

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 14 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 21 年度～平成 23 年度

課題番号：21791872

研究課題名（和文）

幹細胞遊走因子による歯髄再生治療法の開発

研究課題名（英文）

Pulp regeneration by chemokine

研究代表者

庵原 耕一郎 (IOHARA KOICHIRO)

国立長寿医療センター 口腔疾患研究部 特任研究員

研究者番号：60435865

研究成果の概要（和文）：

本研究ではブタ歯髄、大動脈、脂肪、骨髓組織由来 CD31⁺CD146⁺SP 細胞をマイクロアレイや下肢虚血マウスに移植して比較することにより、G-CSF が歯髄再生血管新生に有効であることを示した。また、イヌ抜髄モデルに G-CSF をコラーゲンと共に移植すると、コラーゲンのみを移植したものと比べてより多く歯髄の再生がみられた。これより G-CSF は歯髄再生に有効であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

To examine the angiogenic/proangiogenic properties, gene expression profiles were analyzed by microarray and real-time RT-PCR. The expression of G-CSF was much stronger in pulp CD31⁺/CD146⁺ SP cells compared with that in adipose, bone marrow and artery CD31⁺/CD146⁺ SP cells. Pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of collagen with G-CSF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：歯髄再生 G-CSF 血管新生 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会において歯の健康は QOL 向上のために必須であり、齲蝕が深く露髄した場合あるいは歯髄炎を起こした場合でも極力歯髄を残して歯を延命化させることが必要と考えられている。そのために私共は、歯再生の 3 要素と考えられる 1) 形態形成因子、BMPs(骨形成因子) 2) 歯髄幹細胞 3) 微小環境(足場、細胞外基質など)を駆使して象牙質を再生させる新しい齲蝕治療法の開発を行ってきた。しかし歯髄組織が偶発露髄あるいは可逆性歯髄炎程度で

あれば、上記の象牙質再生法は有効であると考えられるが、不可逆性歯髄炎で疼痛がある場合は抜髄せざるを得ない。よって近年、抜髄あるいは感染根管治療後の根管内への血管新生、神経再生ならびに歯髄再生研究開発を進めてきた。これまで、ヒト歯根未完成歯の自家移植に関しては移植後高頻度に歯髄の治癒が生じることが知られていた。根尖部に病変を伴う歯根未完成歯でも、徹底的な根管洗浄・消毒と 3 種抗菌剤の貼薬後、セメント・象牙質まで血餅あるいはコラーゲンを満たし Mineral trioxide

aggregate (MTA)および Cavit で窩洞を完全封鎖することにより歯髄が再生されるとの報告がある。歯根完成歯では、根尖部を切断するか、あるいは根尖を 1.1mm 以上拡大し根管を血餅で満たす必要性が示唆されている。しかし、いまだ根管内に侵入する血管新生および歯髄再生のメカニズムは明らかではなく、抜髄後あるいは根管治療後の歯髄再生治療法も確立されていない。私どもでは、歯髄組織から、血管新生能に優れた歯髄幹細胞を多く含む CD34⁺;CD31⁻;CD146⁻ side population (SP)細胞を分取した。CD34⁺;CD31⁻;CD146⁻ SP 細胞は CD31⁺;CD146⁻ SP 細胞および CD31⁺;CD146⁺ SP 細胞に比べて非常に遊走能および増殖能が高く、CD34⁺;CD31⁻ SP 細胞をマウス下肢虚血部に移植すると有意に血管新生が促進され、イヌの歯髄切断面上に自家移植すると完全に歯髄が再生され、この細胞の血管新生および歯髄再生への関与が明らかとなった。

近年、多くの疾患における間葉系幹細胞を用いた細胞療法の可能性が注目されているが、創傷部位局所に間葉系幹細胞が遊走、定着するメカニズムに関してはいまだ明らかではない。その中で、間葉系幹細胞の一部の画分において stromal-derived factor (SDF1) のケモカインレセプター、CXCR4 の発現がみられ、SDF1 により間葉系幹細胞が創傷部に集積することが示唆されている。しかし、CXCR4 を抑制しても遊走能はあまり変化せず、また CXCR4 を発現しない間葉系幹細胞も多く存在することも知られ、他のケモカインが遊走に関与している可能性も示唆されている。

したがって、今回、歯髄由来の血管内皮細胞 CD31⁺;CD146⁺ 細胞を幹細胞 CD34⁺;CD31⁻;CD146⁻ SP 細胞のケモカイン発現を比較して、遊走・定着に有効なケモカインを検索し、根管内にこのケモカインを scaffold に吸着させ、歯髄幹細胞を根尖部より根管内に遊走させ、より確実に血管新生、歯髄再生させる着想に至った。

2. 研究の目的

現在、根未完成歯の歯髄を再生するにあたり、抜髄後や感染根管治療後の根管内には根尖部を穿孔して歯周組織から出血させて血餅を充填させる方法がとられているが、根尖部の傷害や術後疼痛などの問題を生じる可能性がある。今回、根管内に確実に幹細胞を遊走させ、早期に確実に血管新生、歯髄再生を誘導することを目指して、幹細胞の根管内遊走を促進する蛋白質を検索し、その蛋白質を根管内に応用して、より早期に確実に歯髄再生に導く新しい歯内治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

幹細胞を歯牙内部に遊走させ再生させるために、まず、in vitro において歯髄幹細胞の遊走因子を同定する。次に、マウス皮下移植を行い in vivo における遊走効果を確認した後、最終的にイヌを用いて自家移植を行い血管新生、歯髄再生の促進作用を検討する。

1) ブタ歯髄、大動脈、脂肪、骨髄、筋肉、脳組織由来 CD34⁺;CD31⁻;CD146⁻SP 細胞から Trizol® 試薬を用いて total RNA を抽出する。ブタ GeneChip® (AFFYMETRIX) を用いて、マイクロアレイ解析を行う。歯髄と他の組織のデータをそれぞれ比較し、歯髄に特異的に強く発現している差次的遺伝子を見つける。

2) SCID マウスの下肢虚血部への移植による血管機能の検索

ブタ歯髄、大動脈、脂肪、骨髄、筋肉、脳組織由来 CD34⁺;CD31⁻;CD146⁻SP 細胞を、SCID マウス下肢虚血部に移植する。7 日後にレーザードップラー血流量測定装置を用いて血流の回復を測定。7 日後、凍結標本作製し、BS-lectin 染色により、新生血管密度をコントロールの蛋白質を注入しないものと比較検討。

3) 歯髄幹細胞遊走因子を用いた抜髄後の根管内血管新生・歯髄再生

(1) イヌの上顎前歯部抜髄後、根管を根尖部#60 まで拡大

(2) コラーゲンと G-CSF を根尖部に注入

(3) 2 週間後標本作製し、血管新生、歯髄再生の促進作用を形態学的に観察

4. 研究成果

ブタの歯髄組織よりフローサイトメーターを用いて、歯髄幹細胞である CD31 陰性 SP 細胞を分取し培養、増幅した (図 1)。

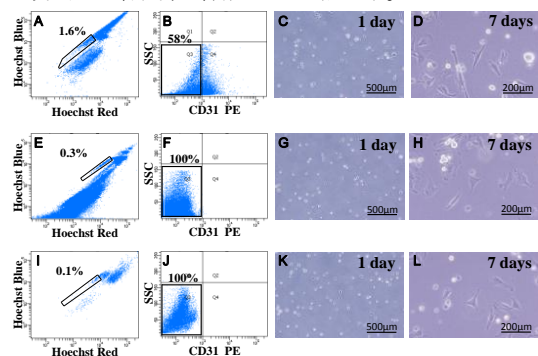


図 1 ブタ歯髄、骨髄、脂肪組織由来 CD31⁻;CD146⁺SP 細胞分取

A-D: 歯髄組織, E-H: 骨髄組織, I-L: 脂肪組織

この CD31⁻;CD146⁺SP 細胞の 3 代目の細胞で

マイクロアレイ解析を行った (表 1)。その結果、歯髄由来 CD31⁺;CD146⁺SP 細胞は他の組織に比べて血管誘導を促進するサイトカインである G-CSF の発現が高かった。

表 1 ブタ歯髄、大動脈、脂肪、骨髄組織由来 CD31⁺;CD146⁺SP 細胞のマイクロアレイ解析

PULP	BM	ARTERY	ADIPOSE	BONE MARR	Gene Title	Symbol				
12340.6	P	55.7	P	481.5	P	118.9	P	NM_213867.1	Interleukin 8	IL8
11330.8	P	176.5	P	39.1	M	127.9	M	CD56577	MRNA, clone UFR010060F0, expressed in uterus.	---
8225.4	P	120.5	P	341.5	P	287.5	P	CD38608	Transcribed locus	---
8871.9	P	67.2	P	113.6	P	232.9	P	BF709307	Transcribed locus	---
5414.8	P	82.3	A	26.7	A	46.6	A	BF64127	MRNA, clone UFR010060F0, expressed in uterus.	---
5063.2	P	31.6	P	47.2	P	46.7	A	AB04413.1	Matrix metalloproteinase 3	MMP3
3613.1	P	13.8	A	17.5	A	28.3	A	AF069641.1	Matrix metalloproteinase 3	MMP3
2061.1	P	11.8	A	64	P	109.7	P	M8750.1	Interleukin 3, alpha	IL3A
1736.5	P	17.2	A	20.4	A	69.3	A	CD945178	procollagen, type VI, alpha 1	---
1127.5	P	18.3	A	13.6	A	41.2	A	CA778777	adipose specific 2	---
1129.9	P	14.9	A	17.6	A	9.9	A	CF19158	MRNA, clone TCH000186C7, expressed in trachea.	---
1075.2	P	96.5	A	14.4	A	35.8	A	CD87388	---	---
969.5	P	6.3	A	13	A	2	A	CD942262	Transcribed locus	---
896.7	P	16.6	A	3.3	A	23.8	A	NM_214048.1	angiotensin, liver	ANG1
723.3	P	27.6	A	10.7	A	42.7	A	CN32393	MRNA, clone UFR010060F0, expressed in uterus.	---
671.7	P	0.8	A	14.4	A	1.2	A	CD92396	Transcribed locus	---
467.1	P	2.6	A	4.9	A	5.8	A	BC097627	Transcribed locus	---
390.5	P	3.7	A	24.6	A	4.9	A	U61139.1	colony stimulating factor 2	CSF2
365.9	P	0.9	A	1.4	A	4.2	A	CN61060	Transcribed locus	---
296.1	P	11.7	A	10.9	A	5.4	A	AF069641.1	matrix metalloproteinase 3	MMP3

また歯髄組織と歯髄由来 CD31⁺;CD146⁺SP 細胞を Real time RT-PCR 解析を行うと CD31⁺;CD146⁺SP 細胞は G-CSF を強く発現していた (表 2)。

表 2 ブタ歯髄由来 CD31⁺;CD146⁺SP 細胞の Real time RT-PCR 解析

	CD31 ⁺ ;CD146 ⁺ SP/ pulp tissue
G-CSF	26.9

またこれらの細胞を下肢虚血マウスに移植して、in vivo における血管新生能の比較を行った。ドップラー血流量測定を行うと、歯髄由来 CD31⁺;CD146⁺SP 細胞を移植したマウスは他の組織に比べて有意に血流の回復が見られた (図 2)。

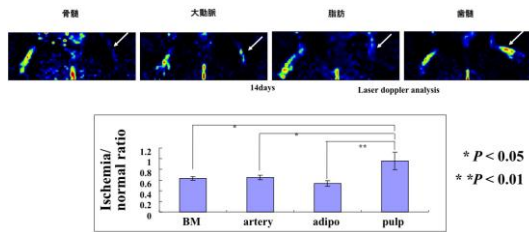


図 2 ドップラー血流量測定: 骨髄、大動脈、脂肪、歯髄 CD31⁺ SP 細胞の下肢虚血マウスへの移植 14 日目

また BS-1 lectin による免疫組織学的解析を行うと、歯髄由来 CD31⁺;CD146⁺SP 細胞を移植したマウスは他の組織由来細胞に比べて有意に血管の新生がみられた (図 3)。

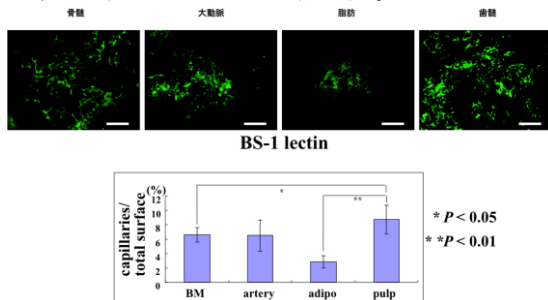


図 3 BS-1 lectin 免疫組織学的解析: 骨髄、大動脈、脂肪、歯髄 CD31⁺ SP 細胞の下肢虚血マウスへの移植 14 日目

これらの結果より、G-CSF を強く発現する歯髄由来 CD31⁺; CD146⁺SP 細胞は他の組織由来の細胞と比べて細胞移植による血管新生能がある事が示唆された。

次により臨床研究に近づくために、G-CSF をイヌの抜髄後の歯にコラーゲンと共に移植して実際に歯髄再生が可能であるかを検索した。G-CSF を移植した歯では歯髄組織の再生がみられ、血管と神経組織が再生された (図 4)。

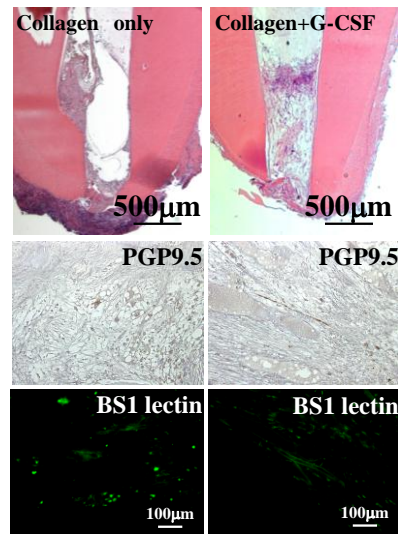


図 4 イヌ抜髄モデルにおける G-CSF による歯髄再生: G-CSF を移植した歯には血管と神経が再生している

またコントロールのコラーゲンを移植したのみの歯の再生歯髄量と比較すると G-CSF を移植した歯のほうが再生量が多かった (図 5)。

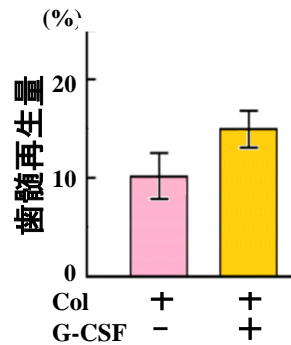


図 5 イヌ抜髄モデルにおける G-CSF による歯髄再生量の比較

これより、G-CSFは歯髄を再生させるのに有効であることが示された。

G-CSFは好中球減少症や再生不良性貧血に伴う好中球減少症に用いられるが、再生治療においても閉塞性動脈硬化症や慢性重症下肢虚血の患者においても臨床研究が進められている。今回の実験により、歯髄再生治療法においてもG-CSFを応用することは有効である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Nakashima M. and Iohara K.: Regeneration of dental pulp by stem cells. Adv. Dent Res. 23(3): 313-319, 2011.
- ② Iohara K., Imabayashi K., Ishizaka R., Watanabe A., Nabekura J., Ito M., Matsushita K., Nakamura H. and Nakashima M.: Complete Pulp Regeneration After Pulpectomy by Transplantation of CD105⁺ Stem Cells with Stromal Cell-Derived Factor-1. Tissue Eng. Part A. 17(15-16): 1911-1920, 2011.
- ③ 中島美砂子、庵原耕一郎: 歯髄の再生治療と高齢者歯科への展望. 医学のあゆみ「老年医学・高齢者医療の最先端」239(5), 467-472, 2011.
- ④ Ishizaka R., Iohara K., Murakami M., Fukuta O., Nakashima M.: Regeneration of dental pulp following pulpectomy by fractionated stem/progenitor cells from bone marrow and adipose tissue. Biomaterials, 33(7):2109-2118, 2012.

[学会発表] (計6件)

- ① 庵原耕一郎、石坂亮、杉山昌彦、中島美砂子: 「ブタ歯髄・脂肪 CD31-SP細胞の歯髄再生能の比較」第10回日本歯科再生医療学会総会 東京 2011年3月2日
- ② 石坂亮、庵原耕一郎、古賀豪、福田理、中村洋、中島美砂子: 「ブタ歯髄・骨髄・脂肪 CD31-SP細胞の歯髄再生能の比較」第134回日本歯科保存学会2011年度春季学術大会 東京 2011年6月9日
- ③ 堀部宏茂、庵原耕一郎、村上真史、竹内教雄、石坂亮、栗田賢一、中島美砂子: 「ヒト歯髄幹細胞の特徴化の中高齢者・若年者による比較検討」第135回日本歯科保存学会2011年度秋季学術大会 大阪 2011年10月20日
- ④ 石坂亮、庵原耕一郎、村上真史、中村

洋、福田理、中島美砂子: 「イヌ歯髄・骨髄・脂肪 CD31-SP細胞の抜髄後根管移植による歯髄再生能比較」第135回日本歯科保存学会2011年度秋季学術大会 大阪 2011年10月20日

⑤ 石坂亮、庵原耕一郎、村上真史、中村洋、福田理、中島美砂子: 「イヌ歯髄・骨髄・脂肪 CD31-SP細胞の抜髄後根管移植による歯髄再生能比較」第49回日本小児歯科学会 岩手 2011年11月28日

⑥ Nakashima M. and Iohara K.: Pulp Stem Cells and Pulp Regeneration. Tissue Injury and Pulp Regeneration. Geneva, Switzerland, July 19, 2010

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: 非抜歯根管充填材及び非抜歯による歯組織再生方法

発明者: 中島美砂子・庵原耕一郎

権利者: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類:

番号: 特願 2009-210441

出願年月日: 2009年9月11日

国内外の別: PCT 移行

○取得状況 (計0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

庵原 耕一郎 (IOHARA KOICHIRO)

国立長寿医療センター 口腔疾患研究部
特任研究員

研究者番号: 60435865

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：