

平成 22 年 4 月 21 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19791418

研究課題名（和文） 血管内皮前駆細胞を用いた歯髄再生—新しい細胞源の開発

研究課題名（英文） Regeneration of dental pulp by transplantation of endothelial progenitor cells from tooth, bone marrow, artery, and adipose tissue.

研究代表者

庵原 耕一郎

国立長寿医療センター 口腔疾患研究部 特任研究員

研究者番号 60435865

研究成果の概要：

創傷治癒部位においては、骨髄より湧出し全身血管を循環している単核球あるいは angioblast または、局所動静脈壁の組織幹細胞が血管新生や免疫反応に関与することが示唆されている。本研究は歯髄傍血管に存在する幹・前駆細胞(CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup>SP 細胞)の発現遺伝子を全身組織あるいは骨髄由来のものと網羅的に比較した。よって、深い齲蝕、歯髄炎、あるいは抜髄後の歯髄再生治療において、有用な細胞源を確保する手がかりを与えるものと期待される。交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,700,000	0	1,700,000
平成 20 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

歯髄炎の治療には一般に抜髄が行われるが、歯髄は歯を維持するための重要な機能を有し、抜髄は結果として歯を失う危険性もある。したがって、私どもは歯髄幹細胞を用いて、抜髄に代わる、新しい歯髄再生治療法を開発してきた<sup>1)</sup>。まず、ブタ歯髄組織から幹細胞を多く含む画分といわれる side population (SP) を分取し、その自己複製能および象牙芽細胞への分化能を含む多能性を明らかにした<sup>2)</sup>。Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) を添加し三次元培養(pellet/aggregate culture)すると象牙芽細胞に分化し、イヌ生活歯髄面上に自家移植すると、象牙質が再生さ

れた<sup>2)</sup>。ブタ歯髄 SP 細胞は血管内皮前駆細胞のマーカーである *CD31*, *CD34*, *CD105*, *VEGFR2* を強く発現し、血管周囲に局在性がみられたことから、歯髄幹細胞の niche は傍血管であることが示唆した<sup>2)</sup>。したがって、SP 細胞と血管内皮前駆細胞との関連性を明らかにする目的で、*CD31* および *CD146* を用いて SP 細胞をさらに分画した。その結果、SP 細胞全体の 45% を占める *CD31*<sup>-</sup>;*CD146*<sup>-</sup>SP 細胞画分が血管形成能、神経誘導能を有していることが明らかとなった。I 型および III 型コラーゲンの混合 scaffold を用いて *CD34*<sup>+</sup>;*CD31*<sup>-</sup>;*CD146*<sup>-</sup>SP 細胞の三次元培養を行うと、毛細血管を含む歯髄組織形成がみら

れた。したがって、この CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞を用いて、歯髄を再生できる可能性が示唆してきた。

## 2. 研究の目的

実際 CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞を臨床応用するためには、この安全に、生体に侵襲を与えず、しかもできるだけ安価に入手する方法の開発が必要となる。患者自身から得られる不要な智歯あるいは矯正便宜抜去歯由来の歯髄細胞には限界があり、形質を維持したまま安全に増幅する方法もいまだ明らかではない。一方、ヒト動脈壁に存在する CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>は血管新生能を有し、CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>細胞静脈内注入による閉塞性末梢血管疾患の改善が報告されている<sup>3)</sup>。また脂肪組織血管由来の CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>細胞についても血管新生の同様な報告がある<sup>4)</sup>。そこで、私どもは、容易に大量に得られる他の組織からの細胞を歯髄再生に応用することを目的として、歯髄由来の CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞を他の組織のものと比較し、歯髄再生の細胞源として有効であるかを検討した。

## 3. 研究の方法

### 1. ブタ組織より CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞の分取

ブタ歯髄、大動脈、脂肪、骨髄、大動脈由来細胞をそれぞれ Hoechst33342 および CD34、CD31 および CD146 抗体でラベルしてフローサイトメトリーにて CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞を分取した。

### 2. 血管誘導能の検索

マトリジェル上で培養し、VEGF を添加して網状の管腔形成を確認し、血管内皮前駆細胞から血管内皮細胞に分化していることを確認した。

### 3. マイクロアレイ

1 の分取したそれぞれの細胞から Trizol<sup>®</sup> 試薬を用いて total RNA を抽出する。ブタ GeneChip<sup>®</sup> (AFFYMETRIX) を用いて、マイクロアレイ解析を行う。歯髄と他の組織のデータをそれぞれ比較した。

### 4. SCID マウスへの移植による血管機能の検索

培養組織を DiI でラベルの後、下肢虚血 SCID マウスの皮下に移植し、14 日後、

A. レーザードップラー画像解析—血流回復の検討

B. 連続切片の免疫組織学的解析 (BS1-lectin 染色)—血管新生能の検討  
血管染色後、生着状態を形態学的に観察する。

以上により各組織由来の

CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞の血管新生、歯髄再生への有用性を検討した。

## 4. 研究成果

ブタ歯髄、大動脈、脂肪、骨髄より CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞を分取すると、ブタ歯髄 CD31<sup>+</sup>SP 細胞は、脂肪、骨髄および大動脈 CD31<sup>+</sup>SP 細胞に比べ組織における細胞含有率が高かった (歯髄 3%、骨髄 0.3%、脂肪 1.3%、大動脈 0.8%) (Figure 1)。

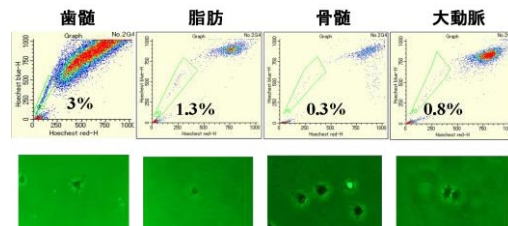


Figure 1 ブタ歯髄、大動脈、脂肪、骨髄からの CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞分取

また、in vitro において、歯髄 CD31<sup>+</sup>SP 細胞は脂肪および骨髄 CD31<sup>+</sup>SP 細胞に比べ matrigel 上でより多く管腔構造を形成し、血管誘導能が優れていることが示唆された (Figure 2)。

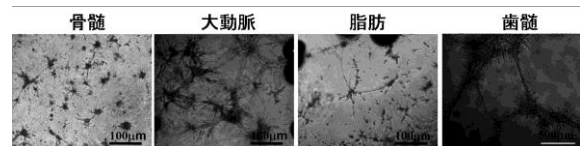


Figure 2 ブタ歯髄、大動脈、脂肪、骨髄 CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞の血管誘導

また、ブタ歯髄、大動脈、脂肪、骨髄組織より分取、培養した CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞のマイクロアレイ解析を行った。その結果、歯髄由来 CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞は他の組織に比べて血管誘導を促進するサイトカインである G-CSF や GM-CSF、MMP-3、NPY、RAMP1、STC1、TGFβ-1、TGFβ-3 の発現が高かった。このうち血管誘導因子 (G-CSF, GM-CSF, VEGF, MMP3) の mRNA 発現を Real-time RT-PCR にて比較した。歯髄 CD31<sup>+</sup>SP 細胞は脂肪および骨髄 CD31<sup>+</sup>SP 細胞に比べ血管誘導因子 (G-CSF, GM-CSF, TGF-β3, MMP3) の mRNA 発現が高かった (Table 1)。

	歯髄/骨髓	歯髄/大動脈	歯髄/脂肪
GM-CSF	106	16	80
G-CSF	21	23	16
MMP3	262	206	128
TGFB1	3	4	5
TGFB3	42	10	17

Table 1 Real-Time PCR による血管誘導因子 mRNA 発現比較

さらに、これらの細胞を下肢虚血マウスに移植して、in vivo における血管新生能の比較を行った。歯髄 CD31<sup>+</sup>SP 細胞は、骨髓 CD31<sup>+</sup>SP 細胞に比べて約 2 倍、脂肪 CD31<sup>+</sup>SP 細胞に比べ 1.2 倍血流量の増加がみられた。

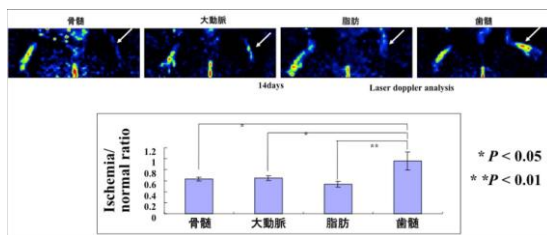


Figure 3 マウス下肢虚血モデル、ドップラー血流量測定。歯髄、大動脈、脂肪、骨髓 CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞移植 14 日目

また、BS-1-lectin 染色後血管新生密度を統計学的に解析すると歯髄 CD31<sup>+</sup>SP 細胞移植群は、骨髓 CD31<sup>+</sup>SP 細胞移植群に比べて約 1.5 倍、脂肪 CD31<sup>+</sup>SP 細胞移植群に比べ 3 倍の増加がみられた。

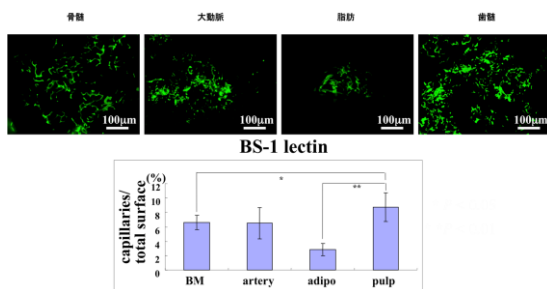


Figure 3 マウス下肢虚血モデル、BS-1 lectin 免疫染色。歯髄、大動脈、脂肪、骨髓 CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞移植 14 日目

これらの結果より、歯髄由来 CD34<sup>+</sup>;CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>SP 細胞は他の組織由来の細胞と比べて細胞移植による血管新生さらには歯髄再生に有効な細胞源となる可能性が示唆された。実際に他組織の幹細胞が歯髄再生に応用するには歯髄由来幹細胞と同等の血管新性能が必要であると考えられ、より血管新生能に優れた細胞を分取する必要

がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1 Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M. : A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. Stem Cells, 26, 2408-2418, 2008
- 2 天野一晴, 中島美砂子, 鄭力, 庵原耕一郎, 松井寛敬, 山崎雅人, 松下健二, 中村洋: ラット歯髄創傷治癒過程における MMP-3 の機能解析. 日本歯科保存学雑誌, 51, 602-613, 2008

[学会発表] (計 9 件)

- 1 Nakashima M, Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Wakita H, Nabekura J, Nakamura H, Into T, Matsushita K: A Potential New Cell Source for Vasculogenesis in Ischemia, CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup> Side Population Cells from Dental Pulp. The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting, Dec. 4, 2007, Washington, DC, USA
- 2 庵原耕一郎, 中村洋, 松下健二, 中島美砂子: 高い血管新生能を有する歯髄 CD31 陰性 SP 細胞を用いた歯髄再生. 日本歯科保存学会, 平成 19 年 11 月 8 日, 岡山
- 3 庵原耕一郎, 鄭力, 和気弘明, 伊藤正孝, 鍋倉淳一, 脇田英明, 中村洋, 引頭毅, 松下健二, 中島美砂子: 高い血管新生能を有する歯髄 CD31 陰性 SP 細胞による歯髄再生. 日本再生医療学会, 平成 20 年 3 月 12 日, 名古屋
- 4 中島美砂子, 庵原耕一郎: 歯髄幹細胞を用いた象牙質・歯髄再生—歯の延命化を目指して. 日本歯科放射線学会第 49 回学術大会. 平成 20 年 5 月 17 日, 名古屋
- 5 杉山昌彦, 庵原耕一郎, 脇田英明, 服部宇, 上田実, 中島美砂子: 歯髄 CD31 陰性 SP 細胞の歯髄および脳組織における神経・血管再生に対する効果の検討. 日本歯科保存学会, 平成 20 年 6 月 6 日, 新潟
- 6 Nakashima M, Iohara K.: Pulp Regeneration. 7<sup>th</sup> International Conference on Bone Morphogenetic Proteins. July. 12, 2008, Lake Tahoe, California
- 7 中島美砂子, 庵原耕一郎: 歯髄幹細胞を用いた血管・神経の再生医療. 第 53 回 (社) 日本口腔外科学会総会, 平成 20 年 10 月 20 日, 徳島
- 8 庵原耕一郎, 杉山昌彦, 中村さやか, 山田陽一, 上田実, 松下健二, 中村洋, 中島美砂子: 乳歯由来歯髄細胞は血管新生・神経再生を促進する. 日本歯科保存学会, 平成 20 年 11 月 6 日, 富山

9 Amano K, Nakashima M, Zheng L, Iohara K, Matsui H, Yamasaki M, Matsushita K, Nakamura H.: Enhanced wound healing by matrix metalloproteinase-3 after dental pulp amputation. Japanese Association for Dental Research, Nov. 30, 2008, Nagya

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

産業財産権の名称 根管充填材及び歯組織再生方法

発明者 中島美砂子 庵原耕一郎

権利者 ヒューマンサイエンス財団

産業財産権の種類、番号 特願 2008-63391

出願年月日 平成 20 年 3 月 12 日

国内・外国の別 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

庵原 耕一郎

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者