

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390433

研究課題名(和文) 幹細胞移植による歯髄再生療法創生を目指す スキャホールドの開発と動物モデルの確立

研究課題名(英文) Dental pulp regeneration by stem cell transplantation: development of scaffolds and establishment of an animal experimental model

研究代表者

興地 隆史 (Okiji, Takashi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：80204098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯髄幹細胞の歯髄腔への移植による歯髄再生系の確立をはかることを究極の目的とし、歯髄幹細胞の同定、スキャホールドの選択およびラット臼歯による移植実験系の検討を行った。まず、ラット歯髄中にCD146/MAP1B陽性幹細胞様細胞が血管周囲を中心に分布することを免疫組織学的に確認した。さらに、PLLA/Puramatrix三次元複合スキャホールドとともにラット間葉系幹細胞を歯髄腔を除去したラット臼歯に移植したところ、移植4週後に歯髄腔に石灰化組織が急速に形成された。以上より、本実験モデルが幹細胞移植による歯髄組織再生の検証に有用である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was designed with the ultimate purpose of establishing a tooth pulp tissue engineering using transplantation of dental pulp stem cells, and conducted to select appropriate scaffolds and develop an experimental engineering system using rat molars. It was demonstrated that rat dental pulp is equipped with stem-like cells that coexpress CD146 and MAP1B and are distributed predominantly in the perivascular area. rat dental pulp by means of immunohistochemistry. Moreover, transplantation of rat mesenchymal stem cells into pulpotomized rat molars with a PLLA/Puramatrix scaffold resulted in the formation of new mineralized tissues at 4 weeks. These results suggest that the experimental model used in this study is useful for investigating the pulp tissue regeneration using stem cell transplantation.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：歯学 再生医学 細胞&#8226;組織 歯髄 スキャホールド 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

歯髄に細菌感染が生じた場合、現在なお多数の症例で抜髄を施さざるを得ない。しかし、除去された歯髄組織の再生が可能となれば、歯の生来の機能が回復するとともに物性が向上し、歯の残存期間の飛躍的延長が期待される。このような観点から組織幹細胞移植による歯髄組織再生療法の可能性が探索されており、歯髄や歯乳頭由来の組織幹細胞をスキャホールドとともに埋植することにより歯髄様組織が形成されることを示した報告がなされつつある。組織幹細胞は、誘導多能性幹細胞(ES細胞、iPS細胞)のような多能性は保持していないが、これらの細胞に伴うがん化あるいは再プログラム化のような問題もないと考えられる。申請者らも上述の点に着目して、組織幹細胞を用いた歯髄再生に対する検索を重ねており、米国ミシガン大学との共同研究において、組織幹細胞の一種であるヒト乳歯由来幹細胞を poly-L-lactic acid(PLLA)スキャホールドとともにヒト抜去歯スライス歯髄腔内に移植、再生組織を免疫不全マウス背皮下において増殖させることにより、象牙芽細胞様細胞の配列を含め、正常歯髄組織に形態学的・組織学的・分子生物学的に類似する歯髄様組織を再生させることに成功している。

2. 研究の目的

これまでのスキャホールドを用いた歯髄組織再生法は口腔外間接法でのスキャホールド移植に適した再生法であり、ヒトへの臨床応用を達成するためには、口腔内直接法による歯髄組織再生法の完成が必要とされる。すなわち、直接法に適切な三次元的スキャホールドの開発が急務である。また、将来の臨床応用を想定した術式の創生と検証を行うにあたっては、手法の開発・評価、あるいは前臨床試験としての意義を含めて、実験動物の歯を用いた再生実験系確立の意義は極めて大きいと考えられるが、この方面の取り組みは世界的にもいまだ限られたものとなっている。そこで、これまでの成果を進展させつつ臨床応用への技法を創成することを究極の目的として、口腔内で施術可能なスキャホールドの開発・評価を行った。また、歯髄からの幹細胞採取を行うための基礎的解析として、ラット歯髄における幹細胞マーカー陽性細胞の局在ならびに遺伝子発現解析を行った。さらに、臨床応用を想定した術式の創生と検証に不可欠な動物実験系として、ラット臼歯を用いた再生実験系の確立をはかった。

3. 研究の方法

(1)ラット臼歯の whole tooth culture 系の確立

上記の研究目的を達成するための端緒として、顎骨ごと摘出したラット臼歯の whole tooth culture 培養系について、培養可能期

間の延長を図るとともに、培養歯髄組織に分布する常在性免疫担当細胞・神経線維・血管系について免疫組織化学的・分子生物学的手法による検索を行った。特に常在性マクロファージや MHC クラス II 分子陽性細胞については、免疫組織化学的にその局在様式や密度について in vivo の正常歯髄との比較を行うとともに、レーザーキャプチャーマイクロダ イセクションおよびリアルタイム PCR 法を用いて、培養組織中のこれらの細胞における免疫機能分子等の mRNA 発現レベルを解析した。

(2)スキャホールドの評価

以下の4群のスキャホールドの評価を、上述の whole tooth culture 系を用いて行った。

a: PLLA/Puramatrix

b: PLLA/Matrigel

c: Puramatrix

d: Matrigel

露髄後冠部歯髄を除去したラット臼歯に上記のスキャホールドをラット間葉系幹細胞とともに移植し、1週間経過後の歯髄組織を組織学的、免疫組織化学的に評価した。

(3)ラット歯髄における幹細胞マーカー陽性細胞の局在ならびに遺伝子発現解析

正常歯髄組織や培養歯髄組織に分布する組織幹細胞マーカー陽性細胞について免疫組織化学的・分子生物学的手法による検索を行った。すなわち、CD146, MAP1B, endoglin (CD105) などの各種幹細胞マーカーを検索対象とし、免疫組織化学的に陽性細胞の局在様式や密度について解析を行うとともに、リアルタイム PCR法を用いて、組織中の各種幹細胞マーカー mRNA 発現レベルを解析した。

(4)スキャホールドと幹細胞との動物埋植試験

全身麻酔下でラット臼歯を露髄させ髄腔内の歯髄組織を除去後、前述のスキャホールドおよびラット間葉系幹細胞を移植後、水硬性セメントおよびフロアブルレジン修復材料を用いて窩洞を二重に封鎖した。1週間および1ヶ月経過後の歯髄組織を、組織学的に評価した。

(5)ヒト乳歯幹細胞を用いたスキャホールド適合性の評価

前述のスキャホールドがヒト幹細胞においても適用可能であるかを検索することを目的とし細胞培養実験を行った。スキャホールドおよびヒト歯髄乳歯幹細胞を、ヒト抜去歯の凍結乾燥粉末を添加した培養液中で三次元培養を行い、スキャホールド中に生じた歯髄様組織を、ipGell(Genostaff社)を用いてパラフィン包埋後、組織学的に検索した。

4. 研究成果

(1)ラット臼歯 whole tooth culture 系の確立

1~2週間維持されたラット臼歯 whole tooth culture の歯髄では、常在性マクロファ

ージにおけるMHCクラスII分子mRNA発現レベルが正常歯髄組織と同程度に保持されていること、象牙芽細胞層における象牙質シアロリントンパクmRNA発現レベルも正常歯髄組織と同程度であることなどが明らかになった。従って、この培養系が、スキャホールドの安全性評価やこれらを用いた再生実験に十分適用可能であることが示唆された。

(2) ラット歯髄における幹細胞マーカー陽性細胞の局在ならびに遺伝子発現解析

ラット切歯あるいは臼歯においては、歯髄組織中にCD146, MAP1Bなどの発現を示す少数の幹細胞様細胞が血管近傍を中心に分布していることが確認された。特にCD146, MAP1B二重陽性細胞を指標としてこれらの分布密度を検索したところ、歯冠歯髄では歯根歯髄や歯根膜と比較して有意に高い密度を示していた。また、CD105, CD146などの幹細胞マーカーmRNA発現レベルも同様に、歯冠歯髄では歯根歯髄や歯根膜と比較して有意に高レベルであった。

以上の成果は、歯冠歯髄が幹細胞を効率的に採取可能な部位である可能性を示したものであり、今後の歯髄からの幹細胞分取にあたり有益な情報と考察された。

(3) スキャホールドの評価と幹細胞の動物埋植試験

Hole tooth culture系あるいはヒト乳歯幹細胞を用いた in vitro 評価から、PLLA/Puramatrix を用いた三次元複合スキャホールドが適切なスキャホールドとして選択された。ついで、冠部歯髄を除去したラット臼歯にラット間葉系幹細胞とともに同スキャホールドを移植したところ、移植4週後に歯髄腔内に石灰化した新生組織が急速に形成されることが確認された。本実験モデルが歯髄幹細胞を用いた歯髄組織再生の検証に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9件)

Kaneko T, Arayatrakoolikit U, Yamanaka Y, Ito T, Okiji T. Immunohistochemical and gene expression analysis of stem-cell-associated markers in rat dental pulp. *Cell Tissue Res.* 2013;351(3):425-32. doi: 10.1007/s00441-012-1539-9. (査読有)

Yoshida N, Yoshida K, Ohkura N, Shigetani Y, Takei E, Hosoya A, Nakamura H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of α -smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp. *Histochem Cell Biol.* 2012;138(4): 583-92. doi: 10.1007/s00418-012-0978-4. (査読有)

Chokechanachaisakul U, Kaneko T, Yamanaka Y, Okiji T, Suda H. A novel whole

tooth-in-jaw-bone culture of rat molars: morphological, immunohistochemical, and laser capture microdissection analysis. *Microsc Res Tech.* 2012;75(10):1341-7. doi: 10.1002/jemt.22072. (査読有)

Chokechanachaisakul U, Kaneko T, Yamanaka Y, Kaneko R, Katsube K, Kobayashi H, Nör JE, Okiji T, Suda H. Gene expression analysis of resident macrophages in lipopolysaccharide-stimulated rat molar pulps. *J Endod.* 2011;37(9):1258-63. doi: 10.1016/j.joen.2011.06.010. (査読有)

[学会発表](計24件)

金子友厚, 山中裕介, 伊藤崇史, 吉羽邦彦, 興地隆史. 再生歯髄組織内におけるマクロファージの活性化と成熟-免疫レーザーキャプチャーマイクロダイゼクション法を用いた検索- 第57回日本顕微鏡学会, 愛知県産業労働センター, 名古屋, 2013年11月16日.

Okiji T. Vital pulp therapy: Biological basis, current concepts and future perspectives. The 9th World Endodontic Congress, 東京国際フォーラム, 東京, May 26, 2013. (招待講演)

Kaneko T, Yamanaka Y, Ito T, Yoshida K, Okiji T. The activation/maturation of macrophages in engineered pulp tissue. The 9th World Endodontic Congress, 東京国際フォーラム, 東京, May 26, 2013.

Yamanaka Y, Kaneko T, Ito T, Yoshida K, Yoshida N, Okiji T. Stem cell-related marker-expression in rat dental pulp and periodontal ligament. 60th Annual Meeting of JADR, Toki Messe, Niigata, Japan, December 14-15, 2012.

Kaneko T, Yamanaka Y, Ito T, Okiji T. Lipopolysaccharide-induced upregulation of antigen-presenting cell-related genes in macrophages in engineered-pulp. 60th Annual Meeting of JADR, Toki Messe, Niigata, Japan, December 14-15, 2012.

Kaneko T, Yamanaka Y, Okiji T: The role of endothelial cells in macrophage differentiation in engineered dental pulp tissues. 100th FDI Annual World Dental Congress, Hong Kong, China, August 29-September 1, 2012.

Ito T, Yamanaka Y, Kaneko T, Yoshida K, Yoshida N, Okiji T: CD146 and MAP1B expressing stem cell-like cells in rat dental pulp. 54th Symposium of the Society for Histochemistry, Wien, Austria, September 6-7, 2012.

Yamanaka Y, Kaneko T, Ito T, Yoshida K, Yoshida N, Okiji T: Double immunolabeling of CD146 and MAP1B expressing stem cell-like cells in rat dental pulp and periodontal ligament. 14th International Conference on Histochemistry and

Cytochemistry, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, August 26-29, 2012.

Chokechanachaisakul U, Kaneko T, Yamanaka Y, Kaneko R, Sunakawa M, Okiji T, Suda H: Immune-LCM of resident macrophages in cultured dental pulp tissues. 第10回日中合同組織細胞化学セミナー, 北京, 中国, October 21, 2011.

Kaneko T, Yamanaka Y, Yoshida K, Okiji T: Immune laser capture microdissection of macrophages in engineered dental pulp tissues. 53rd Symposium of the Society for Histochemistry, Munich, Germany, October 12-15, 2011.

〔図書〕(計4件)

興地隆史, 金子友厚, 山中祐介, 伊藤崇史, 吉羽邦彦, 大島勇人. 今だから押さえておきたい世界の歯内療法の潮流. クインテッセンス出版, 2014, 52-56, 64-66, 140-141.

金子友厚, 興地隆史. ライフステージと歯内療法. デンタルダイヤモンド社, 2013, 88-91.

Kaneko T, Yamanaka Y, Okiji T. Handbook of macrophages: Life cycle, functions and diseases. Nova Scientific Publishers, 2013, 413-422.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

興地 隆史 (OKIJI Takashi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 8 0 2 0 4 0 9 8

(2) 研究分担者

吉羽 永子 (YOSHIBA Nagako)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号: 1 0 3 2 3 9 7 4

吉羽 邦彦 (YOSHIBA Kunihiro)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 3 0 2 2 0 7 1 8

大島 勇人 (OHSHIMA Hayato)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 7 0 2 5 1 8 2 4

金子 友厚 (KANEKO Tomoatsu)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号: 7 0 3 4 5 2 9 7

重谷 佳見 (SHIGETANI Yoshimi)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 8 0 3 9 7 1 3 2