

機関番号： 11301

研究種目： 若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20791380

研究課題名（和文） 歯胚由来幹細胞を応用した歯周組織再生マテリアルの開発

研究課題名（英文） Development of periodontal regenerative materials using mesenchymal stem cells in human wisdom tooth germs

研究代表者

西原 大輔 (NISHIHARA DAISUKE)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号： 10431587

研究成果の概要（和文）：

本研究ではティッシュエンジニアリング技法でのさらなる細胞の供給源として、ヒト智歯歯胚からの組織間葉系幹細胞の分離、培養を試みさらにはその特性についての検討を行なった。結果、歯根膜組織を再構築することを目的としティッシュエンジニアリングに用いる自己由来細胞のソースとしてヒト智歯由来の間葉系幹細胞が有用であることが示唆され、今後、スキャフォールドとの親和性等さらに検討を行うことが必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Mesenchymal stem cells have the possibility useful for the stem cell treatment and the tissue engineering. In this research, we examined characteristic of mesenchymal stem cells in human wisdom tooth germs. As a result, human wisdom tooth germs are useful for the stem cell treatment and the tissue engineering.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・保存治療系歯学

キーワード：ティッシュエンジニアリング

## 1. 研究開始当初の背景

近年、根面う蝕や歯根破折が多く認められる。これに対し、歯科においては接着性レジンを用いた保存修復処置がなされている。しかし、この方法により歯牙欠損部の回復は可能となるが、う蝕、もしくは歯根破折に起

因して破壊された天然歯根を取り巻く歯周支持組織、すなわち歯根膜組織や周囲歯槽骨組織の回復には至らず、歯肉の退縮や歯牙の動揺を引き起こすこととなる。一方、現在では種々の生体材料に自己の細胞や成長因子を応用したティッシュエンジニアリングの開発が試みられている。生体材料

としては、体内において分解、吸収されるコラーゲン、ポリ乳酸およびポリグリコール酸が臨床において使用され、また、エムドゲイン®や BMP をはじめとする成長因子もすでに導入されている。

細胞レベルでは、天然抜去歯から歯根膜組織や、歯肉組織を採取し歯根膜由来細胞及び歯肉線維細胞を分離、継代培養することが可能となっており、これまで当教室においてもセメント質や歯根膜組織を形成する可能性を有するとされる歯根膜由来幹細胞の分離、培養を行ってきた。本研究ではティッシュエンジニアリング技法でのさらなる細胞の供給源として、ヒト智歯歯胚からの組織間葉系幹細胞の分離、培養を試みる。

なお当教室では歯科治療時に用いられる各種レジン物の物性、特に歯質への接着性について詳細に検討している。また、歯根膜由来線維芽細胞の培養系は既に確立されており、コラーゲンを用いた立体培養に関する研究および歯根膜組織からの歯根膜由来幹細胞の分離、培養も行ってきた（歯根膜由来線維芽細胞の立体培養, 岩松洋子 他, 日歯保存誌, 45, 119, 2002）。さらにイヌを用いた実験において、歯根窩洞に歯根膜由来線維芽細胞を応用した場合、術後3ヶ月まで、その細胞の存在が確認され、歯根膜組織再生に関与している可能性が示唆された。（歯根修復に関する研究, 第7報 イヌ歯根窩洞への培養歯根膜由来線維芽細胞の播種による歯根膜およびセメント質形成の可能性, 平田政嗣 他, 日歯保存誌, 43, 555-563, 2000）。また、残存歯根膜組織に近接したかたちでチタンならびに歯根膜由来線維芽細胞を挿入すると、チタン表面にセメント質ならびに歯根膜が形成され

（歯根修復に関する研究, 第9報, 歯根修復に関する研究, マイクロキャリア培養法を応用した培養歯根膜細胞およびチタン片のイヌ歯根窩洞への埋入, 平田政嗣, 日歯保存誌, 44, 288, 2001）、細胞の足場としてマイクロキャリアが有効であることも分かっている（多孔質マイクロキャリアを用いた歯根膜由来線維芽細胞の培養, 平田政嗣 他, 日本バイオマテリアル学会雑誌, 21, 282, 2003）。さらに、架橋処理を加えたコラーゲンスポンジをラット顎骨および歯根の部分的欠損に適用することで、材料自体の強度の向上、吸収の遅延による生体適応への有用性を報告している（生体吸収材料上における培養ヒト歯根膜由来線維芽細胞の動態, 西原大輔 他, 日誌保存誌, 48, 185, 2005）（ラット歯根膜再生過程におけるコラーゲンスポンジの架橋の影響, 西舘都子 西原大輔 他, 日誌保存誌, 48, 508-506, 2005）。これらの研究成果を活かし、智歯歯胚由来幹細胞の分離培養、歯周組織再生を可能とする歯根修復バイオマテリアルの開発、応用を試みようとするもので

ある。

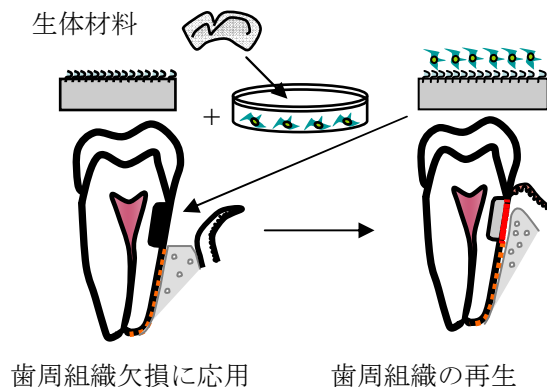
## 2. 研究の目的

細胞を源として組織を再生するにあたっては、幹細胞が重要な役割を果たすことが知られている。幹細胞は胚性幹細胞（ES 細胞）と組織幹細胞に分類される。

このうち、組織幹細胞はそれぞれの組織に存在する幹細胞で、ES 細胞に比べ分化段階が進んでいるとされ、細胞移植の際に分化誘導を必要としないこと、倫理的問題が少ないことが利点となる。ヒト智歯歯胚からの幹細胞の分離、培養系を確立することで、限られた量の歯根膜組織からの細胞抽出に比べ、より豊富な間葉系幹細胞の獲得が期待される。生体吸収材料の研究についても、これまでにポリ乳酸、ポリグリコール酸等の合成高分子材料や、天然高分子材料であるコラーゲンの歯根膜細胞との高い親和性を確認している。さらには、この高分子材料はその組成や架橋度合いをコントロールすることにより、生体内における吸収速度、さらには機械的強度を向上することが可能となっている。

これら生体材料に歯根膜由来幹細胞もしくは、ヒト智歯由来間葉系幹細胞を応用することで、歯周組織再生を可能とするティッシュエンジニアリング技法の確立を目的とする。

智歯歯胚からの細胞分離



## 3. 研究の方法

歯胚の提供については国立医療育成センターにおいて矯正学的理由により抜歯した智歯歯胚（年間約 30 症例）を培養液にて保存し、冷蔵にて東北大学歯学研究科へ送付する。実験には抜去された 8 歳から 12 歳までの埋伏智歯を用いる。

なお、歯胚提供者および保護者には事前に十分なインフォームドコンセントを得るものとする。

#### (1) ヒト智歯歯胚の組織学的検索

歯胚組織は 4%パラフォルムアルデヒドにて固定し、非脱灰のまま通法に従いパラフィン包埋ならびに凍結包埋する。試料切片を作製し間葉系幹細胞に特異的に交差する抗体を用いて免疫組織化学染色を施す。ヒト智歯歯胚内での幹細胞の局在分布を観察し分析を行う。

(2) ヒト智歯歯胚由来幹細胞の分離、培養  
ヒト智歯歯胚を酵素処理することで細胞レベルに分離する。細胞懸濁液中より幹細胞に発現する STRO-1、CD146 等に対するマーカーを使用し、二次抗体として磁性抗体を用い磁石装置により陽性細胞を回収、さらに継代培養を行う。

#### (3) ヒト智歯由来幹細胞の特性の分析

幹細胞の特性を分析するため、細胞分化後のアルカリフォスファターゼ活性分析や、ウエスタンブロットによるタンパク発現の解析を行う。また、細胞の増殖能を調べるため、細胞数の計測や BrdU の取り込みを測定する。さらにはコラーゲン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等の生体材料上において培養試験を行い、その動態を分析する。細胞の付着状態については、位相差顕微鏡あるいは走査型電子顕微鏡で観察する。また、アクチンフィラメントに特異的に結合するファロイジンや、細胞接着に関与するフィブロネクチン、FAK などの分子を免疫組織化学的に検出し、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察、考察する。

#### (4) 生体材料の検索と細胞親和性の確認

各種生体材料は、有機溶媒あるいは酸性溶液中に溶解し、凍結乾燥もしくは solvent cast 法により再生材料に適した構造を構築する。その際は材料の配合比、ポアサイズ等を換えることで、細胞育成に適した環境を追求する。コラーゲン材料はその架橋度合いによりまた、高分子材料は混合比により生体内での吸収速度、細胞親和性が大きく変化することを既に確認している。よって、導入細胞に最もよい環境を与えるとともに、生体材料自体の構造、強度についても検討を行い、過酷な口腔内環境においてもそのスペースと形態を維持し、スムーズに自己の組織と置換されることを目標とする。

## 4. 研究成果

ティッシュエンジニアリング材料に組み合わせるため、自己由来の細胞として大きな可能性を有すると考えるヒト智歯歯胚由来間葉系幹細胞についての検討を行った。

実験には矯正学的理由により抜去された 8 歳から 12 歳までの埋伏智歯を用いた。4%パラフォルムアルデヒドにて固定し、非脱灰

のまま、通法に従いパラフィン包埋ならびに凍結包埋、H-E 染色を施した。凍結切片は間葉系幹細胞に特異的に交差する抗体を用いて免疫組織化学染色を施した。

(用いた抗体は、STRO-1 (MAB1038; R&D Systems, Minneapolis, MN) ならびに CD146 (MAB16985X; Chemicon International, Temecula, CA) である。)

得られたヒト智歯歯胚は、歯冠の形成途上で歯根形成は開始していなかった。組織学的には Bell Stage に相当し、象牙前質の形成がみられたが石灰化はしていなかった。エナメル芽細胞の極性化はみられたが、エナメル質はまだ形成されていなかった。歯乳頭には血管が進入しており、ヘマトキシリン好性の基質で満たされていた。象牙芽細胞が配列していたが、その下にはまだ希薄層や稠密層は形成されていなかった。

STRO-1 および CD146 で染色した結果、いずれも特にエナメル芽細胞ならびに歯乳頭の血管周囲の細胞に強い発現を認めた。また、象牙芽細胞の一部にも陽性反応を認めた。

これよりこれまでの歯髄あるいは歯根膜の報告と同様、形成途上の歯乳頭においても間葉系幹細胞は血管周囲の細胞に存在していることが確認された。エナメル芽細胞にも強い発現がみられたが、これまでこうした報告はなく、今後さらに検討する必要があると考えられた。

細胞実験系では、抜去したヒト智歯歯胚をデイスパーゼ・コラゲナーゼ酵素下にて細胞単位まで分離回収し培養を行った。幹細胞マーカーとされる STRO-1 陽性細胞に対し、磁石抗体を応用した Dynabeads®を用い、分離回収をおこなった。

結果、全細胞にしめる間葉系幹細胞の割合は 6%であった。また、それら磁石抗体を再分離し、さらに培養を継続、細胞の増殖を確認している。さらに、抜去天然歯由来の歯根膜細胞から STRO-1 陽性細胞を分離し同様の実験を行った。その結果、回収率は 2.2%と有意に低かった。さらには歯胚由来の細胞は培養経過において ALP 活性及びタンパク量測定で歯根膜由来細胞に比べ高い値を示すことを確認した。

さらには培養環境として DMEM に代えて間葉系幹細胞培地 (MSCGM) を使用し分離培養を行っている。

MSGCM にて細胞を培養したところ DMEM に比べて細胞の増殖分化速度が増加することが確認された。また、細胞を軟骨誘導環境にて培養を継続したところ Alcian blue に染色されるマトリックスを形成し、また骨誘導

環境にて培養を継続したところ Alizarin red に染色されるノジュールを発現した。

以上より、歯根膜組織を再構築することを目的としてティッシュエンジニアリングに用いる自己由来細胞のソースとしてヒト智歯由来の間葉系幹細胞が有用であることが示唆され、今後、スキヤフォードとの親和性等さらに検討を行うことが必要と考えられた。

#### 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)

[学会発表] (計 3 件)

1) N.Endo, D.Nishihara, et al, The Influence of Mesenchymal Stem Cells Growth Medium for Isolation of STRO-1 Positive Cells from Human Periodontal Ligament, Interface Oral Health Science in Sendai, 2011.3.8、仙台

2) Y.Iwamatsu-Kobayashi, D.Nishihara, et al, Characterization of STRO-1 positive cells derived from Human Wisdom Tooth Germs. Interface Oral Health Science in Sendai, 2011.3.8、仙台

3) D.Nishihara, M.Hirata et al Isolation and comparison of mesenchymal stem cells derived from human wisdom tooth germs and periodontal ligament in vitro. Interface Oral Health Science in Sendai 2009.1.15、仙台

[図書] (計 1 件)

1) D.Nishihara et al, Isolation and comparison of mesenchymal stem cells derived from human wisdom tooth germs and periodontal ligament in vitro, Interface Oral Health Science, springer, 184-186, 2009

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

西原 大輔 ( NISHIHARA DAISUKE )  
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：10431587