

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592934

研究課題名(和文) 臨床応用を念頭に置いた羊膜を基質とした培養歯髄由来細胞シートの開発

研究課題名(英文) Evaluation of a dental pulp-derived cell sheet cultured on an amniotic membrane substrate

研究代表者

山本 俊郎 (Yamamoto, Toshiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40347472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、通常、廃棄予定である分娩後の羊膜と抜歯後の親知らず(智歯)の内部に存在する歯髄細胞を用い、羊膜の上で歯髄細胞を培養した。その結果、シート状を呈しており、細胞シートの作成に成功した。さらに、得られたこの羊膜上培養歯髄細胞シート(歯髄細胞シート)は、間葉系幹細胞を有するとともに骨分化能を認めた。以上から、歯髄細胞シートはシート上の歯髄幹細胞による組織再生への可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dental pulp cells collected from extracted wisdom teeth were cultured on an amniotic membrane, which is usually discarded after delivery. As a result, a cell sheet was successfully created. The cell sheet cultured on the amniotic membrane contained mesenchymal stem cells and had a bone differentiation potential. Thus, the dental pulp cell sheet had a tissue regeneration potential from the dental pulp stem cells on the cell sheet.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：羊膜上培養歯髄細胞シート 羊膜 歯髄由来細胞 免疫組織化学 移植・再生医療 再生医学 歯学 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景：

我々は、これまでに羊膜の有用性に注目、羊膜を細胞培養基質として用いた再生医療の研究を行ってきた。すでに当大学医学倫理審査委員会の許可を得、羊膜を基質とした培養口腔粘膜上皮細胞シートの作成方法を確立した。そして、各種口腔粘膜上皮欠損患者に対しての臨床応用を行い、拒絶反応等の異常なく良好な結果を得、羊膜が細胞培養の基質として適し、また新たな再生医療的治療法として極めて有用かつ有効であることを報告した。さらに、この細胞培養系を歯根膜細胞の培養に応用したところ、歯根膜細胞が羊膜上で増殖し、デスモゾームやタイト結合といった強固な細胞間接着装置が存在（第54回日本口腔外科学会総会・学術大会で平成21年ゴールドリボン賞受賞、第64回日本口腔科学会で学会優秀発表賞受賞）、培養歯根膜シートの作成に成功するとともに、*in vivo*で自家移植を行う技術を開発した。

歯周病は、成人の8割が罹患しているといわれており、歯周病等で失われた歯周組織の再生は歯科医療にとって大きな目標である。近年、歯科医学の進歩により歯周病の原因や機序が次第に明らかになりつつあり、歯周組織の再生には新生歯根膜が重要であることが、既に過去の研究より強く示されている。次に、発生学的に歯根膜と同じ間葉系組織で分化能と表面抗原が類似する歯髓細胞は、歯の内部に位置するため放射線などの有害刺激が少なく、酸素濃度が低いために遺伝子への影響が少なく、従来、抜歯後に医療廃棄物として処理されていた乳歯、智歯などの永久歯から比

較的簡便に入手が可能でかつ、歯根膜と比べて細胞増殖能が高く、細菌感染の機会が少ないためにシート作成の再現性が高い。また再生医療の領域では、歯髓細胞を用いた骨再生に関する報告は数多く存在するが、培養細胞シートに関する報告はみられない。このため、歯髓細胞シートが歯周組織再生に応用可能であると思われる。ゆえに、我々は歯髓細胞の培養に適切な基質を用いることが重要と考え、生物学的材料として様々な医療領域分野で注目されている羊膜を用いることに着想した。

羊膜は、胎盤の最表層を覆う薄膜で、免疫学的に胎児を母体から隔離する特異な機序が存在する。また分娩後に胎盤よりほぼ無菌的に採取され、通常、胎盤は分娩後に廃棄される組織で、倫理的、技術的に入手が容易である。発生学的にはES細胞から3~4段階分化した段階であると考えられ、羊膜組織中には多機能幹細胞が含まれている可能性がある。また、免疫原性をもたず、各種細胞の培養基底膜として適し、抗炎症作用・感染抑制作用などを有し、他の組織にはない特徴を備えている。さらには生物学的材料として皮膚移植、臍形成術、腹部手術の際の癒着・瘢痕防止、皮膚熱傷後などの創部の被覆による治癒促進、さらには眼表面の再建などの手術療法に用いる報告があり、その移植材料としてだけでなく、培養基質としても高い有用性・有効性が注目されている。

2. 研究の目的：

これまでの研究成果をふまえ、歯髓細胞に注目し、培養歯根膜細胞シートの作成技術を

応用することで羊膜上培養歯髄細胞シートを作成すること、そして臨床応用可能な培養歯髄細胞シート作成の最適化、また羊膜独自の有用性を併せ持つ新たな培養細胞シートとしての特性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法：

・羊膜

羊膜は、帝王切開の際に胎盤から採取した研究用羊膜を購入、PBS で洗浄後、DMEM と glycerol を同量比混和した保存液中にて-80°C で冷凍保存した。そして、培養前に解凍後、PBS で洗浄、EDTA 中で 37°C、2 時間浸漬後、cell scraper を用いて羊膜上皮細胞を剥離・除去した。

・歯髄組織ならびに培養歯髄細胞

矯正学的な理由によって便宜抜歯で得られた健全な智歯（22 歳女性、24 歳女性、27 歳男性の計 3 名）から、歯髄組織を採取したものを歯髄組織、培養したものを培養歯髄細胞とした。具体的には、得られた歯を PBS で洗浄後、セメントエナメル境で切断、歯髄組織のみを無菌的に採取し、10% FBS DMEM を用いて 37°C、5%CO₂ 条件下で初代培養後、3-4 代の継代培養を行った。

・羊膜上培養歯髄細胞

歯髄細胞は 1×10⁵ cell/ml に調整後、セルカルチャーインサート上に静置した羊膜上に播種、37°C、5%CO₂、10%FBS DMEM あるいは骨分化誘導培地を用いてサブコンフルエントに達するまで培養したものを、羊膜上培養歯髄細胞とした。

・H-E 染色および免疫蛍光染色

歯髄組織と作成された羊膜上培養歯髄細胞は、包埋後に急速冷凍、-80°C で冷凍保存した。そして、8 μm の凍結切片を作成した。培養歯髄細胞は、chamber slides 上で播種し、37°C、5%CO₂ 条件下でサブコンフルエントに達するまで培養したものをを用いた。作成した切片は、通法に従い、H-E 染色と免疫蛍光染色を実施した。免疫蛍光染色は、歯髄由来幹細胞に発現する間葉系幹細胞の表面抗原マーカーである CD29、CD44、CD105、CD146、STRO-1 ならびに vimentin、Ki-67、Zo-1、desmoplakin、コラーゲン IV、コラーゲン VII、ラミニン 5、ラミニン α5 chain に関して検討した。

具体的には、それぞれの凍結切片をアセトンで 4°C、10 分間固定後、PBS で 10 分間洗浄した。非特異抗原を除去するために PBS with 1%bovine serum albumin で 20 分間処理後、遮光下で室温、1 時間、1 次抗体と反応させた。その後、0.15%TritonX-100 PBS でリンス後、遮光下で室温 1 時間、2 次抗体と反応させた。なお 2 次抗体は、vimentin、Ki-67、ZO-1、desmoplakin、コラーゲン IV、コラーゲン VII、ラミニン 5、ラミニン α5 chain に対して FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体、CD 44 に対して FITC 標識ヤギ抗ラット IgG2b 抗体、CD29、CD105、CD146 に対して FITC 標識ヤギ抗マウス IgG1 抗体、STRO-1 に対して FITC 標識ヤギ抗マウス IgM 抗体を用いた。

その後、PBS で洗浄、核の対比染色としてヨウ化プロピジウムを含有する抗退色培養液をカバーガラスの下にマウントし、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

・アリザリンレッド S 染色

DMEM あるいは骨分化誘導培地で培養した羊膜上培養歯髄細胞は、アリザリンレッド S 染色を実施した。具体的には、細胞は 95% エタノールで 15 分間固定後、アリザリンレッド S 水溶液で室温 20 分間染色後、水洗、乾燥させた。

4. 研究成果：

1. 歯髄組織の細胞構造とタンパク質発現

H-E 染色では、細胞質が星状形、明確な核小体を持ち楕円形かつ濃染性の細胞核を有する線維芽細胞に属する歯髄細胞が観察できた。そして、淡明な帯状の細胞希薄層と細胞稠密層が存在した。免疫蛍光染色では、vimentin、Ki-67、ZO-1、desmoplakin が部分的に発現した。

2. 培養歯髄細胞の細胞形態とタンパク質発現

スライドガラス上で培養された歯髄細胞は、均一で相同性を持つ紡錘状の形態であった。免疫蛍光染色において、培養歯髄細胞は歯髄組織と比べて Ki-67 陽性細胞が多くみられ、活発な細胞増殖を示した。加えて、vimentin、Ki-67、ZO-1、desmoplakin は全ての培養歯髄細胞でみられた。このため、培養歯髄細胞の免疫組織学的なタンパク質発現は、歯髄組織と類似していた。

3. 羊膜上培養歯髄細胞の細胞構造および細胞形態とタンパク質発現

羊膜上培養歯髄細胞は、羊膜上で充実性かつ密に重層構造を示した。そして、Ki-67 で示されるような活発な細胞増殖を示し、細胞質は vimentin、ZO-1、desmoplakin に濃染した。

このように、羊膜上培養歯髄細胞は、歯髄細胞と多くのタンパク質発現の特性が同じであった。

4. 羊膜上培養歯髄細胞の基底膜タンパク質の発現

細胞外マトリックスであるコラーゲン IV とコラーゲン VII ならびにラミニン 5 とラミニン $\alpha 5$ chain は、上皮と間質の間にみられる基底膜を構成する。羊膜上培養歯髄細胞において、赤色に濃染した核染色に沿うようにこれらの基底膜タンパク質は、均一に発現した。このように、培養歯髄細胞は基底膜とした羊膜に接着しており、シート状の形態を有していた。

5. 間葉系幹細胞マーカーの発現

歯髄組織に発現する代表的な間葉系幹細胞マーカーとされる CD29、CD44、CD105、CD146 ならびに STRO-1 は、歯髄組織では部分的に陽性細胞を認めた。培養歯髄細胞では、紡錘状の細胞形態と同一かつ均一に、歯髄組織と同様に CD29、CD44、CD105、CD146 ならびに STRO-1 全てにおいて細胞質が濃染された。加えて、羊膜上培養歯髄細胞では、これらの全てのマーカー陽性細胞が均一かつ重層に存在していた。このように、羊膜上培養歯髄細胞は、歯髄細胞と同様に多くの間葉系幹細胞マーカーの発現が同じであった。

6. 羊膜上培養歯髄細胞の骨分化能

骨分化誘導培地で培養した羊膜上培養歯髄細胞は DMEM で培養した羊膜上培養歯髄細胞と比べてアリザリンレッド S 染色の高い染色性を示した。

以上から、本研究で作成した羊膜上培養歯

髓細胞シートの特性として、

1. 歯髄細胞は羊膜上にて増殖し、歯髄としての性質を保持していることが示された。
2. 羊膜上歯髄細胞はシート状の形態を有し、培養細胞シートの作成が可能であった。
3. 間葉系幹細胞を有する培養細胞シートは、手術後の創傷治癒や歯周組織再生への応用の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計9件)

- ①山本俊郎、本城賢一、市岡宏顕、山本健太、赤松佑紀、足立圭司、雨宮傑、喜多正和、金村成智、羊膜を基質とした培養歯髄由来細胞シートの作成、第135回日本歯科保存学会2011年度秋季大会、2011年10月20日～2011年10月21日、大阪
- ②山本俊郎、本城賢一、市岡宏顕、足立圭司、雨宮傑、金村成智、羊膜上培養歯髄由来細胞シートの作成、第55回春季日本歯周病学会学術大会、2012年5月18日～2012年5月19日、北海道
- ③本城賢一、山本俊郎、市岡宏顕、足立圭司、雨宮傑、喜多正和、金村成智、歯周組織の再生を目指した羊膜上培養歯髄由来細胞シート作成、第12回日本抗加齢医学会総会、2012年6月22日～2012年6月24日、横浜
- ④Yamamoto T, Honjo K, Ichioka H, Amemiya T, Mazda O, Kita M, Kanamura N, Cultured of pulp-derived cells on human amniotic membrane、The 90th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research、2012年6月20日～2012年

6月23日、Brazil

- ⑤山本俊郎、本城賢一、市岡宏顕、山本健太、赤松佑紀、足立圭司、大迫文重、雨宮傑、喜多正和、金村成智、羊膜上培養歯髄由来細胞シートの免疫組織化学的検討、第136回日本歯科保存学会2012年度春季大会、2013年6月28日～2013年6月29日、沖縄
- ⑥Yamamoto T, Kanamura N, Histological examination of pulp cell sheet cultured using amniotic membrane, 35th Asia Pacific Dental Congress, 7-12 May 2013, Malaysia
- ⑦山本俊郎、本城賢一、市岡宏顕、足立圭司、雨宮傑、中村亨、金村成智、羊膜上培養歯髄由来細胞シートの骨分化に関する検討、第56回春季日本歯周病学会学術大会、2013年5月30日～2013年6月1日、東京
- ⑧山本俊郎、本城賢一、熊本園子、雨宮傑、金村成智、羊膜上培養歯髄由来細胞シートの作成及び骨分化能に関する検討、第34回日本炎症・再生医学会、2013年7月2日～2013年7月3日、京都
- ⑨本城賢一、山本俊郎、西野悠貴、木村功、雨宮傑、中井道明、金村成智、羊膜を基質とした培養歯髄由来細胞シートの作成及び骨分化能に関する検討、第58回日本口腔外科学会総会・学術大会、2013年10月10日～2013年10月13日、福岡

[その他]

- ①第12回日本抗加齢医学会総会2012優秀演題受賞
- ②35th APDC Poster Presentation 1st Prize 受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本俊郎 (YAMAMOTO, Toshiro)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：40347472

(2) 研究分担者

金村成智 (KANAMURA, Narisato)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70204542

喜多正和 (KITA, Masakazu)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60153087

雨宮傑 (AMEMIYA, Takeshi)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：90398389