

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659967

研究課題名（和文） 乳歯による高齢者の若返り医療を開拓する発生・細胞学的研究

研究課題名（英文） Outbreaktal study to development the cytologic therapy to restore the elder persons to be young with milk tooth

## 研究代表者

野中 和明 (NONAKA KAZUAKI)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：90128067

研究成果の概要（和文）：我々は、乳歯より間葉系幹細胞(SHED)を単離した。SHED はコロニー形成能や自己複製能、多分化能といった幹細胞としての特性を有していた。SHED の細胞治療への可能性を検索するために、全身性エリテマトーデス (SLE) モデルマウスに SHED を全身投与した。SHED 投与群では腎機能の低下や短寿命といった SLE 様症状を改善した。また、SLE マウスでの骨粗鬆症の症状も改善した。さらに、SHED は免疫不全マウスでの骨欠損部位に骨の再生を促進した。以上のことから、SHED は再生医療において、細胞療法の細胞源としてなりうることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：We isolated mesenchymal stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). SHED owned stem cell properties including clonogenicity, self-renew, stem cell marker expression, multipotency, in vivo tissue regenerative capacity and in vitro immunomodulatory function. To examine the therapeutic efficacy of SHED on immune diseases, SHED were intravenously transplanted into systemic lupus erythematosus (SLE) model MRL/lpr mice. Systemic SHED transplantation improved SLE-like disorders including short lifespan, elevated autoantibody levels and nephritis-like renal dysfunction. SHED transplantation was also able to recover osteoporosis bone reduction in long bones of MRL/lpr mice. Furthermore, SHED-mediated tissue engineering induced bone regeneration in critical calvarial bone-defect sites of immunocompromised mice. These data suggest SHED is source of the stem cell-based immune therapy and tissue engineering in regenerative medicine.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：小児歯科学、乳歯、幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた21世紀の医療に対する社会的要請は、組織・器官再生療法の実現化である。従って『乳歯の生命学的可能性』を開拓してヒトの健康増進に貢献することは意義深いことである。小児歯科臨床医であ

る本申請者は『捨て去られていた乳歯』の組織再生医療への最大限の活用を探究し、組織再生医療に対する社会的要望に応じていく。実際、象牙質や骨様組織形成の為に幹細胞あるいはその前駆細胞を提供するための組織として、第3大臼歯や乳歯歯髓を用いた試み

がなされている。乳歯歯髄は多くの未分化な細胞（幹細胞）を保持し、かつ永久歯との交換により自然脱落する組織である。その為、組織採取が比較的侵襲的ある点で、乳歯からの組織再生を目的とした細胞の調整法は社会的にも受け入れやすい方法である。

## 2. 研究の目的

口腔組織の間葉系幹細胞の口腔ならびに全身疾患への治療応用の基礎研究として、乳歯歯髄由来間葉系幹細胞の単離とその特性の検索を目的とする。

## 3. 研究の方法

- 1) 乳歯歯髄組織からの間葉系幹細胞 (SHED) の単離。
- 2) SHED の間葉系幹細胞としての特性の検索。
- 3) SHED の免疫調整能の検索。
- 4) 自己免疫疾患モデルマウスへの SHED の投与による治療効果の検索。

## 4. 研究成果

交換期で脱落したヒト乳歯より間葉系幹細胞 (SHED) を単離した。単離した SHED は以下の特性を示し、間葉系幹細胞の特性を有していることが証明された。

- ① 細胞培養下での増殖活性とコロニー形成能、自己複製能。
- ② フローサイトメトリーにより、造血系幹細胞特異的細胞表面マーカーは陰性、間葉系幹細胞に特異的な細胞表面マーカーが陽性。
- ③ 間葉系幹細胞特異的遺伝子の発現。
- ④ 特殊な細胞培養条件下での多分化能：骨芽細胞様細胞、軟骨細胞様細胞、脂肪細胞様細胞、内皮細胞様細胞、神経細胞様細胞、肝細胞様細胞への分化。

SHED をヘルパーT細胞のサブクラスである Th17T 細胞と共培養することにより、Th17T 細胞の活性を抑制した。このことから、SHED が免疫調整能を有することを示唆した。

SHED の全身疾患に対する細胞療法の基礎研究として、全身性エリテマトーデス (SLE) モデルマウスに SHED を静脈投与した。投与群では、自己抗体や免疫グロブリンの低下が血清学的に認められた。組織学的には至急体腎炎や基底膜損傷の抑制が認められた。また血中アルブミンの上昇や、血中クレアチニンの低下、尿中の C3 やタンパク質が低下しており、腎機能の改善が認められた。さらに、SHED 投与群では、非投与群に比べて優位に寿命が延長した。このことから、SHED が SLE への治療効果を有しており、全身疾患への細胞療法の細胞源として有用であることを示唆した。

SLE マウスでは骨粗鬆症の症状が出現するが、SHED 投与群では、マイクロ CT や組織学的な検索により、骨密度の低下が優位に抑制されていることが認められた。また、免疫不全マウス頭蓋の頭頂部に人工的に骨欠損を作成し、その部位に足場としてハイドロキシアパタイトとともに SHED を移植した。SHED を移植した部位には、対照群と比較してこ骨が優位に修復されており、組織学的には骨芽細胞だけでなく、破骨細胞も確認された。以上のことから、骨関連の疾患においても SHED がその治療に有用であることが示された。

## 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)

1. Yukiko F Ookuma, Tamotsu Kiyoshima, Ieyoshi Kobayashi, Kengo Nagata, Hiroko Wada, Fujiwara Hiroaki, Haruyoshi Yamaza, Kazuaki Nonaka, Hidetaka Sakai, Multiple functional involvement of Thymosin beta-4 in tooth germ development, HISTOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, 139, 2, 355-370, 2013.02. 査読あり, DIO: 10.1007/s00418-012-1033-1
2. Lan Ma, Yusuke Makino, Haruyoshi Yamaza, Kentaro Akiyama, Yoshihiro Hoshino, Guangtai Song, Toshio Kukita, Kazuaki Nonaka, Songtao Shi, Takayoshi Yamaza, Cryopreserved Dental Pulp Tissues of Exfoliated Deciduous Teeth Is a Feasible Stem Cell Resource for Regenerative Medicine, PLOS ONE, 7, 12, 2012. 12. 査読あり, DIO: 10.1371/journal.pone.0051777
3. JingXian Fang, Takeshi Uchiumi, Mikako Yagi, Shinya Matsumoto, Rie Amamoto, Toshiro Saito, Shinya Takazaki, Tomotake Kanki, Haruyoshi Yamaza, Kazuaki Nonaka, Dongchon Kang, Protein instability and functional defects caused by mutations of dihydro-orotate dehydrogenase in Miller syndrome patients, BIOSCIENCE REPORTS, 32, 6, 631-639, 2012. 12. 査読あり,
4. JingXian Fang, Takeshi Uchiumi, Mikako Yagi, Shinya Matsumoto, Rie Amamoto, Shinya Takazaki, Haruyoshi Yamaza, Kazuaki Nonaka, Dongchon Kang, Dihydroorotate dehydrogenase is physically associated with the

- respiratory complex and its loss leads to mitochondrial dysfunction. BIOSCIENCE REPORTS, 2012. 12. 査読あり, DIO: 10.1042/BSR20120046
5. Matsubara R, Kukita T, Ichigi Y, Takigawa I, Qu PF, Funakubo N, Miyamoto H, Nonaka K, Kukita A. Characterization and identification of subpopulations of mononuclear preosteoclasts induced by TNF- $\alpha$  in combination with TGF- $\beta$  in rats. PLoS One. 2012; 7(10): e47930. doi: 10.1371/journal.pone.0047930 査読あり
  6. 柳田 憲一, 山座 治義, 増田 啓次, 西垣 奏一郎, 大隈 由紀子, 小笠原 貴子, 野中 和明, 幼少期から口腔管理を行った Alagille 症候群の 2 例, 小児歯科学雑誌, 50, 5, 430-438, 2012. 11. 査読あり
  7. 増田 啓次, 中村 志保, 松石 裕美子, 西垣 奏一郎, 山座 治義, 柳田 憲一, 野中 和明, 下顎乳臼歯部舌側歯肉に歯胚様組織を含む腫瘍を認めた 1 例, 小児歯科学雑誌, 50, 4, 297-303, 2012. 09. 査読あり
  8. 山口 登, 大隈 由紀子, 山座 治義, 増田 啓次, 柳田 憲一, 西垣 奏一郎, 野中 和明, ウィリアムズ症候群 2 例の歯科的特徴および臨床的対応, 小児歯科学雑誌, 50, 3, 256-263, 2012. 07. 査読あり
  9. Nagata M, Nuckolls GH, Wang X, Shum L, Seki Y, Kawase T, Takahashi K, Nonaka K, Takahashi I, Noman AA, Suzuki K, Slavkin HC. The primary site of the acrocephalic feature in Apert Syndrome is a dwarf cranial base with accelerated chondrocytic differentiation due to aberrant activation of the FGFR2 signaling. Bone. 2011 Apr 1; 48(4):847-56. doi: 10.1016/j.bone.2010.11.014. 査読あり
  10. 増田 啓次, 山口 登, 山座 治義, 柳田 憲一, 野中 和明, 生体肝移植術を予定された患児の口腔内感染病巣除去を目的に, う蝕に罹患した全乳歯を抜去した 1 症例, 日本障害者歯科学会雑誌, 33, 1, 66-73, 2012. 02. 査読あり
  11. 立野麗子, 山口 登, 山座 治義, 増田 啓次, 西垣 奏一郎, 齊藤里香, 野中 和明, 大学病院小児歯科での成人脳性麻痺患者の 10 年間にわたる口腔管理, 日本障害者歯科学会雑誌, 32, 2, 2011. 06. 査読あり
1. Fatima Safira Alatas, Takayoshi Yamaza, Haruyoshi Yamaza, Yuzo Ninomiya, Kazuaki Nonaka, Shouichi Ohga, tomoaki taguchi, Trans-Differentiation and Spheroid Formation of Hepatocyte-Like Cells of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth, 4th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, 2012. 11. 14. Taipei, Taiwan
  2. 西原 恵美, 柳田 憲一, 山座 治義, 増田 啓次, 西垣 奏一郎, 野中 和明, 齶蝕に罹患した胎児性アルコール症候群の 1 例, 第 30 回日本小児歯科学会九州地方会, 2012. 10. 28. 長崎
  3. 山座 治義, 中村 志保, 柳田 憲一, 増田 啓次, 西垣 奏一郎, 野中 和明, 多数歯にわたる乳歯齶蝕を伴う軟骨無形成症の 2 例, 第 30 回日本小児歯科学会九州地方会, 2012. 10. 28. 長崎
  4. 馬 蘭, 山座 孝義, 牧野 友祐, 山座 治義, 星野 慶弘, 増田 啓太郎, 久木田 敏夫, 野中 和明, Bone regeneration using stem cells from long-term cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth, 第 54 回歯科基礎医学会, 2012. 09. 16. 郡山
  5. Kazuaki Nonaka, Craniofacial Anomaly and Translational Research. USJI Week Event4: Craniofacial Translational Research Based on Molecular Craniofacial Developmental Research, 2012. 09. 10. Washington D.C., USA
  6. Fatima Safira Alatas, Takayoshi Yamaza, Haruyoshi Yamaza, Makoto Hayashida, Yusuke yanagi, Kazuaki Nonaka, Shouichi Ohga, tomoaki taguchi, Trans-Differentiation and Spheroid Formation of Hepatocyte-Like Cells of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth, The 21st Fukuoka International Symposium On Pediatric/Maternal-Child Health Research, 2012. 08. 31. Fukuoka, Japan
  7. Lan Ma, Haruyoshi Yamaza, Kentaro Akiyama, Guangtai Song, Toshio Kukita, Songtao Shi, Kazuaki Nonaka, Takayoshi Yamaza, Long Term Cryopreserved Dental Pulp Tissues of Exfoliated Deciduous Teeth Utilize for a Feasible Stem Cell Resource for Regenerative Medicine. Gordon Research Conference, Musculoskeletal Biology & Bioengineering 2012. 08. 08.

- Andover, NH, USA
8. Fatima Safira Alatas, 山座 孝義, 山座 治義, 松浦 俊治, 林田 真, 柳 佑典, 田口 智章, 久木田 敏夫, 野中 和明, 大賀 正一, Transdifferentiation capacity into hepatocyte-like cells of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, 第 49 回日本小児外科学会, 2012. 05. 15. 横浜
  9. 山口 登, 増田 啓次, 小笠原 貴子, 西垣 奏一郎, 山座 治義, 柳田 憲一, 野中 和明, Dandy-Walker malformation 患児に象牙質形成不全の併発が疑われた 1 例, 小児歯科学会 第 50 回記念大会, 2012. 05. 13. 東京
  10. 小笠原 貴子, 増田 啓次, 柳田 憲一, 山座 治義, 西垣 奏一郎, 野中 和明, Langer-giedeon 症候群に周期性嘔吐症を併発した患児について外来にて齶蝕治療を進めた 1 例, 小児歯科学会 第 50 回記念大会, 2012. 05. 13. 東京
  11. 山座 治義, 増田 啓次, 西垣 奏一郎, 柳田 憲一, 野中 和明, 先天歯をとまなうハラマン・ストライフ症候群の 1 例, 小児歯科学会 第 50 回記念大会, 2012. 05. 12. 東京
  12. Jingxian Fang, Takeshi Uchiumi, Mikako Yagi, Haruyoshi Yamaza, Dongchon Kang, Kazuaki Nonaka. Mitochondria is involved in Miller Syndrome. Gordon Research Conference: Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration, 2012. 03. 17. Ventura, CA, USA
  13. 橋口大輔, 松石裕美子, 増田啓次, 柳田憲一, 山口登, 山座治義, 西垣奏一郎, 野中和明, 飲水時に偶発的に下顎左側第一乳臼歯が完全脱落した 1 例, 第 29 回日本小児歯科学会九州地方会大会, 2011. 10. 10. 北九州
  14. 山座治義, 柳田憲一, 増田啓次, 西垣奏一郎, 山口登, 野中和明, Denys-Drash 症候群の患児への歯科的アプローチ, 第 29 回日本小児歯科学会九州地方会大会, 2011. 10. 10. 北九州
  15. 山座孝義, 牧野友祐, 山座治義, 馬蘭, 園田聡一郎, 増田啓太郎, 野中和明, 久木田敏男, 乳歯凍結保存法がヒト乳歯由来幹細胞の免疫調節能に与える影響について, 第 53 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2011. 10. 02. 岐阜
  16. 牧野友祐, 山座孝義, 山座治義, 馬蘭, 園田聡一郎, 城戸瑞穂, 野中和明, 寺田善博, 久木田敏男, ヒト過剰歯由来幹細胞の免疫細胞療法効果について, 第 53 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2011. 10. 02. 岐阜

17. 馬蘭, 山座孝義, 牧野友祐, 山座治義, 園田聡一郎, 増田啓太郎, 久木田敏男, 野中和明, Characterization of stem cells isolated from cryopreserved exfoliated deciduous teeth, 第 53 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2011. 10. 02. 岐阜
18. Lan Ma, Haruyoshi Yamaza, Yusuke Makino, Guangtai Song, Toshio Kukita, Kazuaki Nonaka, Takayoshi Yamaza, Influence of cryopreservation on the properties of stem cells isolated from cryopreserved exfoliated deciduous teeth, International Symposium Shaping the Future of Craniofacial Sciences and Therapeutics, 2011. 08. 19. Peking, China

〔図書〕(計 2 件)

1. 野中 和明, 山座 治義, 歯科臨床イヤーノート 2014~, クインテッセンス出版, 2013. 03.
2. 山座治義, 野中和明, 小児科学第 10 版, 文光堂, 2011. 04.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野中 和明 (NONAKA KAZUAKI)  
九州大学・歯学研究院・教授  
研究者番号: 9 0 1 2 8 0 6 7

### (2) 研究分担者

山座 治義 (YAMAZA HARUYOSHI)  
九州大学・歯学研究院・講師  
研究者番号: 3 0 3 3 6 1 5 1