

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：21300550

研究課題名（和文）歯髄細胞による硬組織再生機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of calcified tissue regeneration mechanism using dental pulp cells

研究代表者

宮沢 裕夫（MIYAZAWA HIROO）

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：90147637

研究成果の概要（和文）：マウス切歯より歯髄を採取し、培養歯髄細胞が有する各種の特異形質を RT-PCR 法により解析した。さらに、コラーゲンスポンジに浸漬して培養した歯髄細胞を、重度免疫不全マウス筋膜下に埋入し、その硬組織形成能について検討した。これらの歯髄細胞は、マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞と比較して ALP 活性が著しく高く認められ、カルシウムチャネルである annexin A8 およびリン酸トランスポーターである Slc20a2 mRNA の高い発現が認められた。軟エックス線撮影において、培養歯髄細胞の埋入部位に硬組織様の不透過像が認められ、組織学的に ALP 強陽性の骨芽細胞様の細胞と同部位に近接して酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ（TRAP）陽性の破骨細胞様細胞も認められた。

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.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012年度	0	0	0
2013年度	0	0	0
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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：歯髄細胞・歯根膜細胞・石灰化・骨形成・アルカリホスファターゼ・アリザリン
レッド染色・ウシ胎児血清・無血清培地

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省による患者調査概況（平成 17 年度）によると、総患者数における傷病分類の第 1 位が「歯および歯の支持組織の疾患」（約 986 万人）であり、口腔の機能障害や審美障害を回復する社会的要請が高い。

しかしながら、現在の歯科治療技術においては、これらの障害を回復させることができない症例も多数存在することも事実である。

そこで、歯髄や歯根膜細胞を用いた細胞移植療法を推進することにより、歯周病などが原因となる自然修復されない骨欠損や口腔機能の回復のために骨増生が必要な症例に対して、自己間葉系細胞移植術の確立を目指す。また、口唇口蓋裂の小児患者における先天的骨欠損の修復のための新規治療法の開発にもつながると考えている。

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」「歯根膜」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。

近年、脱落乳歯や抜去歯を液体窒素中に保存することにより、将来生じる骨欠損部への移植材料として保存するバンキング医療産業も確立しつつある。

我々はこれまでに、マウスの下顎前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、歯髄細胞と歯根膜細胞の有用性を明らかにすることを目的として、臨床応用に向けた基礎的研究として遂行する。

3. 研究の方法

マウスから採取した歯髄細胞は、骨芽細胞と比較して著しく高いアルカリホスファターゼ活性を有している。歯髄および歯根膜は *in vivo* において石灰化しない組織である。しかし、これらの培養細胞の移植により骨形成が可能となる。この理由としては、これらの組織には石灰化阻害因子が存在する可能性がある。

そこで、マウス由来の歯髄・歯根膜・歯槽骨から RNA を調製し、マイクロアレイ解析を行うことにより、骨形成促進および阻害因子候補をスクリーニングする。

4. 研究成果

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。近年、脱落乳歯や抜去歯を液体窒素中に保存することにより、将来生じる骨欠損部への移植材料として保存するバンキング医療産業も確立しつつある。我々は、歯科矯正の際に行われる便宜抜去により得られた歯から歯髄組織を取り出し、細切した組織をコラーゲンゲル内に埋入し歯髄組織からの細胞増殖を期待した。その結果、十分な数の歯髄由来の細胞を得ることが出来た。

歯髄細胞は骨芽細胞と比較して、著しく高いアルカリホスファターゼ活性を有し、骨誘導因子（BMP）の非存在下で石灰化可能であることを見出した。

また、マウス由来の歯髄細胞、骨芽細胞および骨髄間質細胞から RNA を調製し、マイクロアレイ解析を行うことにより、骨形成促進および阻害因子候補をスクリーニングしてきた。その実験結果から、歯髄細胞の有する高い石灰化能力は、カルシウムチャンネル（Anxa8）やリン酸トランスポーター（Slc20a2）の高発現、一方、MGP やピロリン酸合成酵素（ENPP1）の低発現などに起因する可能性が示された。

アルカリホスファターゼ、リン酸トランスポーター (Slc20a2)、カルシウムチャネル (Anxa8) の機能発現は、局所におけるカルシウムとリン酸の集積を惹起し、ヒドロキシアパタイト結晶を形成させると推測される。今回の研究においては、本来は石灰化しない組織を構成する歯髄細胞が *in vitro* で獲得する高い石灰化活性の制御機構について突破口を開いた。

将来的にこれらのヒト由来の細胞を再生医療の材料として応用するために、ウシ胎児血清 (FBS) と共に、ヒト間葉系幹細胞培養用に開発された無血清培地 (STEM PRO) を使用して培養を行った。さらに、歯髄細胞の対象群として、ヒト胎児由来間葉系初代細胞 (市販) を上記の条件で培養し、比較検討した。その結果、ヒト歯髄細胞において強いアルカリホスファターゼ活性を示すことが明らかとなった。ウシ胎児血清 (FBS) のみならず、無血清培地 (STEM PRO) においても歯髄細胞の強いアルカリホスファターゼ活性が認められた。石灰化能を検討するために、 β グリセロリン酸とアスコルビン酸を添加した培養液にて4週間培養したそれぞれの細胞に対してアリザリンレッド染色を行った。その結果、ヒト歯髄細胞のみならず歯根膜細胞においても強い石灰化が認められた。以上の実験結果を踏まえて、ヒト歯髄細胞を免疫不全マウス (RAG-1 欠損マウス) に移植して、硬組織形成能を解析する実験を現在行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 21 件)

1. 中村美どり, 宇田川信之: 骨粗鬆症と RANKL シグナル. **CLINICAL CALCIUM** (査読無) 21 : 1149-1155, 2011
2. Ikawa T(1), Nakamichi Y(5), Nakamura M(6), Udagawa N(9) (他 8 名) : Hypergravity suppresses bone resorption in ovariectomized rats. **Adv Space Res** (査読有) 47: 1214-1224, 2011
3. 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
4. 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
5. Muto A(1), Udagawa N(3), Abiko Y(6), Nakamichi Y(10) (他 9 名) : Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. **J Bone Miner Res** (査読有) (in press), 2011
6. 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
7. 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
8. Nakayama T(1), Udagawa N(11) (他 9 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 中村美どり, 中道裕子, 宇田川信之: 骨吸収と骨形成の調節機構の解明を目指す. **日本歯科評論** (査読無) 70 : 9-11, 2010
13. 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
14. 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
15. Utsuno H(1), Miyazawa H(5) (他 4名) : Facial soft tissue thickness in Japanese children. **Forensic Sci Int** (査読有) 199:109.e1-6, 2010
16. Utsuno H(1), Miyazawa H(6) (他 5名) : Pilot study of facial soft tissue thickness differences among three skeletal classes in Japanese females. **Forensic Sci Int** (査読有) 195:165.e1-5, 2010
17. 中村美どり(1), 宇田川信之(2) (他 4名) : ヒト自己培養骨髄間葉系細胞移植を用いた歯槽骨再生の可能性. **The Bone** (査読無) 23 : 303-309, 2009
18. 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
19. 中村美どり, 中道裕子, 中村浩志, 宇田川信之 : 破骨細胞の形成と骨吸収. **日本臨床** (査読無) 67 : 889-896, 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. Mizoguchi T(1), Udagawa N(3), Nakamura M(11), Nakamichi Y(12) (他 16名) : Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. **J. Cell Biol** (査読有) 184:541-554, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮沢 裕夫 (MIYAZAWA HIROO)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号 : 90147637

(2) 研究分担者

中村 浩志 (NAKAMURA HIROSHI)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号 : 00278178

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

宇田川 信之 (UDAGAWA NOBUYUKI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号 : 70245801