

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（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592615

研究課題名（和文）歯髄・歯根膜細胞を用いた顎骨再生医療を目指した基礎研究

研究課題名（英文）Basic research on bone regenerative medicine using dental pulp cells and periodontal ligament cells

研究代表者

中村 美どり（NAKAMURA MIDORI）

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90278177

研究成果の概要（和文）：マウスの歯髄から採取した細胞は、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おり、in vitro（細胞培養実験）および in vivo（動物細胞移植実験）において強力な石灰化能を有していることが明らかとなった。また、ヒト歯髄細胞と歯根膜細胞の細胞培養系を確立し、強いアルカリホスファターゼ活性と石灰化能を保持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. Mouse dental pulp cells exhibited strong alkaline phosphatase and extracellular matrix calcification activity even in the absence of exogenous rhBMP-2. 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	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	0	0	0
2013年度	0	0	0
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

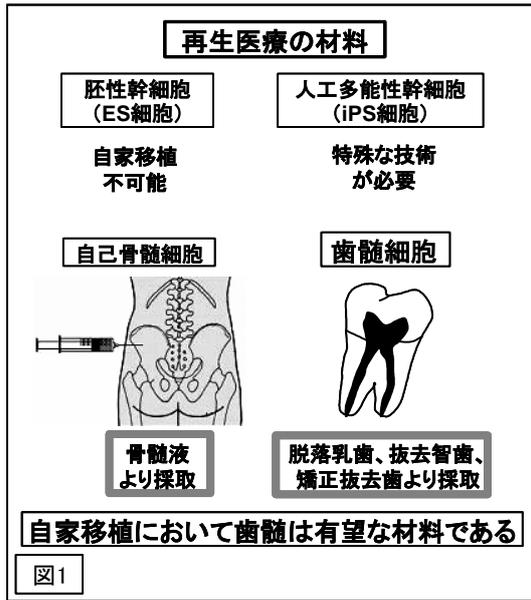
キーワード：歯髄細胞・歯根膜細胞・カーボンナノチューブ・石灰化・BMP・Wnt シグナル・マウス・ヒト

1. 研究開始当初の背景

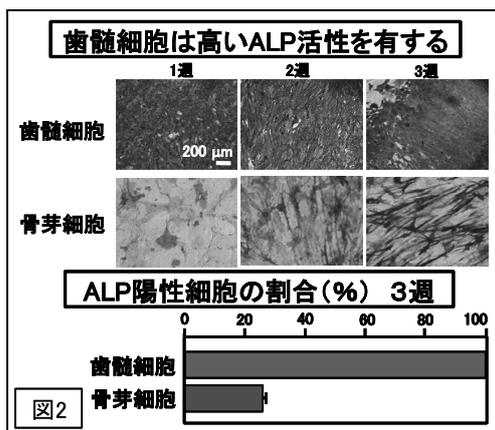
再生医療の材料としては、胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）に注目が集まっている。しかしながら、これらの

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(図1)。



我々はこれまでに、マウスの下顎切歯から採取した歯髓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。その結果、マウス歯髓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* および *in vivo* において強力な石灰化能を有していることが明らかとなった(図2)。これらの培養系をさらに発展させ、ヒト由来の歯髓細胞および歯根膜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する。



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、歯髓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性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。

我々は既に、Ca/Pモル比を変えた非晶質リン酸カルシウムを加熱処理し、結晶化度の高いアルカリ性を有する球状ヒドロキシアパタイトを試作した。そして、このアパタイトが骨芽細胞の分化に対して強い促進活性を有することを明らかにした(J Hard Tissue Biology 17: 37-46, 2008)。これらの新規材料(スキャホールド)と細胞の両者を利用した骨再生療法の確立は、社会的な期待が大きいと考えられる。

以上のように本研究では、これまでに得られた我々の実験結果を基盤として実験計画を策定・遂行する。乳歯や抜去歯を利用することにより、新規の骨増生療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

マウスの歯髓細胞をアスコルビン酸とβグリセロリン酸の存在下で培養することにより、骨誘導因子(BMP-2)の非存在下において、著しい石灰化活性を有していることを見いだした。この石灰化は、BMPシグナルとWntシグナルに対するそれぞれの特異的阻害剤の添加によっても全く阻害されなかった。以上の現象は、骨芽細胞では全く認められず、歯髓細胞の大きな特徴と考えられる。我々はこれまでに、マウスの下顎前歯から採取した歯髓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。その結果、マウス歯髓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* および *in vivo* において強力な石灰化能を有していることが明らかとなった。

本研究では、これらの培養系をさらに発展させ、歯髓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

(1) 多層カーボンナノチューブの歯髄細胞に対する効果の検討

歯科臨床における歯槽骨増生においては、各種生体材料が使用されている。整形外科領域において臨床応用が検討されている多層カーボンナノチューブのマウス由来の歯髄細胞および歯根膜細胞に対する石灰化促進作用について検討する。

(2) ヒト歯髄および歯根膜細胞の培養系の確立

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

現在までの我々の実験結果から、マウス由来の骨芽細胞培養系に多層カーボンナノチューブ:MWCNT (VGCF-Sを使用)を添加すると、通常より早期に石灰化が起こることを明らかにした。さらに、MWCNTはin vivoにおいても、石灰化に対して促進的に作用することも実証した。また我々は、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を確立した。その結果、マウス歯髄から採取した細胞は、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おり、in vitro および in vivoにおいて強力な石灰化能を有していることを明らかとした。歯髄細胞の有する高い石灰化能は、BMPシグナルとWntシグナルに対するそれぞれの特異的阻害剤の添加によっても全く阻害されなかった。この現象は、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。

多層カーボンナノチューブの石灰化に対する影響について検討するために、ヒト抜去歯由来の歯髄細胞培養系の確立を行った。ヒト抜去歯由来の歯髄細胞と歯根膜細胞および胎児由来の間葉系細胞を各種条件(コラーゲンやビトロネクチンをコートしたディッシュ)で3週間培養した結果、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。アルカリホスファターゼに対するコラーゲンやビトロネクチンコートの効果は認められなかった。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。さらに、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。

本研究課題の遂行により、マウスのみならずヒト由来の歯髄細胞および歯根膜細胞の高い石灰化能を明らかにした。これらの細胞を再生医療に活用するための基礎実験結果を十分に得ることが出来た。

現在我々の研究グループが行っている自己骨髄間質細胞を用いた細胞移植に関する臨床研究について、歯髄細胞を用いて推進するための基盤を確立した。今後は歯髄細胞を用いた臨床応用を目指した研究として推進していきたい。

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

中村 美どり (NAKAMURA MIDORI)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号 : 90278177

(2) 研究分担者

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

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

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