

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791848

研究課題名(和文) 乳歯歯髄の幹細胞特性を応用した組織工学的新規う蝕・歯周治療法の開発  
 研究課題名(英文) Characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) for mineralized tissue regeneration

## 研究代表者

中村 さやか (NAKAMURA SAYAKA)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40437033

研究成果の概要(和文)：近年、歯髄から得られる歯髄幹細胞は歯科領域のみならず、全身疾患への有効性も報告され、注目を集めている。本研究では、非侵襲的に容易に採取可能である乳歯歯髄細胞に特に注目して、その特性の検討を行った。その結果、乳歯歯髄細胞は幹細胞特性を有し、高い増殖能を示し、骨・象牙質形成能を有することが明らかとなった。乳歯が歯槽骨、象牙質の再生に有用な細胞源となりうることを示されたことから、今後乳歯歯髄を用いた新規う蝕・歯周治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) have been identified as a novel population of stem cells. In this study, we focused on the characterization and possibility of mineralized tissue regeneration using SHED. These results suggested that SHED possesses adequate osteogenic/odontogenic capacity and is able to provide enough number of cells for clinical application easily because of high proliferation capacity. SHED that is generally discarded as medical waste and can be obtained without any invasion could be useful cell source for mineralized tissue formation.

## 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	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：再生医療・歯髄・乳歯

## 1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療は失われた組織、臓器に対する治療法として注目を集め、人工材料を用いた修復治療や臓器ドナー不足等の問題を抱えている移植治療に代替する医療として、進歩を続けている。現在、実際に臨床応用され、実用化されている再生医療としてあげられるのは、間葉系幹細胞を用いた骨軟骨疾患治療、造血系幹細胞を用いた白血病治療などの体性幹細胞を用いた方法である。申請者らは

これまでに骨髄由来未分化間葉系幹細胞(BMMSCs)を応用して骨再生技術を開発し、名古屋大学医学部倫理委員会承認後、歯周病やインプラントなどへ臨床応用を行い、良好な結果を得ている(Tissue Eng Part A: 14(10): 1699-1707, 2008)。幹細胞供給源としては、骨髄や臍帯血があげられるが、ドナーへの侵襲・負担面での問題や、骨髄は加齢に伴い幹細胞数が減少することなど適応が限られていることなどから十分な量が確保

されているとは言い難く、幹細胞の新たな供給源の確立が求められてきている。一方、歯科領域においては、歯周疾患に対する治療として歯周組織再生療法があげられるが、いまだ適応範囲に限界があることや効果が不確実であることなどから、さらなる改善が求められている。また、う蝕治療に関しては、元来の人工材料を用いた修復治療の域を脱しておらず、二次う蝕になりやすいことや無髄歯は破折のリスクが高いことなどの問題がある。

## 2. 研究の目的

近年、歯髄には間葉系幹細胞である歯髄幹細胞 Dental pulp stem cells (DPSCs)が存在することが報告されている (PNAS97:13625-30, 2000, PNAS 100:5807-5812, 2003)。これまで、永久歯 DPSCs の研究が進められ、DPSCs は骨芽細胞、象牙芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などへの多分化能を有し、骨髄由来幹細胞と同等に間葉系幹細胞特異的な表面抗原を発現していることが明らかにされている (Biomaterials 27(20):3766-81, 2006)。また、in vivoにおいて DPSCs を移植することにより象牙質様組織や骨様組織が新生されることが報告されている。そこで、申請者は永久歯よりも細胞源としての利点が多い乳歯の歯髄幹細胞 SHED の特性について解析し、象牙質・歯髄複合体および歯槽骨等の顎顔面領域の組織再生への応用を検討することにより、現存する人工材料を用いた修復治療ではなく、自己の細胞を用いた安全かつ効率的な新規治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄幹細胞培養：名古屋大学医学部倫理委員会の承認後、患者への説明と同意を文書にて得て、ヒト抜去乳歯および永久歯（智歯等）より歯髄組織を摘出後、酵素処理により、通法に従って歯髄幹細胞 SHED および DPSCs を単離・培養した。

(2) 歯髄幹細胞特性の検討：フローサイトメトリーにて、SHED および DPSCs の幹細胞表面マーカーの発現について、比較検討した。また、同細胞を用いて、間葉系幹細胞マーカーの一つと報告されている STRO-1 の免疫染色を行った。さらに、BrdU 細胞増殖アッセイにより、増殖能を比較検討した。

(3) 遺伝子発現の比較：SHED の特性を検討するため、SHED および DPSCs より RNA 調製を行い、DNA マイクロアレイ法 (Agilent Expression Array) を用いて、両者間の遺伝子発現の比較を網羅的に行った。データはパスウェイ解析の手法を用いて、ターゲット遺

伝子を探索した。さらに、抽出されたターゲット遺伝子について、定量的 RT-PCR 法を用いて、両者における遺伝子発現の差の確認を行った。

(4) 骨・象牙質分化能の検討：SHED および DPSCs を硬組織分化誘導培地にて培養後、**alizarin red 染色および Von Kossa 染色**を行った。さらに、分化誘導後経時的に RNA を抽出し、骨芽細胞および象牙質特異的遺伝子の発現について、定量的 PCR 法を用いて比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 歯髄幹細胞特性の検討

フローサイトメトリー分析では、SHED は DPSCs および BMSCs と同様に CD13, CD29, CD44, CD73 等の間葉系幹細胞マーカーの発現が認められたのに対し、CD14, CD45 等の造血系幹細胞マーカーの発現はほとんど認められなかった。STRO-1 の免疫染色では、各細胞ともに陽性細胞の存在が確認された。また、BrdU 細胞増殖アッセイによる増殖能の検討では、SHED が DPSCs および BMSCs と比較して有意に増殖能が高いことが明らかとなった。

### (2) 遺伝子発現の比較

DNA マイクロアレイ法により SHED と DPSCs の遺伝子発現比較を行ったところ、SHED と DPSCs において 2 倍以上発現に変動が認められたのは 4386 遺伝子であった。gene ontology 解析の結果、SHED において extracellular matrix、developmental process の機能を持つ遺伝子群が特に高発現していることが明らかとなった。またパスウェイ解析の結果、細胞増殖に関わるパスウェイが有意に変動しており、**FGF2、TGF- $\beta$** 等の成長因子や、Col I, Col III 等の細胞外マトリックスが関与していることが示された。

### (3) 骨・象牙質分化能の検討

SHED、DPSCs ともに alizarin red 染色および Von Kossa 染色陽性を示したことから、SHED の硬組織形成能が示唆された。また、硬組織分化誘導後に骨および象牙質関連遺伝子 (ALP, Runx2, Osteocalcin, DMP-1, DSPP) の発現を比較検討したところ、SHED、DPSCs ともに非誘導コントロールと比較して経時的に骨・象牙質関連遺伝子の発現の上昇を認めた。また、両細胞間に発現量の有意差は認めなかったことから、SHED は DPSCs と同等の骨・象牙質形成能を有することが示唆された。

以上の結果より、SHED は増殖能が高い特性をもち、骨・象牙質形成能を有することから、歯槽骨、象牙質の再生に有用な細胞源

となりうることを示された。乳歯に含まれるこれらの幹細胞は非侵襲的に容易に採取可能であり、倫理上の問題も少なく安全性が高いという利点があることから、再生医療にとって将来有望な細胞源になり得ることが示唆される。

#### 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5件)

- ① Katagiri W., Yamada Y., Nakamura S., Ito K., Hara K., Hibi H., and Ueda M. Regulation of the Wnt signaling pathways during cell culture of human mesenchymal stem cells for efficient bone regeneration. Oral science Int. 2011 in press. 査読有
- ② Yamada Y., Ito K., Nakamura S., Ueda M., Nagasaka T. Promising cell-based therapy for bone regeneration using stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. Cell Transplant. 2010 Nov 5. [Epub ahead of print] 査読有
- ③ Nishino Y., Yamada Y., Ebisawa K., Nakamura S., Okabe K., Umemura E., Hara K., Ueda M. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) enhance wound healing and possibility of novel cell therapy. Cytotherapy: 2010 in press. 査読有
- ④ Yamada Y., Nakamura S., Ito K., Sugito T., Yoshimi R., Nagasaka T., Ueda M. A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem cells, or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology. Tissue Eng Part A. 2010 Jan 12. [Epub ahead of print] 査読有
- ⑤ Nakamura S., Yamada Y., Katagiri W., Sugito T., Ito K., and Ueda M. Stem Cell Proliferation Pathways Comparison Between Human Exfoliated Deciduous Teeth and Dental Pulp Stem Cells by Gene Expression Profile From Promising Dental Pulp. J Endod. 2009 Nov;35(11):1536-42 査読有

〔学会発表〕(計12件)

- ① Yamada, Y., Nakamura, S., Ito, K., Katagiri, W., Umemura, E., Hara, K., Hibi, H., and Ueda, M. Cell-based therapy with dental pulp stem cells for bone regeneration. International Association for Dental Research (88nd General session of the pan European region of IADR), Barcelona, Spain, 2010. 7.17.
- ② Katagiri, W., Yamada, Y., Nakamura, S., Ito, K., Katagiri, W., Umemura, E., Hara, K., Hibi, H., and Ueda, M. Proliferation of SHED and relation to Wnt signaling pathway. International Association for Dental Research (88nd General session of the pan European region of IADR), Barcelona, Spain, 2010. 7.17.
- ③ Umemura, E., Yamada, Y., Nakamura, S., Ito, K., Katagiri, W., Hara, K., and Ueda, M. Optimized study for dental pulp stem cell-based therapy by ready-to-use. International Association for Dental Research (88nd General session of the pan European region of IADR), Barcelona, Spain, 2010. 7.16.
- ④ Nakamura, S., Yamada, Y., Katagiri, W., Ito, K., Umemura, E., and Ueda, M. Characterization of dental pulp stem cells for mineralized tissue regeneration. International Association for Dental Research (88nd General session of the pan European region of IADR), Barcelona, Spain, 2010. 7.15.
- ⑤ 中村さやか, 山田陽一, 伊藤憲治, 上田実、乳歯および永久歯歯髄細胞による骨再生・インプラント治療への応用 第132回日本歯科保存学会学術大会、2010.06.04, 05 熊本
- ⑥ 山田陽一, 伊藤憲治, 中村さやか, 片桐 渉, 杉戸孝行, 吉見涼子, 西野雄大, 日比英晴, 上田 実. 乳歯・永久歯由来歯髄幹細胞による顎顔面領域再生への可能性, 第54回日本口腔外科学会総会. 札幌, 2009.10.10.
- ⑦ Nakamura S., Yamada Y., Katagiri W., Sugito T., Ito K., Ueda M.

Characterization and possibility of bone regeneration for dental implant using dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) as novel stem cell origin. 18th Annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration, 2009.09.30-10.03 Monaco

- ⑧ Yamada Y., Ito K., Nakamura S., Yoshimi R., Hibi H., Baba S., Ueda M. Clinical application using injectable tissueengineered bone for minimally invasive and aesthetic dental implant treatment. 18th Annual Scientific Meeting of European Association for Osseointegration, 2009.09.30-10.03 Monaco

- ⑨ 山田陽一, 伊藤憲治, 中村さやか, 片桐渉, 馬場俊輔, 上田実  
歯髄幹細胞による再生医療を用いたインプラント治療への応用 - 乳歯、永久歯歯髄幹細胞による骨再生パラダイムシフト -  
第39回 日本口腔インプラント学会総会. 大阪, 2009.9.25-27

- ⑩ 中村さやか, 山田陽一, 片桐渉, 杉戸孝行, 伊藤憲治, 上田実, 乳歯および永久歯歯髄細胞の遺伝子発現プロファイルの比較検討、第130回日本歯科保存学会学術大会、2009.06.11,12、札幌

- ⑪ 山田陽一, 中村さやか, 片桐渉, 杉戸孝行, 西野雄大, 伊藤憲治, 上田実、歯髄幹細胞による創傷治癒、骨再生医療への展開 - 乳歯・永久歯歯髄幹細胞の比較 - 、第130回日本歯科保存学会学術大会、2009.06.11,12、札幌

- ⑫ 山田陽一、中村さやか、伊藤憲治、日

比英晴、上田実、幹細胞を用いた再生医療による新規歯周病治療法のパラダイムシフト - 臨床経過から -  
第52回日本歯周病学会学術大会、  
2009.05.15, 16、岡山

〔図書〕(計1件)

- ① 山田陽一、中村さやか、上田実、羊土社、実験医学 再生医療の最前線 2010 第3章 幹細胞の分化誘導と臨床応用 歯髄幹細胞の再生医療における可能性、2010年、127-133

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：乳歯歯髄幹細胞に特徴的な遺伝子発現群の利用

発明者：山田陽一、中村さやか、上田実

権利者：名古屋大学

種類：特願

番号：2009-122379

出願年月日：2009年5月20日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村さやか (Nakamura Sayaka)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40437033

大(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし