

## 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6月15日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592434

研究課題名（和文） 歯根膜から得た上皮細胞を用いた歯肉様再構成組織の免疫組織学的研究

研究課題名（英文） Immune-histological observations of reconstructed gingiva-like cultures using epithelial cells derived from PDL

研究代表者

五十嵐 勝（IGARASHI MASARU）

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号：90168104

研究成果の概要（和文）：本研究では、ブタ歯根膜とヘルトウィッチ上皮鞘から得た上皮細胞の分化と増殖を歯肉と比較した。コラーゲンゲル上で三次元気相培養を行ったところ、多層構造を示したが角化層はなく、2週間後から細胞に分散傾向が発現し、サイトケラチンの発現状態も異なることから、歯肉とは異なることが示された。免疫不全マウスに培養組織を移植したところ、周囲組織と癒痕を形成することなく移行的な良好な皮膚生着を示し移植の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：This investigation showed the comparison the differentiations and proliferations of the epithelial cells derived from periodontal ligaments or Hertwig's epithelial root sheath against to gingiva. The three dimensional organotypic cultures were incubated under air-liquid interface environment. The specimens showed that the multilayered epithelial structures without keratinization and the dispersing tendency of the cells in the epithelial layer were seen after 2 weeks incubation. The results showed that the reconstructed tissues were not similar to original gingiva. The continuous proper growth without scar after transplantation to immunodeficiency mice indicated the usefulness of transplantations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
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・保存治療系歯学

キーワード：歯根膜、上皮細胞、線維芽細胞、再構成培養、免疫染色、コラーゲンゲル、分化、移植、

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮細胞の細胞培養法は 1975 年に J. Rheinwald & H. Green らにより確立されて以来, Hennings や Ham などにより改良が行われ, 1990 年に Karger & Basal らによりヒト皮膚の再構成方法が報告された。その後, 研究代表者は Michigan 大学との共同研究により, 収縮することがないコラーゲンを使用した三次元組織培養法を行い, 再構成培養法の確立を行った。その方法で再生した皮膚と歯肉について, ケラチンをマーカーとした正常組織との分化増殖に関する検討を行い, その結果を 1999 年 2003 年 IADR 大会にて発表した。また, 2000 年 2002 年度日本歯科保存学会において, その術式と顕微鏡観察結果を報告しており, 本研究は組織再生法として先進的技術であり, 移植組織として, また上皮性疾患の原因究明に寄与する技術として評価されている。さらに本再生組織は大型の組織再生も可能であることを J Oral Pathol Med に Igarashi らは報告している (2003)。また, ブタの乳歯歯根面に付着した歯根膜から得られた培養細胞を使用し, 再生歯誌において経時的变化についても報告を行ってきた。

そこで, 抜歯歯根表面に付着している細胞の回収・増殖したのち, 三次元再構成培養により得られる組織は歯周疾患治療に用いられ, 遊離歯肉の代用として用いる可能性が出てきた。本研究は同家移植, 他家移植の可否を移植実験で判定すると推察される。

## 2. 研究の目的

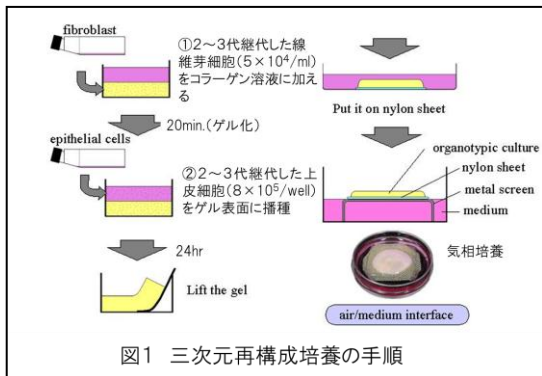
(1) 本研究では歯根未完成新鮮抜去歯から, 根尖部に存在するヘルトウィッヒ上皮細胞やマラッセの上皮細胞を分離培養するとともに, 歯根膜由来線維芽細胞を用いて三次元

再構成培養を行い, 歯肉様再構成組織をまず作ることを目的としている。そこで得られた組織をヌードマウス背部皮下に移植し, その後の組織変化を病理組織学的に将来の移植後の予後を検索することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞培養液には, 上皮細胞用培養液として FBS を 10% 添加した FAD-FBS, また線維芽細胞用として 10% FBS 添加 DMEM 液を自家調整して使用した。年齢 5 歳の幼若カンクイザルに全身麻酔を施し, 上顎犬歯を抜去後, 氷冷した FAD-FBS 内に初代培養まで保管した。歯根表面にある歯根膜組織を剝削して細胞を回収し, type IV コラーゲン塗布の Bio-Coat フラスコを用い, 3T3 cell を Mitomycin 処理して feeder layer とした混合培養で初代培養を行った。外生した娘細胞コロニーの形成状態を観察から, 上皮細胞と線維芽細胞を見分け, 初代培養により上皮細胞と線維芽細胞を得た。その後に継代培養を試みたところ, 細胞の増殖が十分に得られず, 3 継代目で細胞の増殖が停止したため三次元培養に必要な細胞数を確保することができなかった。そこで, 生後 6 か月のブタ乳臼歯を入手し, 同様の初代培養を行って得られた線維芽細胞と上皮細胞を用いることとした。線維芽細胞のラットコラーゲン内培養を行い, その上に上皮細胞を播種し, 気相培養を行った後に 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 日, 1, 2, 3, 4, 5 週で組織を取り出した。中性ホルマリン固定のパラフィン包埋および OCT コンパウンドでの凍結包埋を行ったのち, 凍結標本は  $-90^{\circ}\text{C}$  超低温槽に保存するとともに, 組織標本を HE 染色, 抗体染色を行い, 免疫組織学的観察を行った。結果, 培養細胞は 1 日目は島状の塊状であったものが, 経日的に層

状下を呈し、サイトケラチンに対し反応を示すようになった。

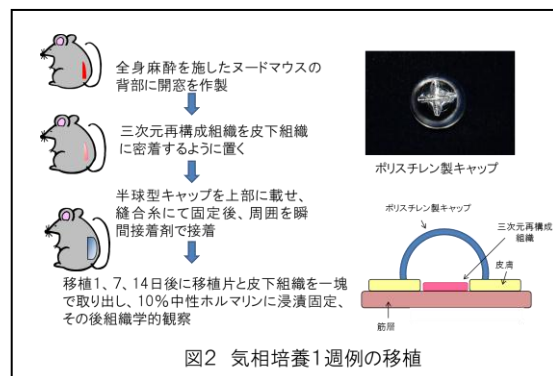


(2) 再度カニクイザルの上顎犬歯2本を抜去し、摘出6時間後に歯根膜組織を剔削回収し初代培養を開始したが、上皮系細胞の外生増殖が得られなかったため、同様の初代培養をブタの埋伏下顎第1大白歯を用いて行った。摘出埋伏歯の歯冠にある退化したエナメル器上皮を剥離除去後、歯根の形成のはじまった部分に相当する歯頸部周囲にあるヘルトウィッヒ上皮鞘(HES)を顕微鏡下で摘出しシャーレに播種した。約3週後に上皮細胞が外生し、その上皮細胞を回収し実験に供した。

上皮細胞をコラーゲンゲル上に播種し、一日静置、気相培養により三次元培養を行ったところ、線維芽細胞の存在がなくとも上皮細胞は重層化を示すことがわかった。その三次元再構成培養組織を1、2、3、4、5、6、7day、2、3、4wの実験期間で回収し、パラフィン包埋の後、連続切片の過酸化活性を抑制後、Cytokeratin19 (CK19)、PAN Cytokeratin (PCK)、Involucrin (IV)に対する免疫組織化学的検索を行った。

(3) 生後6カ月のブタ下顎骨を入手し、下顎第二乳臼歯を分割抜去後、歯根の中央部歯根膜組織を採取し、上皮細胞と線維芽細胞をブタ乳歯歯根膜から初代培養した。コラーゲンゲル内培養には2～3継代の線維芽細胞を用い、2～3継代した上皮細胞を

ゲル表面に播種し気相培養した。5週齢のヌードマウス(n=20)に全身麻酔を施し、背部にφ1cmの開窓を作製し、気相培養1週例の三次元培養組織を移植した。移植片は皮下組織に密着するように置き、φ14.5mmのポリスチレン製半球型キャップを載せ、周囲を接着剤で皮膚に貼り付けた。なお、開窓後キャップのみを応用したものをコントロールとした。実験期間を移植後1、3、7、14日とコントロールを含めた5群それぞれに4匹ずつマウスを用いた。実験終了後に移植片と皮下組織を一塊として取り出し、10%中性ホルマリンに浸漬固定した。その後厚さ6μmの連続パラフィン切片を作製し、HE染色および免疫染色を行い顕微鏡にて観察した。

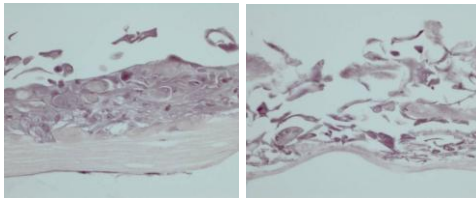


#### 4. 研究成果

(1) 年齢5歳の幼若カニクイザル上顎犬歯を抜去後、歯根膜組織を剔削して細胞を回収し初代培養を行った。外生した上皮細胞と線維芽細胞を得たが、3継代目で細胞の増殖が停止したため三次元培養に必要な細胞数を確保することができなかった。

そこで、生後6カ月のブタ乳臼歯から線維芽細胞と上皮細胞三次元培養後、サイトケラチンに対し反応を示すようになった。培養細胞は1日目に島状の塊状であったものが、経日的に層状下を呈し、サイトケラチンに対し反応を示すようになった。培養後1日目には

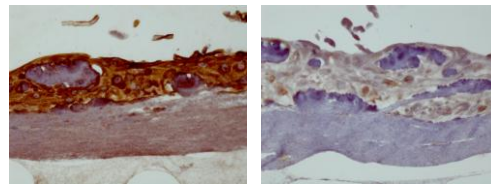
コラーゲンの厚さが減少したが、水平的な収縮は認められず、週の経過時でも培養組織の大きさにほとんど変化はみられなかった。歯肉上皮では基底細胞層から有棘細胞層、顆粒細胞層へと細胞の形態は次第に扁平化し、最表層ではHE、Azan、MTに強染する角化層がみられた。免疫染色では、これらの上皮層とその下層の結合組織層とともにCD44に反応を示し、強く染まる細胞がところどころに散在していた。上皮層はCD133には反応せず、結合組織層の特に上皮層直下に強い反応がみられた。LH8は結合組織層に強い反応がみられ、角化層直下の顆粒層にも弱い反応がみられた。



2週例と4週例のHE染色所見では細胞の散在が発現している。

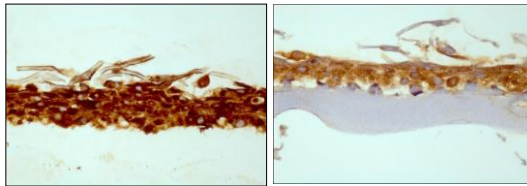
(2)ブタ歯肉のH-EとAzan染色では、歯肉上皮層は真皮との境界面にある基底層から上方に向かって細胞が徐々に扁平化し、顆粒層を経て、細胞小器官のみられない角化層へと移行し、その最表層の一部は剥離している。上皮層全層にわたりPan CKの発現がみられたが、CK19は非角化層である基底層にのみ弱い反応を示した。Involcurinは基底層から上層に向かって発現が増加したが、E-Cadherinの発現はみられず、Vimentinは結合組織層に限局して発現した。歯根膜由来の上皮細胞播種を行った3DCでは、コラーゲン上の全層にPan CKが発現した。1週では数層の厚みを持った上皮層が観察されたが、2週では上

皮細胞は散在する様相を呈した。CK19は、1週では弱い発現がみられたが、2週では明らかな反応はみられなかった。Involcurinの発現は、基底層から上方に向かって変化せず、1週、2週のH-EとAzan染色でも明らかなように、角化層は形成されなかった。E-Cadherinは発現しなかった。



1週例でPancyte keratin(左)は上皮層全体に、Involcurin(右)は上皮内に発現している。

(3)Hertwig上皮鞘(HES)の初代培養では、2週後に上皮細胞様の敷石状を示す外生細胞がみられた。三次元培養後の培養物は経時的に厚さが薄くなったが、大きさや色調の変化はみられなかった。HESの三次元培養組織は数層の多層構造を示すものの角化層はみられず、2週以降は上皮細胞の離散化所見がみられるようになった。組織学的には対照のブタ歯肉は表面に角化層があり、下層に顆粒層、棘細胞層、基底細胞層の層を伴う重層扁平上皮構造を呈していたが、3日、7日、3週における標本の代表例では明らかではなかった。免疫組織化学染色所見は、PCKでは対照と同様に全層で強い反応がみられたが、IVでは対照が基底層や周囲に発現がみられたのに対し、三次元培養では全層に発現がみられた。CK19ではわずかに表層に発現がみられたが、三次元培養ではわずかな発現で3週まではみられず、それ以降も弱いものであった。



Hertwig 上皮細胞の3週例では Pancytokeratin の発現と Involcurin 発現を示した。

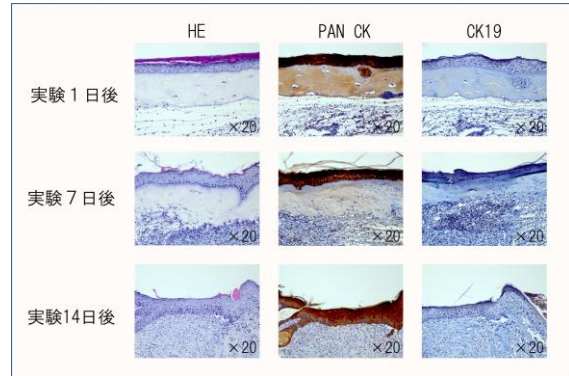
(4) 移植実験では、ブタ歯根膜の初代培養30日後に上皮細胞様の敷石状を示す外生細胞がみられ、線維芽細胞は14日後に外生した。それらの細胞を用いて三次元再構成培養組織を作成し移植実験を行った。

移植のないコントロール群では1日後には炎症性細胞浸潤がみられなかったが、経時的に線維化傾向が強くなった。14日後には周囲組織から上皮組織が再生され PAN CK に対し強染していた。一方、CK19 に対しての反応は基底細胞層でわずかにみられた。

移植実験群では、移植1日後で移植した組織に接している皮下組織にわずかな炎症性細胞浸潤がみられたが、表層は上皮細胞より成る数層の上皮層が確認され PAN CK に対して上皮層全層が強い反応を示した。移植7日後の HE 所見では線維芽細胞を含むコラーゲンゲルに接する上皮細胞の基底面にヘマトキシリンに濃染する核が比較的規則正しく配列され、また厚い上皮層が形成され上方にいくにつれて錯角化を生じ、最表層は剥離していた。CK19 に対してはわずかな反応がみられたが PAN CK に対し強い反応が観察され、その傾向は表層で顕著にみられた。移植14日後ではコントロール群の実験14日後に類似した上皮組織が観察され、HE 所見では上皮層の上方にいくにつれ細胞が扁平化し、核の消失が観察された。表層では PAN CK に対して強い反応がみられ、CK19 に対してもわずかな反応が観察された。

以上のことから移植した三次元再構成組織は、生着し上皮構造と類似した上皮形成が

行われたことが示された。



移植実験の結果、培養組織は周囲健全組織と融合しながら生着し、コラーゲンの吸収と皮下組織の形成を認めた。

##### 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)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計8件)

- (1) Masaru IGARASHI, Kayoko KITAJIMA, Kyoko ARAI : Three dimensional Culture of Epithelial Cells derived from Hertwig Epithelial Sheath , Japan China Dental Conference 2012, April 27<sup>th</sup>, 2012, West China College of Stomatology, Sichuan University.
- (2) Igarashi M, Kitajima K, Arai K, Yamada R: Histochemical observations of engrafted organotypic cultures using epithelial cells and fibroblasts derived from PDL, The 10th JEA-KAE Joint Scientific Meeting , Mar 24-25<sup>th</sup>, 2012, Seoul, SETEC.
- (3) 山田理絵, 松田浩一郎, 新井恭子, 北島佳代子, 五十嵐 勝 : ブタ乳歯歯根膜から得た上皮細胞を用いた三次元

再構成培養組織の移植後における免疫組織学的研究, 日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会 (第 135 回) プログラム及び講演抄録集: 35, 10 月 20 日, 2011. 大阪国際交流センター、大阪.

(<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jscd/member/pdf/abstract135/all.pdf>)

- (4) 五十嵐 勝、北島佳代子、新井恭子、山田理絵、松田浩一郎; ヘルトウィツヒ上皮鞘から得られた上皮様細胞を用いた三次元培養の免疫組織学的観察, 日本歯科保存学雑誌, 秋季学術大会 (第 133 回) プログラム及び講演抄録集, 166, 10 月 28 日, 2010. 長良川国際会議場. 岐阜.

(<http://wwwsoc.nii.ac.jp/jscd/member/pdf/abstract133/all.pdf>)

- (5) M. IGARASHI, K. KITAJIMA, and K. ARAI, Three-dimensional Culture of Epithelial Cells derived from Hertwig Epithelial Sheath, IADR, 88(Spec Iss C): 571, (IADR), July, 14-17<sup>th</sup>, 2010, Barcelona, CCIB, Spain .

(<http://www.dentalresearch.org>)

- (6) 北島佳代子、松田浩一郎、山田理絵、新井恭子、五十嵐 勝; 歯根膜から得た上皮細胞と線維芽細胞を用いた三次元培養の keratinization に関する免疫組織学的観察、日本歯科保存学会 2010 年度春季保存学会学術大会 (第 132 回) プログラムおよび講演抄録集, 142, 6 月 4-5 日, 2010 年, 崇城大学市民ホール、熊本.

- (7) Kayoko Kitajima, Kyoko Arai, Koichiro

Matsuda, Rie Yamada, Masaru Igarashi; Histochemical observations of the three-dimensional cultures using epithelial cells and fibroblasts derived from periodontal ligament; プログラムおよび抄録集 vol.11、No.1、42-43、8<sup>th</sup> JEA & KAE Joint Endodontic Meeting, 2010, March 27-28, BEXCO, Busan, Korea.

- (8) 北島佳代子、新井恭子、長谷川有紀、松田浩一郎、山田理絵、五十嵐 勝: 歯根膜から得た上皮細胞と線維芽細胞を用いた三次元培養に対する組織学的観察, 日本歯科保存学雑誌, 秋季学術大会 (第 131 回) プログラム及び講演抄録集, 211, 10 月 29-30 日、2009 年、仙台国際センター、仙台.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

五十嵐 勝 (IGARASHI MASARU)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号: 90168104

### (2) 研究分担者

北島 佳代子 (KITAJIMA KAYOKO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号: 00177841

新井 恭子 (ARAI KYOKO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号: 10434143