

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890102

研究課題名（和文）

歯髄幹細胞、成長因子、細胞外マトリックス改変型スキャホールドによる新規骨再生療法
研究課題名（英文）Novel bone regeneration treatment using by dental pulp stem cells, growth factors,
And the extracellular matrix modified scaffold

研究代表者

吉見 涼子 (YOSHIMI RYOKO)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40547543

研究成果の概要（和文）：歯髄幹細胞は、凍結保存を行う前、行った後でもともに、良好な増殖能、多分化能を有していた。また、骨欠損部位では、細胞外マトリックス改変型スキャホールドと移植することにより、良好な骨再生能を示した。歯髄幹細胞は、組織工学的手法に基づいた骨再生において、有用な細胞源であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Dental pulp stem cells (DPSCs) and cryopreserved DPSCs were nearly equal to bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in cell proliferation and pluripotency. Both cells showed well-formed bone regeneration by transplantation with the extracellular matrix modified scaffold in bone defects. It was suggested that DPSCs were useful cell source for bone regeneration using tissue engineering technology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	980,000	294,000	1,274,000
2010年度	820,000	246,000	1,066,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯髄、乳歯、再生医療、幹細胞、組織工学

1. 研究開始当初の背景

8020 運動などの啓蒙活動により国民全体の残存歯数は増加傾向にあるが（平成17年歯科疾患実態調査）、65歳以上となると喪失歯数は10歯を越える。現在、喪失歯の代替物としてインプラント（人工歯根）が広く知られるようになってきた。平成19年に日本は超高齢社会を迎え（一般人口推計2007年版）、今後さらに高齢化が進むにつれ、インプラント治療の需要が拡大すると考えられる。しかし、通常のインプラント治療がすべての人に

適応となるとは限らない。歯周病、外傷、腫瘍などによって歯槽骨の吸収あるいは欠損を生じた場合、多くはインプラント治療に先立ち骨移植が必要となる。従来、骨欠損部に対する治療法として、腸骨や顎骨より骨採取し移植を行う自家骨移植が最も予知性が高いとされてきたが、侵襲度が高く、術後合併症などの危険性が存在する。それらの問題解決のために、多くの人工材料が研究開発されてきたが、理想的な材料はいまだ見付かっていない。こうした現状の打開のため、組織工

学的手法を用いた骨再生法が注目され、Quality of life (QOL) の向上に寄与するとして盛んに研究が行われている。組織工学とは、細胞、成長因子、足場の3要素を用いて組織再生と機能化を実現させる技術であり、名古屋大学医学部附属病院ではすでに、細胞として骨髄幹細胞を、成長因子兼足場として多血小板血漿 (PRP) を用いた歯槽骨再生医療が臨床応用されており、良好な結果を得てきた。MSCs 採取による侵襲は、自家骨採取に比べれば軽減されたが、十分なものではなく、より低侵襲で人体への負担の少ない細胞源が望まれる。近年、歯髄組織中に高い増殖能を示し、多分化能を有する幹細胞が存在することが報告され、歯髄には間葉系幹細胞である歯髄幹細胞が存在すると言われている。そこで、再生医療に用いる細胞供給源として、医療廃棄物とされている抜去歯由来歯髄組織に着目した。また、成長因子と足場を兼ねる材料としてこれまで本学では PRP を用いてきたが、その作製に自己血採血が必要であり侵襲度が高いため、PRP に代わる材料の検討も行う。昨今、生体内の組織を構成している細胞外マトリックス (ECM) に類似した高次構造を有する人工材料が、足場として有利であると期待されている。ECM はナノオーダーの線維によって構築された高次構造を呈しており、接着、遊走、増殖、分化などの細胞の活性を維持し、制御する働きをも有しているといわれている。組織修復において重要な役割を果たしていると考えられており、ECM に類似した材料であれば、より効果的な組織再生が期待できるとする。本研究で使用する細胞外マトリックス改変型スキャホールドは、ナノオーダーの線維によって構築された高次構造を呈し、水分とアミノ酸主体の材料であり、生体親和性、吸収性に優れ、足場として有用であると考えられている。すでに申請者らは、この細胞外マトリックス改変型スキャホールドと骨髄幹細胞を用いることにより、良好な骨再生が得られることを確認している。歯髄幹細胞と成長因子と併用することにより、より低侵襲な治療法の確立を目指す。

2. 研究の目的

抜去歯由来歯髄組織より多能性を有する体性幹細胞を単離し、より低侵襲に効果的に歯槽骨を再生する細胞源として確立するとともに、臨床応用することを目的とする。さらには、凍結保存された細胞による骨再生能についても検証し、本研究を足がかりとして、長期保存によっても安定した骨再生が可能な細胞源であることの実証を目指す。

3. 研究の方法

(1) イヌ腸骨由来幹細胞とイヌ歯髄由来幹細胞

の培養、分離

イヌの腸骨より骨髄穿刺を行い、骨髄液を回収、培養を行う。また、同一個体の下顎より小臼歯を抜去し、歯髄組織を摘出する。酵素処理後、歯髄細胞を培養する。各種培養細胞は一部凍結保存する。

(2) in vivo における多分化能の評価

(1)にて得られた細胞群の有効性について、BrdUにて増殖能を評価する。また、多分化能の評価のため、細胞を適切な分化誘導培地にて培養することにより、骨、軟骨、脂肪、神経への分化を確認する。すなわち、骨芽細胞分化誘導培地を用いて培養を行った後、ALP染色とコッサ染色を行う。脂肪細胞分化誘導培地を用いて培養を行い、オイルレッドO染色、ズダンIII染色を行う。軟骨分化誘導培地にて培養を行い、ホルマリンにて固定。パラフィン包埋を行った後、標本作製。サフランインO染色を行う。

(3) 骨再生能の評価

(1)にて得られた細胞群の骨再生能を評価するため、イヌの顎骨に作製した顎骨欠損モデルを用いて、歯槽骨再生能力を明らかにする。すなわち、細胞と同じ宿主の下顎片側の抜去部位の歯槽骨を削合して骨欠損を作製し、そこに各種細胞を成長因子や細胞外マトリックス改変型スキャホールド (PM) とともに移植を行う。欠損のままの状態を対照群とし、骨髄幹細胞と PRP、骨髄幹細胞と PM、歯髄幹細胞と PM を実験群として設定する。2、4、8 週後に移植部から採取した組織をホルマリン固定、パラフィン包埋ののち、標本作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、組織学的に評価する。また、移植時と移植後 2、4、8 週にて X線撮影も行い、標本から新生された骨量を解析し、骨再生能を評価する。

(4) 凍結保存細胞の培養

(1)で凍結保存した歯髄幹細胞について、6 か月後に培養を行う。

(5) in vivo における多分化能の評価

(4)にて得られた細胞群の有効性について、BrdUにて増殖能を評価する。また、多分化能の評価のため、細胞を適切な分化誘導培地にて培養することにより、骨、軟骨、脂肪、神経への分化を確認する。すなわち、骨芽細胞分化誘導培地を用いて培養を行った後、ALP染色とコッサ染色を行う。脂肪細胞分化誘導培地を用いて培養を行い、オイルレッドO染色、ズダンIII染色を行う。軟骨分化誘導培地にて培養を行い、ホルマリンにて固定。パラフィン包埋を行った後、組織切片を作製。サフランインO染色を行う。

(6)骨再生能の評価

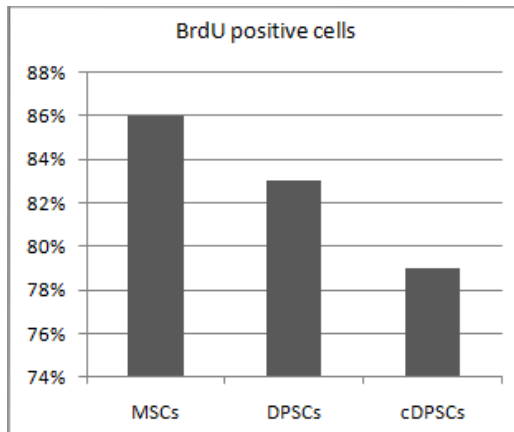
(4)にて得られた細胞群の骨再生能を評価するため、(3)にて用いた同一宿主に同様の実験を行って解析する。前年度移植を行っていない部位に骨欠損を作製し、凍結保存後の歯髄幹細胞をPMとともに移植を行う。2、4、8週後に移植部から採取した組織をホルマリン固定、パラフィン包埋ののち、標本作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、組織学的に評価する。また、移植時と移植後2、4、8週にてX線撮影も行い、標本から新生された骨量を解析し、骨再生能を評価する。

4. 研究成果

(1)増殖能と多分化能の評価

①増殖能の評価

骨髄幹細胞(MSCs)、歯髄幹細胞(DPSCs)、凍結保存後の歯髄幹細胞(cDPSCs)について、BrdUにて評価を行った。凍結保存後の歯髄幹細胞の増殖能は4%の減少を認めたが、骨髄幹細胞、歯髄幹細胞、凍結保存後の歯髄幹細胞ともに、およそ同等の増殖能を示した。



②骨芽細胞への分化能

骨髄幹細胞、歯髄幹細胞、凍結保存後の歯髄幹細胞を、骨芽細胞分化誘導培地にて1週間培養を行った。ALP染色およびvon Kossa染色を行ったところ、いずれの細胞でも細胞周囲に分泌されたと考えられるマトリックスが染色された。これにより、骨芽細胞への分化を確認した。また、凍結保存による歯髄幹細胞の骨芽細胞への分化能には影響がないことを確認した。

③脂肪細胞への分化能

骨髄幹細胞、歯髄幹細胞、凍結保存後の歯髄幹細胞を、脂肪細胞分化誘導培地にて6週間培養を行った。いずれの細胞も、細胞質内に脂肪滴を認め、オイルレッドO染色、ズダンIII染色にて染色された。これにより、脂肪細胞への分化を確認した。また、凍結保存による歯髄幹細胞の脂肪細胞への分化能には影響がないことを確認した。

④軟骨細胞への分化能

骨髄幹細胞、歯髄幹細胞、凍結保存後の歯髄幹細胞を培養後に回収し、遠心分離によってペレットを作製。軟骨細胞分化誘導培地にて8週間培養を行った。いずれの細胞も、球状、表面滑沢で白色の軟骨様組織を形成。組織標本作製し、サフランin O染色を行ったところ、染色された軟骨基質を内包した軟骨細胞を認めた。これにより、軟骨細胞への分化を認めた。また、凍結保存による歯髄幹細胞の軟骨細胞への分化能には影響がないことを確認した。

①～④の結果より、歯髄幹細胞は骨髄幹細胞とほぼ同程度の増殖能、多分化能を有しており、6か月の凍結保存ののちも、その幹細胞としての性質を保持していることが確認された。

(2)骨再生能の評価

2、4週後のレントゲン像では、対照群の欠損と比較して、骨髄幹細胞とPRP、骨髄幹細胞とPM、歯髄幹細胞とPM、凍結保存後の歯髄幹細胞とPMにおいて、不透過性の亢進を認めた。

8週後のレントゲン像では、対照群の欠損と比較して、骨髄幹細胞とPM、歯髄幹細胞とPM、凍結保存後の歯髄幹細胞とPMにおいて不透過性の亢進を認め、骨髄幹細胞とPRPではわずかではあるが、さらに不透過性の亢進を認めた。

2週後の組織標本では、対照群の欠損ではほとんど新生骨を認めず、炎症細胞を含む肉芽組織にて充満していた。骨髄幹細胞とPRP、骨髄幹細胞とPM、歯髄幹細胞とPM、凍結保存後の歯髄幹細胞とPMにおいて、骨欠損の3割を幼若な骨が満たしていた。実験群では炎症細胞はわずかに認めるのみで、対照群と比較して肉芽組織は少量であった。骨髄幹細胞とPRPを移植した部位が最も良好な骨増生を認めた。

4週後の組織標本では、対照群の欠損ではわずかに新生骨を認めるのみであり、ほとんどは肉芽組織で充満していた。骨髄幹細胞とPRPは骨欠損の5割を占める骨新生を認めた。続いて、骨髄幹細胞とPM、歯髄幹細胞とPM、凍結保存後の歯髄幹細胞とPMの順に良好な骨増生を認め、これら実験群に明らかな差は認められなかった。

8週後の組織標本では、対照群の欠損では幼若な新生骨を少量認めるのみであり、多くは肉芽組織で満たされていた。骨髄幹細胞とPRPは骨欠損の6割近くを占める骨新生を認め、骨の成熟を示す層板構造を確認した。続いて骨髄幹細胞とPMにおいて良好な骨増生を認めた。次に歯髄幹細胞とPM、凍結保存後

の歯髄幹細胞が良好な骨増生を示し、この 2 群においてほとんど差は認められなかった。また、骨髄幹細胞と PM、歯髄幹細胞と PM、凍結保存後の歯髄幹細胞と PM の 3 群においては、骨小腔の狭小化を認め、骨の成熟化が進行していることが確認された。

上記結果より、骨髄幹細胞と PRP を使用した骨再生法にはやや劣るものの、歯髄幹細胞は組織工学的的手法を用いた骨再生法において良好な骨再生能を示し、凍結保存後も明らかな骨再生能の低下は認めなかったことから、細胞源として有用であること、細胞外マトリックス改変型スキャホールドは足場として有用であることが示唆された。

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 1 件)

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, 査読有 Vol.16, 2010, 1891-1900.

[学会発表] (計 2 件)

①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、2009.10.10.

②西野雄大、山田陽一、伊藤憲治、中村さやか、岡部一登、高後友之、吉見涼子、原 憲史、梅村恵理、上田 実、乳歯歯髄幹細胞による皮膚創傷治癒効果の検討、第 54 回日本口腔外科学会総会、2009.10.10

[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 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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉見涼子 (TOSHIMI RYOKO)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：40547543

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし