

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10239

研究課題名（和文）歯髄幹細胞を用いた新規外傷治療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a novel trauma therapy using dental pulp stem cells

研究代表者

石坂 亮（Ishizaka, Ryo）

愛知学院大学・歯学部・歯学部研究員

研究者番号：00705197

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：小児歯科領域において外傷には頻繁に遭遇する。外傷による障害は広範囲におよぶため、症状も多岐にわたる。そのため、機能まで回復させる再生歯科治療の応用が求められる。過重力による細胞培養は分化を早めることが知られている。そこで、歯髄幹細胞を血管誘導する際のWnt10a、血管マーカー、象牙質マーカーの発現動態を比較することとした。wnt10aは歯髄において72時間までの分化初期に経時的に増加したが、3から21日目までは時間的特異性をもって発現していた。その動態は、初期では血管と長期間では象牙質と一致していた。またWnt10aの遺伝子レベルの発現は過重力によって早まっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療を適応するための問題点として、細胞の培養期間や費用の問題が挙げられる、本研究の結果から歯髄幹細胞が血管および象牙質へと分化成熟する際にwnt10aが関与していることが示唆された。またその発現は過重力により早まることが示唆された。本研究が完成すれば、分化した細胞を迅速かつ安定して供給できるようになる可能性がある。従って、細胞加工に対するコストを削減可能となる。より多くの症例に再生医療が適用可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Trauma is frequently encountered in the field of pediatric dentistry. Because of the wide range of disabilities caused by trauma, there is a wide spectrum of symptoms. Therefore, regenerative dentistry is required to restore function. It is known that hypergravitational cell culture accelerates differentiation. Therefore, we decided to compare the expression kinetics of Wnt10a, vascular and dentin markers during vascular induction of dental pulp stem cells. wnt10a increased transiently during early differentiation up to 72 hours in the dental pulp, but was expressed with temporal specificity from day 3 to 21. Its kinetics were consistent with vessels in the early period and dentin in the long term. The gene-level expression of Wnt10a was also accelerated by hypergravity.

研究分野：小児歯科学

キーワード：再生歯科治療 歯の外傷 過重力

1. 研究開始当初の背景

歯科臨床において歯の外傷には頻繁に遭遇する。外傷は歯牙、歯髄、歯周組織、歯槽骨まで広範に起こっており、さらに小児期では、後継永久歯との関係や幼弱永久歯の根形成量といった特殊性も加味しなければならない。特に、幼弱永久歯の歯牙完全脱臼に対しては再植が試みられるが、受傷から時間が経っていないこと、歯根膜細胞の汚染がないなどの条件が整っていなければ、先だって根管治療を行うことが多く、予後不良の経過を辿ることも少なくないと言われている。中でも、脱臼を伴う外傷の 15-59%に歯髄壊死が、18%に外部吸収が、5-24%に歯槽骨の吸収が見られるとされている。従って歯髄象牙質複合体、歯周組織、歯槽骨を含む複合的な再生療法の開発が急務であると考えた。

骨再生能は未分化な幹細胞の移植より分化させた細胞の移植の方が向上すると報告されている。微小重力培養装置は微小重力により分化を抑えて培養するだけでなく、2G、3G等の過重力を作り出すこともでき、過重力環境下では分化を促進することが可能であると報告されている。申請者らもこれまで、微小重力培養装置を使用し歯髄由来幹細胞を培養したところ、微小重力環境下ではその増殖能・遊走能が向上し、多分化能を維持することを確認している。さらに過重力環境下では同じ細胞であっても、分化促進が起こると報告されている。しかし、微小重力培養装置による同一細胞の分化誘導細胞と未分化細胞での再生能の比較は行われておらず、上清の解析も行われていない。また、申請者らはこれまで歯髄・歯根膜再生誘導因子を検索する中で、Wntを始めとした組織の発生・再生に必要なであるとされるシグナルが、部位および再生の時期により異なることを確認している。つまり複合的な組織の再生には適切な誘導因子の同定と組み合わせが必要であると考えられる。さらに、歯の外傷は時間との戦いの側面をもっており、培養期間を要する幹細胞移植では対応できない可能性も考えられる。

そこで複合的な組織の再生が必要となる外傷モデルを用い、未分化細胞と分化誘導細胞の再生能に差をもたらしているメカニズムの検討と、そこに関与する因子を網羅的に解析し、さらに遺伝子・タンパク発現を確認することで歯髄象牙質複合体・歯根膜・歯槽骨再生誘導因子の候補を挙げる。その後精製タンパクを外傷モデルへ移植することで、歯髄象牙質複合体・歯根膜・歯槽骨再生誘導因子の同定を行うという着想に至った。

2. 研究の目的

外傷による障害は、受傷歯はもちろん、歯槽骨を含む歯周組織にまで広範に起こっているため、歯髄・象牙質再生を目的とした再生歯内療法だけでは対応できず、外傷後の歯髄象牙質複合体、歯周組織、歯槽骨を含む複合的な再生療法の開発が急務であると言える。申請者らは未分化な間葉系幹細胞を使用し、歯髄・象牙質再生における最適な細胞源の検索を行ってきた。またその培養上清の解析により、歯髄・象牙質再生誘導因子の検索を行ってきた。一方骨再生においては、未分化な幹細胞の移植より分化させた細胞の移植の方が高い再生能をもつと報告されている。また、骨再生に必要な因子も多数報告されている。つまり、複合的な再生療法を必要とする外傷治療には、再生部位に応じた因子を特定し組み合わせる必要があると言える。そこで、重力制御培養下では同一の細胞から安定して未分化・分化細胞を得ることが可能であるため、外傷後の組織それぞれに対する再生治療に適正な細胞源と分化度の検索を行い、さらにその結果の比較から歯髄象牙質複合体・歯根膜・歯槽骨再生誘導因子の同定とそれらを複合した新規外傷治療法の開発を目的に本研究を行う。

3. 研究の方法

歯髄幹細胞を血管および象牙質へと誘導する。その RNA およびタンパクを、0, 4, 48, 72 時間および 7, 14, 21 日目で分離精製する。その後 RNA は q-PCR を、タンパクは western blotting および ELISA を行った。その際のマーカーは wnt10a および血管マーカーおよび象牙質マーカーとした。加えて同様の方法を過重力環境下で行った。次いで異所性歯根移植による再生歯髄において免疫組織染色と q-PCR を行う。この際上記と同様のマーカーを使用した。

4. 研究成果

(1) 象牙質誘導と血管誘導における歯髄幹細胞の Wnt10a および象牙質、血管マーカーの発現

象牙質誘導培地で培養された歯髄幹細胞に対し、象牙質マーカーである DSPP による免疫組織染色を行った。組織像を観察したところ、誘導開始 7 日目と 14 日目では DSPP の発現は認められなかった。誘導開始 21 日目にて DSPP 陽性細胞が細胞質に発現を示した。

象牙質誘導培地で培養された歯髄幹細胞から RNA を分離し、q-PCR の解析により分子生物学的解析を行った。その結果、DSPP の発現は象牙質誘導 7 日目の発現を基準に比較し、14 日目の発現との間に有意な差は認められなかった。また、誘導 7 日目を比較し 21 日目には 6.2 倍の発現量があり有意に高発現を示した。ついで、wnt10a の発現を解析したところ、誘導 14 日目が最も高く、その後は減少した。

血管誘導において、0~72時間の遺伝子発現は、wnt10aとVEGF、PCAM1で経時的に増加した。また誘導3~21では血管マーカーに有意な変化はなかったが、Wnt10aは遺伝子的にもタンパク的にも象牙質誘導の場合と同じ動態を示した。

(2) 再生歯髄組織におけるDSPP, lectinおよびwnt10a発現の時空間的特異性解析

まず、異所性歯根移植後の再生歯髄をDSPPにて免疫組織染色を行い、DSPPの局在性を解析した。移植7日目の根管内壁に並列した細胞群は認めず、DSPPの発現は見られなかった。また移植14日、移植21日目には根管内壁に並列した細胞群を認め、その細胞の突起を象牙細管内に伸展した像を示した。さらに、DSPPは並列した細胞内および近傍に発現を認めた。lectin陽性細胞は移植7日目の最も多く発現し、14日目には減少した。ついで、異所性歯根移植後の再生歯髄組織内のwnt10a陽性細胞数を計測し、歯髄再生量に対する割合を算出した。移植14日目の最も多く発現し、21日目には減少した。また象牙芽細胞、血管内皮細胞およびそれらの近傍に発現していた。つまり、時空間的特異性を示していた。

(3) 再生歯髄組織におけるDSPP及びwnt10aの分子生物学的評価

異所性歯根移植後回収した7日、14日、21日目の再生歯髄組織内におけるDSPP及びwnt10aの発現量をq-PCRにて解析し、その発現動態を評価した。

まずDSPPの発現量を解析したところ、移植7日目の発現量を基準とし、14日目のDSPPの発現量は7日目との間に有意な差は認められなかった。また21日目のDSPP発現量は7日目と比して4.1倍であり有意に高発現を示した。

次にwnt10aの発現量を解析したところ、7日目の発現量を基準とし、14日目の発現量は有意に高い発現量を示した。また21日目の発現量は7日目と同等となり、14日、21日目の間に有意な差を認めなかった。

(4) 過重力環境下における歯髄幹細胞の象牙質誘導と血管誘導でのWnt10a変化

1. と同様に歯髄幹細胞の誘導を行ったところ、wnt10a発現のピークは3日目となっており、7日目には減少した。

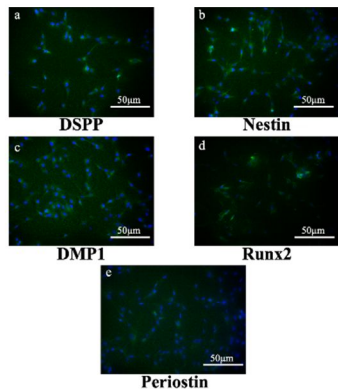
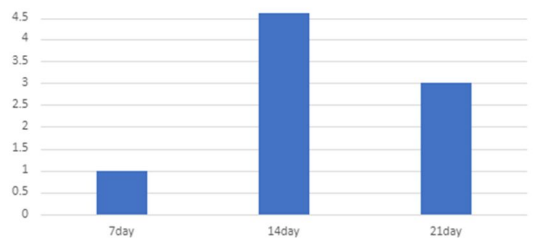


Fig1. Expression of DSPP, Nestin, DMP1, Runx2 and Periostin by dentin induction of dental pulp stem cells

Immunohistochemical staining images after the start of dentin induction 21 days. (Blue: Hoechst33342, Green: (a)DSPP, (b)Nestin, (c)DMP1, (d)Runx2 and (e)Periostin)

通常培養



Wnt10a発現動態

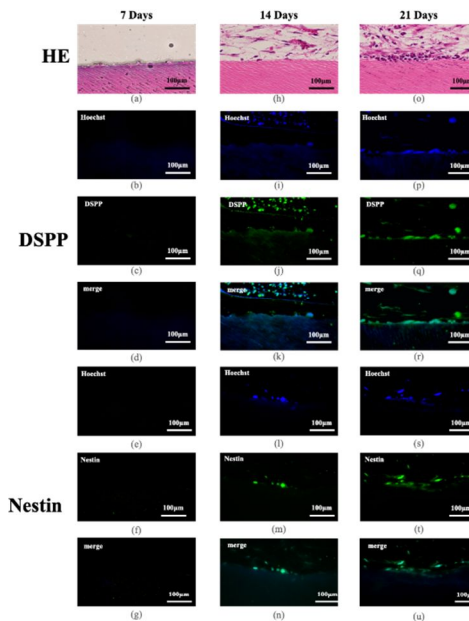
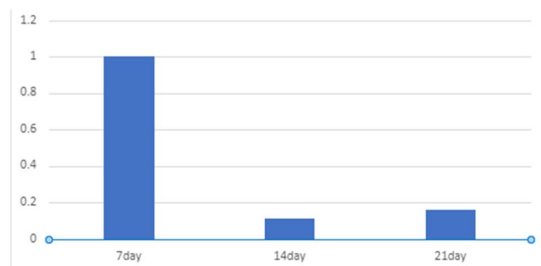


Fig.5 Expression of DSPP and Nestin in regenerated dental pulp tissue.

HE stained image of inner wall of regenerated pulp dentin (a, h, o). Immunohistochemical staining images of inner wall of regenerated pulp dentin. Blue: Hoechst33342(b, i, p), Green: DSPP(c, j, q), merge(d, k, r). Immunohistochemical staining images of inner wall of regenerated pulp dentin. Blue: Hoechst33342(e, l, s), Green: Nestin(f, m, t), merge(g, n, u)

過重力培養



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shintaro Sakatoku, Yuki Hayashi, Taku Futenma, Ryo Ishizaka, Chikako Gemba, Hiroyuki Nawa	4. 巻 32
2. 論文標題 Wnt10a Is a Candidate as a Non-Cellular Agent for Induction of Dental Pulp Regeneration with Dentine-Inducing Capacity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 41-48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhtb.32.41	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 玄番 千夏子, 林 勇輝, 酒徳 晋太郎, 石坂 亮, 名和 弘幸	4. 巻 59(3)
2. 論文標題 微小環境誘導因子を応用した新規外傷治療法の開発に向けた動物実験モデルの確立	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 愛知学院大学歯学会誌	6. 最初と最後の頁 195-202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 玄番 千夏子, 石坂 亮, 酒徳 晋太郎, 稲垣 絹世, 林 勇輝, 外山 敬久, 杉田 好彦, 前田 初彦, 名和 弘幸	4. 巻 59(2)
2. 論文標題 乳歯に突発性多発性内部吸収を認めた2症例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 愛知学院大学歯学会誌	6. 最初と最後の頁 99-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shintarou Sakatoku, Yuki Hayashi, Taku Futenma, Yoshihiko Sugita, Ryo Ishizaka, Hiroyuki Nawa, Koichiro Iohara	4. 巻 eCollection 2024.
2. 論文標題 Periostin Is a Candidate Regulator of the Host Microenvironment in Regeneration of Pulp and Dentin Complex and Periodontal Ligament in Transplantation with Stem Cell-Conditioned Medium	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 stem cells international	6. 最初と最後の頁 7685280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2024/7685280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Hayashi, Shintaro Sakatoku, Yoshihiko Sugita, Taku Futenma, Natsuki Iida, Keisuke Nakamura, Hiroyuki Nawa	4. 巻 32
2. 論文標題 A Potential Biomarker of Dental Pulp Regeneration: Wnt10a	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 197-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2485/jhtb.32.197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Futenma, Taku, Hayashi, Yuki, Iida, Natuki, Nakamura, Keisuke, Sakatoku, Shintarou, Nawa, Hiroyuki	4. 巻 32
2. 論文標題 Interaction of Pulp and Periodontal Ligament in Treatment of Trauma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 231-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2485/jhtb.32.231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 酒徳晋太郎, 林勇輝, 石坂亮, 名和弘幸
2. 発表標題 再生歯髄象牙質複合体におけるWntシグナルの遺伝子解析
3. 学会等名 第60回小児歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒徳晋太郎, 林勇輝, 中村圭祐, 名和弘幸
2. 発表標題 再生歯髄においてPeriostinは細胞遊走に關与する
3. 学会等名 第41回小児歯科学会 中部地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒徳晋太郎, 林勇輝, 石坂亮, 古橋実結菜, 玄番千夏子, 名和弘幸
2. 発表標題 再生歯髄象牙質複合体における Wntシグナルによる生体内相互作用メカニズムの解明
3. 学会等名 第59回小児歯科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒徳晋太郎, 林勇輝, 石坂亮, 古橋実結菜, 玄番千夏子, 名和弘幸
2. 発表標題 再生歯根膜における Wntシグナルによる生体内相互作用メカニズムの解明
3. 学会等名 第40回小児歯科学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	林 勇輝 (Hayashi Yuki) (10756547)	愛知学院大学・歯学部・講師 (33902)	
研究分担者	庵原 耕一郎 (Iohara Koichirou) (60435865)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・幹細胞再生医療研究部・室長 (83903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------