

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592411

研究課題名（和文）ヒト下顎第三大臼歯歯胚の間葉系幹細胞を用いた Biotooth の作製

研究課題名（英文） Culture of human dental stem cells from human mandibular third molars and its application of the recombinant tooth germ

研究代表者

間山 寿代（MAYAMA HISAYO）

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：90382639

研究成果の概要（和文）：ヒト下顎第三大臼歯歯胚から間葉細胞とエナメル上皮細胞を分離培養する技術の開発を行い、それらの細胞を再結合させ、SCID マウスに移植しヒト biotooth 作製の可能性を検討した。その結果、摘出したヒト第三大臼歯歯胚から得られたエナメル上皮細胞を、ヒトの歯の再生に用いる可能性を見出すことができた。また細胞を再結合させた移植実験において蕾状期歯胚様構造が観察されたことより、将来的に全てヒト細胞による biotooth の作製が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We attempted to isolate and culture of human dental epithelial stem cells and mesenchymal stem cells, and we examined the possibility of human tooth regeneration using these dental epithelial and mesenchymal stem cells. In order to investigate the possibility of tooth regeneration using these cells, we transplanted the recombinant dental lamina epithelial cells and dental papilla into the abdominal cavities of SCID mice. The epithelial cells had developed into dental epithelium resembling the bud stage. The present results suggest that human dental lamina cells are a useful source of dental epithelial stem cells for human tooth regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学，矯正・小児系歯学

キーワード：①歯学 ②再生医学 ③歯の再生 ④細胞・組織 ⑤biotooth

## 1. 研究開始当初の背景

国内外で報告されている biotooth は動物

から採取した細胞に由来しており、ヒト細胞を用いて成功した例は見られない。将来的に

患者への治療を目指して biotooth 研究を推進するには、ヒト細胞による biotooth の作製を実証する必要があると考えた。岩手医科大学附属病院歯科医療センター矯正歯科外来では、不正咬合治療後の咬合安定のために低年齢における（約8歳から）下顎第三大臼歯の歯胚摘出を行うケースがある。研究当初、ヒト間葉系幹細胞が永久歯や乳歯の歯髄に存在することが報告され、また、園山ら (PLoS ONE, 2006) は、多数の間葉系幹細胞が歯根未完成歯や下顎第三大臼歯の歯胚に存在することを示唆しており、本研究においてヒトの下顎第三大臼歯歯胚の間葉系幹細胞を用いて biotooth を作製することを目指し研究を開始した。

## 2. 研究の目的

(1) 下顎第三大臼歯の歯胚における間葉系幹細胞の選択的無血清培養法を確立する。

下顎第三大臼歯歯胚から biotooth の形成に必要な細胞数を確保するために、培養によって細胞数の増加をはかる。歯周組織再生に用いるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の培養にはヒト血清を必要とするため、患者から別に血清を採取する必要がある。我々の研究グループではマウス歯胚間葉系幹細胞の無血清培養条件を確立しているため、この条件を基本にさらに添加する細胞増殖因子や培養酸素濃度などに改良を加えながら、ヒト歯胚間葉系幹細胞の効果的な無血清培養方法を実現する。

(2) 下顎第三大臼歯の歯胚の間葉系幹細胞とエナメル上皮幹細胞を分離培養する技術を確立する。

本来歯は上皮間葉相互作用によって形成されるため、間葉系幹細胞を象牙芽細胞に分化誘導する能力を備えたエナメル上皮細胞を選択しておく必要がある。共同研究者の原田らはマウス切歯の形成端に間葉細胞の誘導能をもつエナメル上皮幹細胞を同定しており (J Cell Biol., 1999, Development, 2002)、マウスの上皮幹細胞と間葉系幹細胞による biotooth の作製に成功している。このことをふまえて、ヒト歯胚間葉系幹細胞と上皮幹細胞を分離培養する技術を確立する。

(3) 分離培養したヒト間葉細胞とヒト上皮細胞との組合せで biotooth の作製を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究は岩手医科大学歯学部倫理委員会の承認（倫理委員会承認番号01069）のもとに行い、実験に用いたマウスは岩手医大動物

実験委員会が定めた指針に基づいて使用した。試料には岩手医科大学附属病院歯科医療センター矯正歯科外来で、矯正治療中の8歳から12歳の患者より摘出した下顎第三大臼歯歯胚を用いた。

(2) 下顎第三大臼歯歯胚の免疫組織学的特徴の観察。

摘出した歯胚が歯の再生に用いることができるかを検証するために、摘出した歯胚を4%PFAにて24時間4℃にて固定後、歯胚を2分割し、通法に従いパラフィン包埋した。各パラフィンブロックより4μmの薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）の後、形態学的観察を行った。さらに、上皮幹細胞の存在を調べるために幹細胞表面マーカーに対する抗体、抗-p63 (Lab Vision) を用い免疫組織反応を行い、Alexa 488標識2次抗体 (Molecular probes) を用いて反応後、蛍光顕微鏡で観察した。

(3) 分離培養前の細胞を用いたマウスへの実験的移植上皮細胞と間葉細胞の分離培養の必要性を検討するため、上皮細胞と間葉細胞を分離せずに、組織工学的手法にて biotooth 作製を試みた。摘出した歯胚はただちに培養液（ペニシリン/ストレプトマイシン (in vitrogen:USA) を添加したDMEMに保存した。歯胚から硬組織を分離後、幼弱な歯髄部分をシャーレ (Falcon) に移し、メスを用いて細切した。1%コラゲナーゼ（和光純薬工業、大阪）と1%ディスパーゼ (invitrogen:USA) にて (1.5h, 37℃) 細胞を分散させた後、10%仔牛胎児血清 (FBS, BioSource International, USA) で洗浄後、残渣を除去し細胞を回収した。幹細胞用培地を加え細胞懸濁液を調整し、それらをコラーゲンスポンジに播種後、幹細胞用培地で37℃、2時間培養した。イソフル® (イソフルラン：大日本住友製薬、大阪) 吸入麻酔下で生後10週齢のSCIDマウス（日本クレア、東京）の左側腎臓相当部皮膚を切開し、腎被膜下に準備した担体を埋入した。1か月後、マウスを屠殺し移植片を摘出した。摘出した移植片は、4%PFA (24h, 4℃) にて固定後、10%EDTAで脱灰し通法に従いパラフィン包埋した。各パラフィンブロックより5μmの薄切切片を作製し、通法に従い脱パラフィン後、HE染色、免疫組織化学による形態学的観察を行った。抗体はサイトケラチン14、ビメンチン、象牙質シアロタンパク (DSP) を用いた。

(4) 歯胚の細胞培養と上皮細胞と間葉細胞の

分離.

細胞はDMEM/hamF12培養溶液, ビタミンA不添加B27, EGF (Epidermal growth factor), FGF (Fibroblast growth factor) - 2を添加した無血清完全合成培地を用い37°C, 5%CO<sub>2</sub>下で培養した. 培養液は2日毎に新しいものに交換した. 免疫細胞化学的に細胞特性を検証するために細胞はアセトン・エタノール (1 : 1) で固定を行い, 一次抗体として p63, CK14, CD133, Eカドヘリン, CD49fをAlexa488標識2次抗体を用いて反応後, 蛍光顕微鏡で観察した.

#### (5) 分離培養した細胞を用いた移植実験

歯小嚢に上皮細胞を播種した後, コラーゲンゲルにて包埋したものを一匹のSCIDマウスの腹腔内に一個埋入した. 1か月後, マウスを屠殺し移植片を摘出し, 4%PFAにて (24h, 4°C) 固定後, 通法に従いパラフィン包埋した. 各パラフィンブロックより4μmの薄切切片を作製し, 通法に従い脱パラフィン後, HE染色と, p63抗体を用いて先に記載した方法と同様に免疫化学的染色を行い観察した.

### 4. 研究成果

#### (1) 選択的無血清培養法の確立

マウス歯胚間葉系幹細胞ならびにマウスエナメル上皮細胞の培養条件を参考に, 添加する細胞増殖因子や培養酸素濃度などを改良後, ヒト歯胚間葉系幹細胞, ヒトエナメル上皮細胞に適した無血清培養方法を決定した. 歯胚をコラゲナーゼとディスパーゼにて細胞を分散させ, これらの細胞をDMEM/hamF12, EGF, FGF2, B27存在下で無血清培養を行った結果, 間葉細胞の培養に成功し, さらに培養1週間前後で上皮細胞のコロニーが形成された.

#### (2) ヒト下顎第三大臼歯の組織学的特徴

患者より摘出した下顎第三大臼歯歯胚は硬組織の形成が開始する前, または硬組織形成初期の組織学的特徴を示していた. 歯胚は摘出の際に細かく分断されていたが, 幼弱な硬組織の他に, 歯堤様の組織を含む上皮成分と歯乳頭 (歯髄) や歯小嚢の間葉組織とに区別することができた. また上皮幹細胞マーカーであるp63抗体によって免疫組織化学染色を施した後観察したところ, 所々に陽性細胞が観察された (図1).

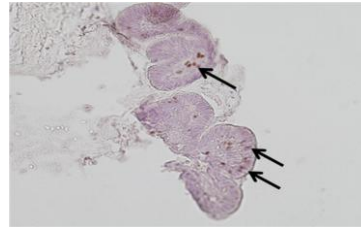


図1 組織中に遺残した歯堤上皮  
矢印はp63陽性細胞

#### (3) 間葉細胞と上皮細胞の分離培養

基本培地で培養しコンフルエントになった細胞から, 上皮細胞と間葉細胞を分離した. 0.25%Trypsin-EDTA処理後, ディッシュから剥がれた細胞を回収し, その後ディッシュを基本培地で洗浄した. ディッシュに残った細胞の性質を確認するため蛍光抗体法による免疫染色をおこなった. ディッシュに残った細胞のほとんどすべてはp63抗体, CK14抗体, CD133抗体に陽性反応を示し, さらに細胞の輪郭を成すようにEカドヘリン抗体, CD49f抗体にも陽性を示した. これらの結果から, 本研究の条件を用いてヒトエナメル上皮細胞のみを分離培養することが可能であり, ヒトエナメル上皮細胞はp63などを発現していたことから, ヒト歯原性上皮幹細胞の供給源として有効であることが示唆された.

#### (4) 摘出した移植片の組織学的特徴

ヒト歯小嚢に, 得られたヒト上皮細胞を播種し, コラーゲンゲルで包埋後, 埋入し, 1か月後に腎被膜下から摘出した移植組織片をHE染色にて組織学的検索を行った. また骨組織と類似した硬組織が島状に形成されていたこれらの組織について上皮系のマーカーであるCK14抗体にて免疫染色を行った結果, 移植組織内に散在する多数の細胞塊に陽性反応がみられた. また間葉系マーカーであるヒト特異的ビメンチン抗体で免疫染色を行ったところ, 突起を伸ばした細胞が陽性反応を示した. これらの硬組織の性質を確認するために, 象牙質シアロタンパク (DSP) 抗体を用いて染色を行ったところ, 象牙芽細胞様の細胞周囲の多くの組織が陽性反応を示した (図2矢印).

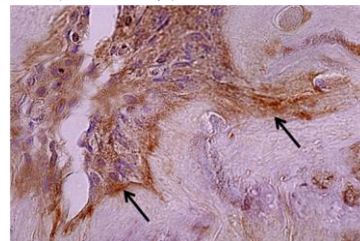


図2 象牙質シアロタンパク (DSP) 抗体により染色された組織

一方、腹腔内に移植した移植片には、骨様細胞像のみならず、円柱状上皮と星状網様細胞構造を持つ蕾状期歯胚様の組織像が確認された(図3A,B)。この組織についてp63抗体を用いて染色を行ったところ陽性反応が認められ(図3C)、ヒトエナメル上皮細胞が、歯の再生療法への適応が期待できることが示され、将来的に全てヒト細胞によるbio toothの作製が期待できることが示唆された。

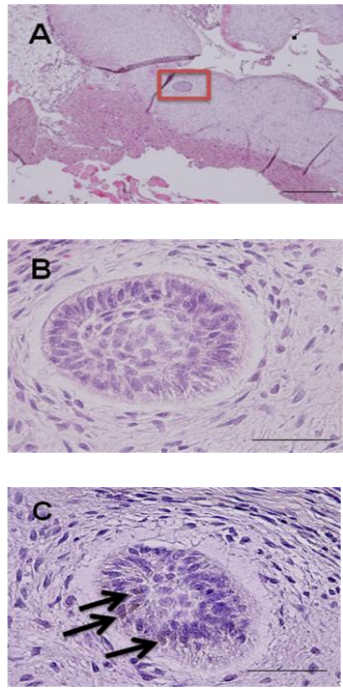


図2 移植1か月後に摘出した移植片のHE染色像

A:全体像 B:蕾状期に相当する組織構造が認められた。C:上皮幹細胞マーカーp63による免疫染色で陽性細胞が認められた(矢印) Bar=100 $\mu$ m

## 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3件)

① 間山寿代, 清野幸男, 三浦廣行: ヒト下顎第三大臼歯を用いたヒトエナメル上皮細胞培養法の確立と再生歯胚への可能性 日本小児歯科学会秋季大会 2010年12月2,3日(郡山市)

② Mayama, H., Fujiwara, N. Sasaki, A., Otsu, K., Harada, H., Miura, H. Cell culture of human dental epithelial cells and approach for regenerative dentistry .10<sup>th</sup> Tooth

Morphogenesis and Differentiation. September 1-4, 2010 (Berlin, Germany)

③ 間山寿代, 原田英光, 藤原尚樹, 三浦廣行: ヒト下顎第三大臼歯歯胚を用いたヒトエナメル上皮細胞の培養と再生への展開 第68回日本矯正歯科学会大会 2009年11月17日(福岡市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

間山 寿代 (MAYAMA HISAYO)  
岩手医科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 90382639

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号:

### (3) 連携研究者

原田 英光 (HARADA HIDEMITU)  
岩手医科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 70271210

藤原尚樹 (FUJIWARA NAOKI)  
岩手医科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 20190100

三浦廣行 (MIURA HIROYUKI)  
岩手医科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 00048563