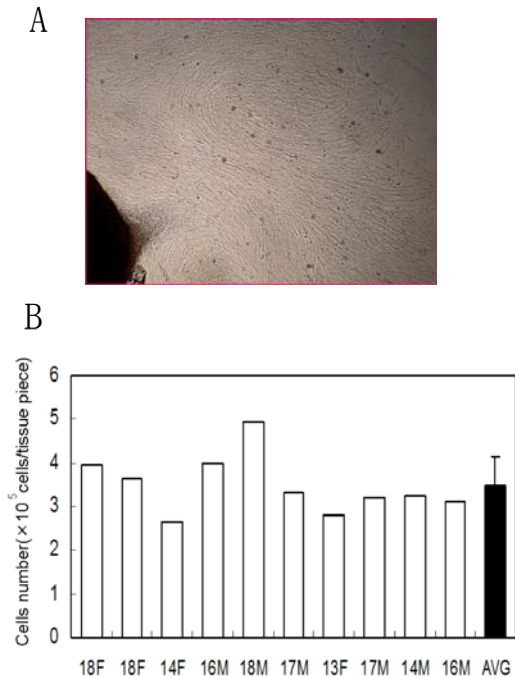


図1 根尖部歯髓組織由来細胞の初代培養
A: Outgrowth 初代培養
B: 初代培養にて得られる細胞数 (培養21日後) n = 10

継代培養後も活発な増殖能を維持し、低密度での培養においてもコロニーを形成した。

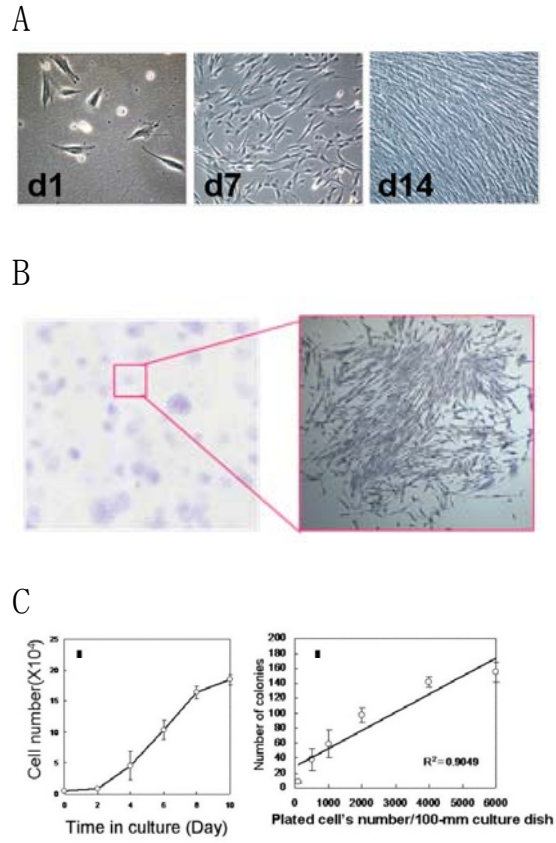


図2 根尖部歯髓組織由来細胞の継代培養
A: 継代培養後の細胞形態
B: コロニー
C: 継代培養後の細胞増殖およびコロニー形成数

種々の細胞表面マーカーの発現をFACScanにて解析したところその発現パターンは間葉系幹細胞に類似していた

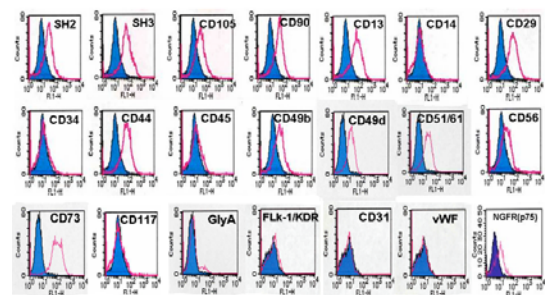


図3 細胞表面マーカーの発現

In vitroでの分化誘導実験では根尖部歯髓由来細胞は硬組織形成細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、神経細胞に分化することが見いだされた。

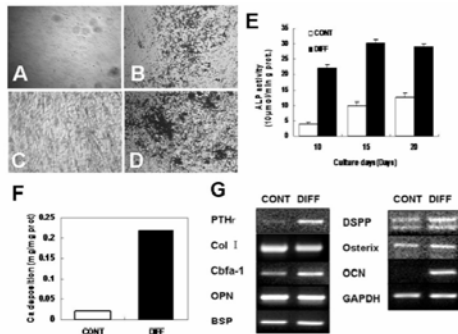


図4 根尖部歯髓組織由来細胞のin vitroでの硬組織形成細胞への分化
 A: Arizarin red 染色 (コントロール)
 B: Arizarin red 染色 (分化誘導群)
 C: Von Kossa 染色 (コントロール)
 D: Von Kossa 染色 (分化誘導群)
 E: ALP 活性
 F: カルシウムの沈着
 G: RT-PCR 法による硬組織形成細胞マーカーの発現

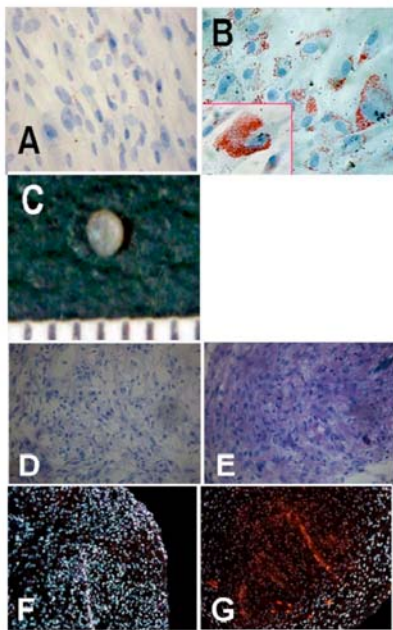


図5 根尖部歯髓組織由来細胞の脂肪細胞および軟骨細胞への分化
 A: oil-Red O 染色 (コントロール)
 B: oil Red O 染色 (分化誘導群)
 C: macro picture of chondrosphere
 D: Toluidine Blue 染色 (コントロール)
 E: Toluidine Blue 染色 (分化誘導群)
 F: Type II collagen 免疫染色(コントロール)

G: Type II collagen 免疫染色(コントロール)

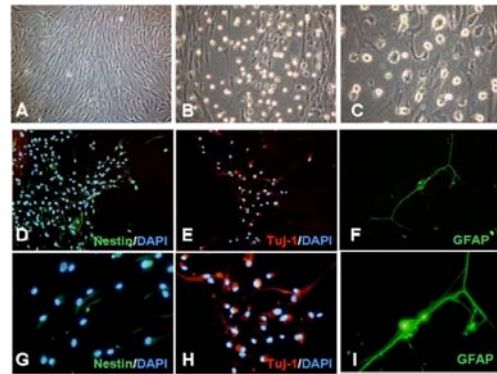


図6 根尖部歯髓組織由来細胞のin vitroでの神経細胞への分化
 A: コントロール
 B, C: 分化誘導群
 D, G: Nestin 免疫染色
 E, H: Tuj-1 免疫染色
 F, I: GFAP 免疫染色

しかしながら以上のin vitroでの分化誘導実験は細胞をクローニングした後の実験ではないため、歯髓細胞のなかに多種類の細胞に分化できる幹細胞が存在するのか、各種の細胞の前駆細胞が存在するだけなのかは判断できない。今後の研究課題であると思われる。

次に根尖部歯髓由来細胞のin vivoでの硬組織形成能を調べる実験を行った。第3継代目の歯髓細胞を多孔性ハイドロキシアパタイトに播種し、分化誘導培地にて3週間、in vitroにて培養した。その後免疫不全動物の皮下に移植し、12週後に取り出し組織学的検討を行った。その結果、歯髓細胞によるin vivoにおける活発な硬組織形成が認められた。形成された硬組織の大部分は骨組織であり、わずかながら象牙質組織も認められた。

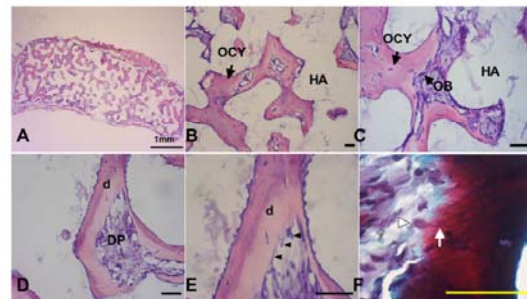


図6 根尖部歯髓組織由来細胞によるin vivoでの硬組織形成

- A: 歯髄細胞/ハイドロキシアパタイト複合体の全体像 (HE 染色)
 B, C: 骨組織形成 (HE 染色)
 OCY; 骨細胞、OB; 骨芽細胞
 HA; ハイドロキシアパタイト
 D, E, F: 象牙質組織形成 (D,E;HE 染色,
 F; マッソントリクローム染色)
 d; 象牙質組織、DP; 歯髄様組織、
 triangles; 象牙芽細胞、
 arrow; 象牙芽細胞突起

歯髄組織は2次象牙質形成能を持つため歯髄組織由来細胞はin vivoにて象牙質組織を形成すると予測していたが、象牙質形成はわずかであり、活発な骨形成が認められた。この結果を考えると歯髄細胞のなかには骨芽細胞に分化する細胞が存在すると思われる。通常は歯髄内に骨組織は形成されないため、歯髄内に骨芽細胞あるいは骨芽細胞の前駆細胞が存在することは考えにくい。骨芽細胞に分化できる幹細胞の存在が考えられるが、上述したようにその同定には至っていない。

歯髄組織由来細胞が骨再生医療において有用な細胞になりうることが示された。これまでは抜歯した歯牙は廃棄していたが、今後は再生医療のための貴重な細胞供給源になる可能性がある。

本研究の以上の結果を踏まえ、今後は

- ・ 歯髄組織由来細胞を用いた骨再生医療の確立
- ・ 歯髄組織中に存在する多分化能幹細胞の同定を目指し研究を続けていきたいと考えている。

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 2件)

- ① Abe S., Yamaguchi S., Amagasa T.
 Multilineage cells from apical pulp of human tooth with immature apex.
 Oral Science International, 4:45-58,
 2007. (査読有)
- ② Abe S., Yamaguchi S., Watanabe A.,
 Hamada K., Amagasa T.
 Hard tissue regeneration capacity
 of apical pulp derived cells (APDCs)
 from human tooth with immature
 apex.
 Biochem. Biophys. Res. Commun.
 371:90-93, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 4件)

- ① Hamada K., Yamaguchi S., Abe S.,
 Ichinose S., Abe T., Yamashita Y.,
 Amagasa T. : In vivo bone formation
 by cells from dental pulp without
 differentiation-inducing agent.
 Tissue Engineering International and
 Regenerative Medicine Society,
 Asia-Pacific Chapter Meeting 2007
 December 3-5, 2007, Tokyo
- ② 阿部成宏, 濱田啓一, 山口聰, 天笠光雄
 ヒト根未完成歯根尖部歯髄由来細胞の多
 能性と再生医学への応用に関する検討.
 第49回歯科基礎医学学会学術大会.
 2007年8月30日、札幌
- ③ 山口聰, 濱田啓一, 阿部成宏, 天笠光雄
 歯髄細胞の多分化能と再生医療への応用
 第45回日本口腔組織培養学会
 2008年11月15日、松本
- ④ 濱田啓一, 山口聰, 阿部成宏,
 市ノ瀬志津子, 阿部龍彦, 山下靖雄,
 天笠光雄
 分化誘導因子を用いない歯髄組織由
 来細胞を用いた骨組織形成
 第62回日本口腔科学会
 2008年4月17日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口聰 (YAMAGUCHI SATOSHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合
 研究科・助教

研究者番号: 00280628

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者