

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月18日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390498

研究課題名（和文）歯槽骨破壊を阻止するための新規治療法開発の基礎研究

研究課題名（英文）Basic research on development of new treatment of alveolar bone regeneration

研究代表者

宇田川 信之（UDAGAWA NOBUYUKI）

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70245801

研究成果の概要（和文）：現在、再生医療の材料としては、胚性幹細胞（ES 細胞）や人工多能性幹細胞（iPS 細胞）に注目が集まっている。しかしながら、これらの細胞を用いた再生医療においては、実用化に際して乗り越えなければならない壁が存在する。一方、「歯髄」は、脱落乳歯や歯科矯正治療における便宜抜去歯などから容易に採取可能であり、自己移植材料として有用と考えられる。我々はこれまでに、マウスの下顎切歯から採取した歯髄および歯根膜組織を用いた簡便な培養方法の確立を目指してきた。本研究では、これらの培養系をさらに発展させ、ヒト由来の歯髄細胞の培養系を確立し、これらの細胞の有用性を明らかにすることを目的として、臨床応用に向けた橋渡し研究として遂行した。その結果、ヒト歯髄から採取した細胞は高いアルカリホスファターゼ活性を有しており、*in vitro*において強力な石灰化能を有していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Dental pulp cells are considered to be a promising tool for the regeneration of hard tissues, due to their multipotency. The goal of the present study is to establish a simple method of regenerating hard tissue using dental pulp cells. Toward this end, we characterized dental pulp cells in comparison with osteoblasts and explored the mechanism of calcification. Mouse dental pulp cells exhibited strong alkaline phosphatase and extracellular matrix calcification activity even in the absence of exogenous rhBMP-2. A Genechip analysis showed the overall gene expression in dental pulp cells to be similar to that in osteoblasts, though dental pulp cells expressed higher levels of BMPs, annexin A8 (a Ca channel), and solute carrier protein 20a2 (Slc20a2) (a Pi transporter) than osteoblasts. The transplanted dental pulp cells into immunodeficiency mice exert bone regenerative activity *in vivo*. In addition, human dental pulp cells also exhibited strong alkaline phosphatase and extracellular matrix calcification activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2012年度	0	0	0
2013年度	0	0	0
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯槽骨・骨芽細胞・骨髄細胞・石灰化・骨再生・細胞移植・アルカリホスファターゼ・破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

高齢者における歯の喪失は、歯周疾患による歯槽骨吸収が大きな原因を占める。そして、歯の喪失は発音機能や咀嚼機能の低下を招き、全身の栄養状態やQOLの低下にもつながることが、高齢化社会の到来と共に問題となっている。歯の喪失部位には、常に歯槽骨吸収が惹起されるため、義歯の装着による咀嚼機能の回復は十分なものではない。

歯槽骨・歯根膜・歯肉結合組織を含む歯周組織の再生には、場（スキャホールド）、細胞、成長因子などのシグナルが重要であることが知られている（図1）。

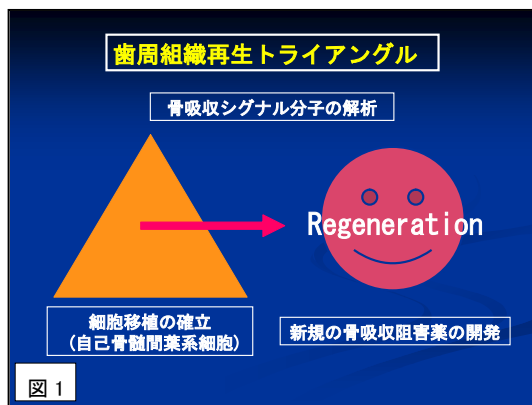


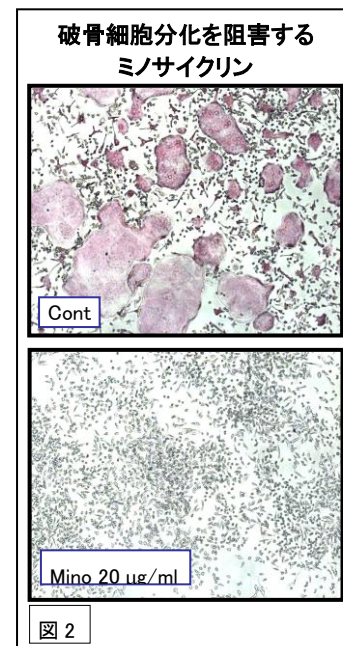
図1

さらに、口腔インプラントの埋入に際しては、歯槽骨の厚さが要求され、口腔インプラントの適応症例はかなり限定されている。したがって、インプラント埋入の適応拡大を目指して、歯槽骨の増生をはかるための上顎洞底挙上術（サイナスリフト）や歯槽堤形成術（GBR）が従来行われてきた。しかし、これらの外科的手術による骨増生には、長時間必要であることや、必ずしも全ての症例において成功が期待されないなど、問題点が指摘されている。特に高齢者に対するこれらの外科的手術の適応と成功が問題となっている。

現在、骨吸収抑制薬として最も有効な薬剤はビスフォスホネート（BP）である。しかし、BP投与に起因する顎骨壊死が報告され、歯科治療における重大な問題となっている。そこで、BPに代わる骨吸収抑制薬の開発が急務である。

我々はこれまでに、炎症性骨吸収において、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖（Lipopolysaccharide: LPS）による破骨細胞の分化および活性化が重要な位置を占めることを明らかにしてきた（J. Immunol. 172:2504-2510, 2004）。

さらに、LPSの骨芽細胞および破骨細胞に対する信号伝達にMyD88が必須であることを証明した（J. Exp. Med. 200:601-611, 2004）。また、テトラサイクリン系の抗菌薬剤として歯周病治療にも応用されているミノサイクリンの破骨細胞分化抑制作用を明らかにした（図2）。



本研究では、破骨細胞分化シグナル因子が免疫担当細胞に与える影響を明らかにする。起源を同一とする破骨細胞と樹状細胞の分化と活性化機構の違いを明らかにすることにより、破骨細胞特異的な新規の歯槽骨吸収阻害薬の開発を目指す。歯槽骨吸収の

予防及び残存する歯槽骨を保存する薬剤の開発は非常に重要である。また、細胞移植を用いた顎骨増生方法の確立は、重度の歯周病に対する画期的な治療法の開発に直結する。

2. 研究の目的

現在、再生医療の材料としては、胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）に注目が集まっている。しかしながら、これ

らの細胞を用いた再生医療においては、実用化に際して乗り越えなければならない壁が存在する。一方、「歯髄」は、脱落乳歯や歯科矯正治療における便宜抜去歯などから容易に採取可能であり、自己移植材料として有用と考えられる。我々はこれまでに、マウスの下顎切歯から採取した歯髄および歯根膜組織を用いた簡便な培養方法の確立を目指してきた。本研究では、これらの培養系をさらに発展させ、ヒト由来の歯髄細胞の培養系を確立し、これらの細胞の有用性を明らかにすることを目的として、臨床応用に向けた橋渡し研究として遂行した。その結果、ヒト歯髄から採取した細胞は高いアルカリホスファターゼ活性を有しており、*in vitro*において強力な石灰化能を有していることを明らかにした。以上の現象は、骨芽細胞では全く認められず、歯髄細胞の大きな特徴と考えられる。

本研究においては、歯周組織再生を目的として①歯槽骨吸収をブロックするシグナル伝達経路の解明と新規治療薬の開発、②歯周病モデルでの治療薬の評価、③自己骨髄細胞由来の間葉系細胞を用いた細胞移植療法の確立を目的として基礎的研究を遂行する。

3. 研究の方法

ヒト歯髄および歯根膜細胞の培養系を確立する。我々は現在、自己血清を用いたヒト骨髄細胞由来間葉系細胞の培養系を確立中である。この研究は、信州大学医学部附属病院先端細胞治療センター (Cell Processing Center : CPC) (連携研究者：下平滋隆 センター長) との共同研究である。そこで、このCPCを用いた細胞調製システムをさらに発展させ、歯髄や歯根膜組織を材料にした細胞培養システムを完成させる。

4. 研究成果

これまでに重篤な骨粗鬆症を呈する OPG 遺伝子欠損マウスを用いて、骨組織における骨代謝共役機構の存在様式について研究を行ってきた。OPG 欠損マウスは全身性の骨吸収の亢進と共に骨形成の促進が共役して認められるモデルである。このマウスを用いて、我々は、新規かつ簡便な歯槽骨吸収モデルを作製することに成功した。

ヒト由来の歯髄細胞の培養系を確立し、これらの細胞の有用性を明らかにすることを

目的として、臨床応用に向けた橋渡し研究として遂行した。その結果、ヒト歯髄から採取した細胞は高いアルカリホスファターゼ活性を有しており、*in vitro*において強力な石灰化能を有していることを明らかにした。以上の現象は、骨芽細胞では全く認められず、歯髄細胞の大きな特徴と考えられる。

自己血清を用いたヒト骨髄細胞由来間葉系細胞の培養系を確立し、上顎洞底挙上術 (サイナスリフト) における骨増生に対する細胞移植の効果について検討した。この研究は、信州大学医学部附属病院先端細胞治療センター (Cell Processing Center : CPC) との共同研究であり、現在までに 8 症例の患者に対する細胞移植治療を行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Furuya Y(1), Udagawa N(7) (他 7 名) : Increased bone mass in mice after a single injection of an anti-RANKL neutralizing antibody: evidence for a bone anabolic effect of PTH in mice with few osteoclasts. **J Biol Chem** (査読有) (in press), 2011
2. Muto A(1), Mizoguchi T(2), Udagawa N(3), Abiko Y(6), Nakamichi Y(10) (他 8 名) : Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. **J Bone Miner Res** (査読有) (in press), 2011
3. Nakamura I(1), Udagawa N(4) (他 3 名) : Regulation of osteoclast function. Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. **Modern Rheumatology** (査読有) (in press), 2011
4. Harada S(1), Nakamichi Y(4), Udagawa N(10) (他 9 名) : Daily administration of Eldecalcitol (ED-71), an active vitamin D analog, increases bone mineral density by suppressing RANKL expression in mouse. **J Bone Miner Res** (査読有) (in press), 2011
5. Nakayama T(1), Uehara S(5), Udagawa N(11) (他 8 名) : Polarized osteoclasts put marks of tartrate-resistant acid phosphatase on dentin slices -A simple method for identifying polarized osteoclasts-. **Bone** (査読有) (in press), 2011
6. Harada S(1), Nakamichi Y(4), Udagawa N(10) (他 9 名) : Daily administration of Eldecalcitol (ED-71), an active vitamin D analog, increases bone mineral density by suppressing RANKL expression in mouse trabecular bone. **J Bone Mineral Res** (査読有) (in

- press), 2011
7. Ikawa T(1), Nakamichi Y(5), Nakamura M(6), Uehara S(7), Udagawa N(9) (他 7 名) : Hypergravity suppresses bone resorption in ovariectomized rats. **Adv Space Res** (査読有) 47: 1214-1224, 2011
 8. Kariya Y(1), Nakamichi Y(6), Udagawa N(7) (他 5 名) : Rab27a and Rab27b are involved in stimulation - dependent RANKL release from secretory lysosomes in osteoblastic cells. **J Bone Miner Res** (査読有) 26:689-703, 2011
 9. Kanzaki S(1), Udagawa N(5) (他 7 名) : Impaired vibration of auditory ossicles in osteopetrotic mice. **Am J Pathol** (査読有) 178:1270-1278, 2011
 10. Oshita K(1), Udagawa N(他 7 名) : Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. **Arthritis Rheum** (査読有) 63:1658-1667, 2011
 11. Hashiguchi D(1), Nakamura M(3), Udagawa N(6) (他 3 名) : Mineral trioxide aggregate solution inhibits osteoclast differentiation through the maintenance of osteoprotegerin expression in osteoblasts. **J Biomed Mater Res** (査読有) 96A:358-364, 2011
 12. Naruse K(1), Udagawa N(5) (他 3 名) : Advanced alveolar bone resorption treated with implants, guided bone regeneration and synthetic grafting: case report. **Implant Dentistry** (査読有) 19:460-467, 2010
 13. Udagawa N, Yamashita T, Takahashi N : Identification of osteoclasts in culture. **Methods Mol Biol** (査読有) 690:273-284, 2010
 14. Aoki S(1), Nakamichi Y(4), Udagawa N(7) (他 5 名) : Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. **J Bone Miner Res** (査読有) 25:1907-1921, 2010
 15. Lee JW(1), Nakamichi Y(3), Udagawa N(4) (他 8 名) : Alisol-B, a novel phyto-steroid, suppresses the RANKL-induced osteoclast formation and prevents bone loss in mice. **Biochem. Pharmacol.** (査読有) 80:352-361, 2010
 16. Koide M(1), Udagawa N(4) (他 2 名) : Osteoclastic bone resorption induced by innate immune responses. **Periodontol 2000** (査読有) 54:235-246, 2010
 17. Kotake, S(1), Udagawa N(5) (他 9 名) : T-cell leukemia translocation-associated gene (TCTA) protein is required for human osteoclastogenesis. **Bone** (査読有) 45:627-639, 2009.
 18. Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N : Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr** (査読有) 19 : 61-72, 2009
 19. Takahashi M(1), Uehara S(3), Nakamichi Y(4), Udagawa N(8) (他 7 名) : Docetaxel inhibits bone resorption through suppression of osteoclast formation and function in different manners. **J Bone Miner Metab** (査読有) 27:24-35, 2009
 20. Uchiyama M, Nakamichi Y, Nakamura M, Kinugawa S, Yamada H, Udagawa N, Miyazawa H : Dental pulp and periodontal ligament cells support osteoclastic differentiation. **J Dent Res** (査読有) 9:609-614, 2009
 21. Kawahara I(1), Koide M(2), Udagawa N (4) (他 4 名) : The relationship between calcium accumulation in osteoclast mitochondrial granules and bone resorption. **Bone** (査読有) 45:980-986, 2009
 22. Tomimori Y(1), Koide M(3), Nakamichi Y(4), Udagawa N(6) (他 3 名) : Evaluation of pharmaceuticals with a novel fifty-hour animal model of bone loss. **J Bone Miner Res** (査読有) 24:1194-205, 2009
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
宇田川 信之 (UDAGAWA NOBUYUKI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号 : 70245801
 - (2) 研究分担者
小出 雅則 (KOIDE MASANORI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号 : 10367617
中村 美どり (NAKAMURA MIDORI)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号 : 90278177

中道 裕子 (NAKAMICHI YUUKO)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号 : 20350829

上原 俊介 (UEHARA SYUNSUKE)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号 : 90434480