

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11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592515

研究課題名（和文） 歯髄細胞を用いた分化誘導因子を必要としない骨再生医療の開発

研究課題名（英文） Bone tissue engineering using dental pulp cells cultured without osteogenic differentiation induction.

研究代表者

山口 聡 (YAMAGUCHI SATOSHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00280628

研究成果の概要（和文）：これまでの骨再生医療研究では幹細胞を分化誘導し骨芽細胞を得ていたが、抜去歯牙より採取したヒト歯髄細胞は骨芽細胞への分化誘導を行わなくても、生体内で骨組織を形成できることを見いだした。また、ヒト歯髄細胞を無血清培地にて培養した場合でも、分化誘導を必要とせず骨様組織を形成した。本研究により歯髄細胞を用いた血清および分化誘導因子を必要としないこれまでにない安全で、簡易な骨再生医療の基礎を築けた。

研究成果の概要（英文）：In a common strategy of bone tissue engineering, stem cells are differentiated into osteoblastic cells using differentiation-inducing agents. This study showed that human dental pulp cells cultured without osteogenic differentiation induction possessed the capacity to generate bone tissues in vivo. Furthermore, human dental pulp cells expanded in serum-free condition formed bone-like tissues in vivo. These results lead to set up a simple and safety strategy of bone tissue engineering like not previous.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1200000	360000	1560000
2010年度	1000000	300000	1300000
2011年度	1300000	390000	1690000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：歯、歯髄、骨、再生医療

1. 研究開始当初の背景

自己の細胞を用いた再生医療研究が盛んに行われるようになり、臨床応用が待たれている。我々は再生医療の細胞供給源として歯に注目し、これまでに歯髄細胞は骨芽細胞への分化誘導が可能であり、生体内で骨を形成できる事を見いだしていた。

胞を骨芽細胞へ分化誘導する際にはデキサメタゾンや BMP などの分化誘導因子を用いていた。また、歯髄細胞の培養には牛胎児血清を用いていた。実際の再生医療を考えた場合、安全性は最も重要な点である。本研究では歯髄細胞を用いた安全で簡便な骨再生医療を目指し、分化誘導因子および牛胎児血清を用いない方法の開発を目的とした。

2. 研究の目的

これまでの我々の研究においては歯髄細

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

東京医科歯科大学歯学部附属病院口腔外科外来にて治療目的に抜歯された根未完成第3大臼歯を患者の承諾を得て用いた。歯髓組織の培養には以下の培地を用いた。

含血清培地 α -MEM, 10%ないしは20% FBS

無血清培地 StemPro(Gibco)

いずれの実験においてもBMP、デキサメタゾンなどの分化誘導因子は用いていない。

(2) アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

培養した歯髓細胞よりCell-Lytic-M mammalian cell lysis/Extraction reagent(Sigma)にてタンパク質を抽出し、LabAssay ALP(Wako)にて活性を測定した。

(3) RT-PCR

Isogen(Nippon Gene)にてRNAを抽出し、SuperScript One-Step RT-PCR(Invitrogen)を用いてRT-PCRを行った。

(4) 細胞移植

歯髓細胞を多孔性ハイドロキシアパタイト(HA)に播種し7日間 *in vitro* にて培養した後に、複合体(担体+細胞)を免疫不全動物の皮下または筋肉内に移植した。移植後12週目に複合体(担体+細胞)を取り出し、組織学的検討にて歯髓細胞の骨形成能を検討した。

(5) 免疫電顕

上述した細胞移植の場合と同様の方法にて複合体(担体+細胞)を動物より取り出し電顕用組織切片を作成し、ヒトオステオカルシン抗体、ヒトミトコンドリア抗体、ヒトI型コラーゲン抗体、2次抗体として金コロイド粒子の付いたヤギ抗マウスIgG+IgMを用いて免疫反応を行った。その切片をSEM(S-4500, Hitachi)、YAG backscattered detector(Hitachi)にて観察した。

4. 研究成果

(1) ヒト歯髓細胞のALP活性およびオステオカルシンの発現

分化誘導因子を用いない場合でも骨芽細胞への分化の指標となるALP活性は培養日数とともに上昇した(Fig.1 A)。また、骨芽細胞のマーカーであるオステオカルシンの発現をRT-PCR法にて調べたところ、発現が認められた(Fig.2 B,C)。また、その発現は培地の種類、血清濃度にかかわらず認められた。

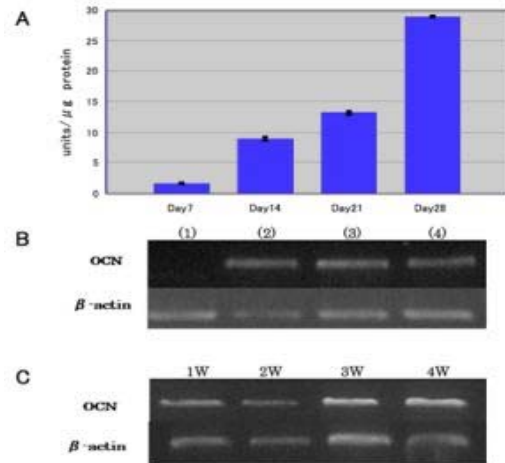


Figure 1

A 歯髓細胞のALP活性

B オステオカルシンの発現

1 歯肉線維芽細胞

2~4 歯髓細胞

培養条件 1, 3 α -MEM 20% FBS

2 DMEM 20% FBS

4 α -MEM 10% FBS

C 歯髓細胞のHA担体内でのオステオカルシンの発現(1~4週間後)

培養条件 α -MEM 20% FBS

(2) ヒト歯髓細胞による生体内での骨形成

ヒト歯髓細胞を分化誘導しないでHA担体に播種し、免疫不全マウスに移植したところ活発な骨形成が認められた(Fig.2)。細胞を播種していない担体内には骨形成は認められなかった。(Fig.2 control)。

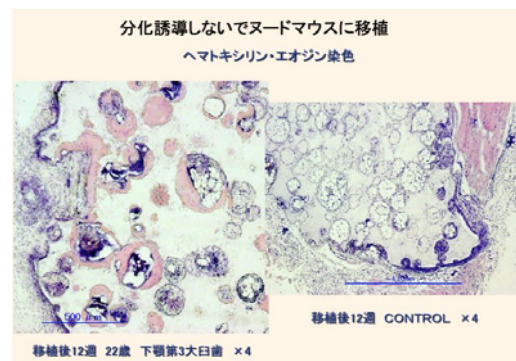


Figure 2

また、HA担体内に形成された骨組織は封入された骨細胞を持つ層板構造をしており、内部には骨髓様組織も認められた(Fig.3)。

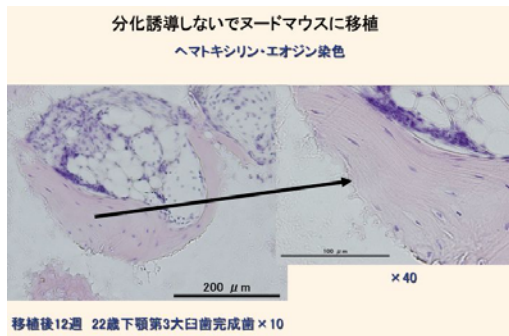


Figure 3

HA 担体内に形成された骨組織をマッソングールドナー染色したところ、骨組織の層板構造に平行に走行するコラーゲン繊維が染色された(Fig. 4)。

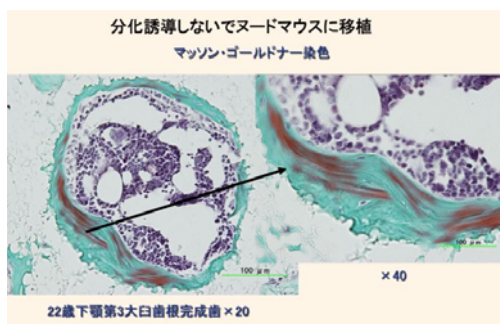


Figure 4

10 症例の歯髄細胞を培養し、HA 担体に播種し移植を試みたところ 10 症例全てにおいて骨組織形成が認められた(Table 1)。

10 症例中には根未完成歯からの歯髄細胞、根完成歯からの歯髄細胞の両方を含んでおり、細胞供給源としての歯の発生段階にかかわらず歯髄細胞は分化誘導因子を使用しないでも生体内で骨組織を形成することが、判明した(Table 1)。

歯髄細胞による分化誘導因子を必要としない骨形成

sample	性	年齢	歯	骨形成
1	F	22	根完成歯	+
2	F	27	根完成歯	+
3	M	24	根完成歯	+
4	F	18	根未完成歯	+
5	F	22	根完成歯	+
6	F	22	根未完成歯	+
7	M	15	根未完成歯	+
8	F	17	根未完成歯	+
9	F	21	根完成歯	+
10	M	20	根完成歯	+

Table 1

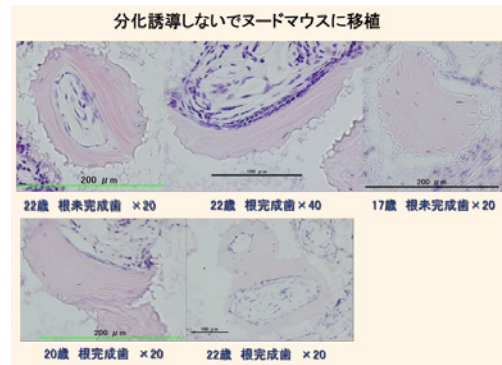


Figure 5

形成された骨組織においてヒトオステオカルシン抗体、ヒトミトコンドリア抗体、ヒトI型コラーゲン抗体を用いて免疫反応を行い電子顕微鏡にて観察したところ歯髄細胞が分泌していると思われる細胞外基質にいずれの抗体も反応した(Fig. 5)。移植したヒト歯髄細胞が HA 担体内に骨組織を形成した事を裏付ける結果となった。

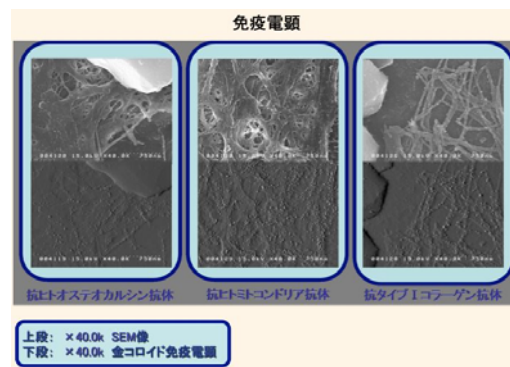


Figure 5

歯髄細胞を無血清培地にて培養し(分化誘導因子は使用していない) これまでと同様の方法にて免疫不全マウスに移植したところ骨様組織が形成された(Fig. 6)。しかし、含血清培地にて培養した細胞により形成された典型的な骨組織とは異なっていた。今後、この骨様組織に対する更なる解析が必要と思われる。

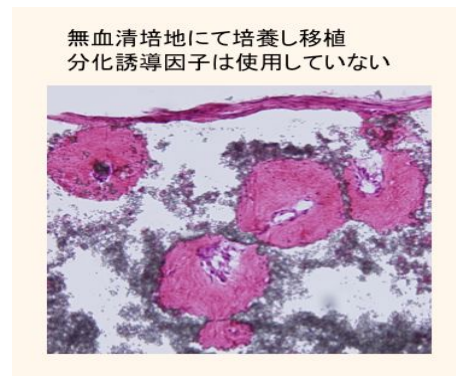


Figure 6

(3) まとめ

ヒト歯髄細胞は骨芽細胞への分化を誘導しないでも生体内で骨を形成できることが判明した。無血清培地にて培養したヒト歯髄細胞は骨様組織を形成するが、含血清培地で培養したヒト歯髄細胞が形成する典型的な骨組織とは異なった組織であった。今後、さらに研究を進め、血清、分化誘導を必要としない安全かつ単純な骨再生医療法を開発し、臨床応用したいと考えている。

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7件)

- (1) Hamada K., Yamaguchi S., Abe S., Ichinose S., Abe T., Yamashita Y., Amagasa T.
In vivo formation by human dental pulp cells cultured without cell sorting and osteogenic differentiation induction. Journal of Oral Tissue Engineering. 7(1):15-25, 2009 (査読有)
- (2) Shigeishi H., Yamaguchi S., Mizuta k., Nakakuki K., Fujimoto S., Amagasa T., Kamata N.
Amphiregulin induces proliferative activities in osseous dysplasia. Journal of Dental Research 88(6):563-568, 2009 (査読有)
- (3) Abe s., Hamada k., Yamaguchi S., Amagasa T., Miura M.
Characterization of the radioresponse of human apical-papilla derived cells. Stem Cell Res. Therap. 2:2, 2011 doi:10.1186/scrt43(査読有)
- (4) 阿部成宏、山口聰、濱田啓一、天笠光雄、三浦雅彦 放射線による歯根形成阻害メカニズム 放射線生物研究 44(4):460-471, 2009(査読有)
- (5) 山口聰、阿部成宏、濱田啓一、天笠光雄 歯髄細胞の分化能と再生医療への応用 日本口腔組織培養学会雑誌 18(1):35-36, 2009 (査読無)
- (6) 山口聰、阿部成宏、濱田啓一、天笠光雄 ヒト根未完成歯根尖部歯髄組織由来細胞は神経堤幹細胞様の性質を持つ 日本口腔組織培養学会雑誌 19(1):37-38, 2010 (査読無)
- (7) 阿部成宏、濱田啓一、山口聰、天笠光雄 放射線による歯根形成阻害メカニズムの検討 日本口腔組織培養学会雑誌 20(1):41-41, 2011 (査読無)

[学会発表] (計5件)

- (1) 山口聰、阿部成宏、濱田啓一、天笠光雄 ヒト根未完成歯根尖部歯髄組織由来細胞は神経堤幹細胞様の性質を持つ 第45回日本口腔組織培養学会 2009年12月9日 東京
- (2) 濱田啓一、山口聰、天笠光雄 ヒト歯髄細胞を用いた骨再生医療における β -TCPの有用性 第54回日本口腔外科学会 2009年10月10日 札幌
- (3) 阿部成宏、山口聰、濱田啓一、天笠光雄 放射線による歯根形成阻害メカニズム 第46回日本口腔組織培養学会 2010年11月13日 高知
- (4) 山口聰、阿部成宏、濱田啓一、天笠光雄 分化誘導因子を必要としないヒト歯髄組織由来細胞による骨組織形成 第8回日本歯科再生医療学会 2010年10月30日 名古屋
- (5) 阿部成宏、濱田啓一、山口聰、天笠光雄 山城正司 ヒト根未完成歯・根尖部歯髄由来細胞の放射線生物学的検討 第56回日本口腔外科学会 2011年10月21日 大阪

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口聰 (YAMAGUCHI SATOSHI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研
究科・助教
研究者番号：00280628

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：