

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792392

研究課題名(和文) ヒト歯髄幹細胞による細胞シートを用いた再生医療の実現に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Human dental pulp stem cell sheet for tissue regeneration

研究代表者

館原 誠晃 (Tatehara, Seiko)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：90380089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、再生医療において歯髄幹細胞による細胞シートを用いた臨床応用の実現を目的とした。ヒト歯髄幹細胞を長期間培養することにより細胞シートの作製法を開発した。ヒト歯髄幹細胞シートは骨関連マーカーの発現をしていた。このシートをマウス骨欠損部位に移植すると骨形成を誘導した。次に、ヒト歯髄幹細胞を軟骨誘導培地にて培養することにより軟骨細胞シートを作製した。この細胞シートは軟骨関連マーカーを発現し、マウス皮下に移植したところ、分解されることなく、軟骨の性質が維持されていた。これらの結果からヒト歯髄幹細胞により作製した細胞シートは骨および軟骨再生に有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was clinical application of the cell sheets fabricated from human Dental pulp stem cells (hDPSCs). We developed that hDPSCs spontaneously formed cell sheet structure through culturing for several weeks. The cell sheets expressed bone-related markers by immunofluorescence staining and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). In addition, these cell sheets were transplanted into bone defects of the skull in mice, and the bone formation was histologically observed. Next, chondrogenic cell sheets were fabricated by culturing hDPSCs in the chondrogenic induction medium, expressed cartilage-related markers by immunofluorescence staining and RT-PCR. Chondrogenic cell sheets implanted under the skin kept chondral characteristics without degradation at 6 weeks after implantation. The cell sheets fabricated from hDPSCs may be useful for bone or cartilage tissue engineering.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：細胞治療 歯髄 細胞シート 骨 軟骨

## 1. 研究開始当初の背景

現在、細胞を用いた再生医療の基礎的研究が活発に行われ、一部では臨床応用されている。再生医療での細胞の供給源としては、胚性幹細胞(ES細胞)、人工多能性幹細胞(iPS細胞)や体性幹細胞がある。ES細胞およびiPS細胞は、倫理的および社会的問題、安全性の点から臨床応用までに課題が多い。一方、体性幹細胞としては、臨床応用されている骨髄由来間葉系幹細胞(BMMS C)がある。しかし、BMMS Cは腸骨から骨髄穿刺により採取されるため、患者に負担があり、また、培養期間が比較的に長いことによる多額の費用を要するという欠点がある。そこで、医療廃棄物として処理される抜去歯(乳歯、智歯)の歯髄組織内に存在する歯髄幹細胞に着目した。この細胞は、採取が簡単、増殖能が高い、多分化能を有すること、バンクにより細胞の長期凍結保存が可能であること、同種移植の可能性があることなどが示めされており、再生医療のための細胞の供給源となり得ると考えられる。

近年、細胞シート技術が再生医療の分野において有用性が示され、臨床応用されるようになってきている。細胞シートはトリプシンなどのタンパク分解酵素を使用することなく培養皿から剥がすことが可能なため、細胞や細胞間タンパク質や細胞接着タンパク質を損傷することがない。さらに、この細胞シートは形態付与が容易であり、細胞シートを数枚重ねることにより3次元的な構造を作製することも可能なため、欠損の大きさによっては細胞の足場(担体)が不要となる。このことから、歯髄幹細胞と細胞シートの特徴を兼ね備えることで、骨、軟骨、筋肉などの再生医療が実現すると考えた。研究代表者が考えている再生医療は、智歯または乳歯の抜去時に抜去歯から歯髄幹細胞を分離・培養して保存(バンキング)し、後に外傷、腫瘍、歯周病およびその他の疾患により組織欠損ができた際、保存しておいた歯髄幹細胞により細胞シートを作製して欠損部に移植するという治療法を考えている。また、歯髄幹細胞は同種移植も可能と報告されていることから、幅広い患者(歯髄幹細胞を保存していない患者)にも有用となり得る。このことから、歯髄幹細胞の分化誘導法および各細胞(骨、軟骨、筋肉)シートの作製方法を確立することは、歯学・医学・医療の進歩および患者のQOLの向上に貢献すると考えられるため、最も重要な研究と考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、再生医療において歯髄幹細胞による細胞シートを用いた臨床応用の実現を目的とした。歯髄幹細胞の多分化能と長期間培養により細胞シートが形成されることを利用して、細胞の足場(Scaffold)を必要としない歯髄幹細胞による再生医療の実現に向けて、歯髄幹細胞の特性を詳細に検討し、

歯髄幹細胞の分化誘導法および移植に適した細胞シートの作製方法を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄幹細胞の分離・培養およびその特性

鶴見大学歯学部倫理審査委員会の承認を受けると共に患者の同意を得て、健康な患者より智歯抜去後に抜去歯より歯髄組織を採取し、コラゲナーゼとディスパーゼを利用して歯髄幹細胞を分離・培養した。この歯髄幹細胞を免疫蛍光細胞染色により間葉系幹細胞のマーカーの発現について検討した。

(2) 歯髄幹細胞の分化誘導 骨、軟骨、脂肪および神経への分化誘導因子の存在下に歯髄幹細胞を培養して、その表現型の変化を経時的に観察し、各分化した細胞の特徴を形態学的に確認するとともに分化マーカーの遺伝子発現(RT-PCR法)、タンパク質発現(免疫蛍光染色)を指標として分化状態を確認した。

(3) 凍結保存した歯髄幹細胞の増殖能および分化能 分離・培養した歯髄幹細胞を2か月間凍結保存後、細胞の増殖能および分化能に変化がないか確認した。

(4) 歯髄幹細胞による各細胞シートの作製条件について検討 培養皿に歯髄幹細胞を播種して数週間培養し、細胞シートを作製した。その際、各細胞シート(骨および軟骨)の作製までの培養期間および分化誘導培地について詳細に検討して、最適な細胞シートの作製のための条件を決定した。

(5) 各細胞シートの特性

分化誘導培地にて作製した各細胞シート(骨、軟骨)のパラフィン切片を作製し、免疫蛍光染色およびRT-PCR法より各分化マーカーの発現について検討を行った。

(6) 骨欠損部への歯髄幹細胞シート移植 人工的に骨欠損モデルを免疫不全マウスに作製し、欠損部位にヒト歯髄幹細胞シートを移植して移植部位の骨再生の有無について組織学的に検討を行った。

(7) 軟骨細胞シートのマウス皮下移植

ヒト歯髄幹細胞により作製した軟骨細胞シートを免疫不全マウスの皮下に移植し、移植後6週に移植部を組織学的に観察した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト歯髄幹細胞の分離・培養

患者30名の智歯より歯髄組織を採取し、歯髄幹細胞を分離培養した。分離・培養した細胞は免疫蛍光染色にて間葉系幹細胞のマーカーに陽性を示したことから、間葉系幹細胞であることを確認した。

(2) ヒト歯髄幹細胞の分化誘導

ヒト歯髄幹細胞を各分化誘導培地(骨、軟骨、脂肪、神経)にて培養し、これらの分化マーカーについて免疫蛍光細胞染色およびRT-PCR法にて解析した結果、骨、軟骨、神経、脂肪に分化した。このことから、歯髄幹細胞

は多分化能を有することを確認した。

(3) 凍結保存した歯髄幹細胞の増殖能および分化能 ヒト歯髄幹細胞を凍結保存した後に増殖能および分化能について変化を認めなかった。この結果よりヒト歯髄幹細胞のバンクが可能であることが示された。

(4) ヒト歯髄幹細胞シート作製およびその特性 ヒト歯髄幹細胞は3週間以上培養することによりシート状構造を示した。また、培養開始時より骨誘導培地にて培養するとシート状構造を形成しなかった。作製した細胞シートは培養皿より容易に挙上が可能であった(図1)。

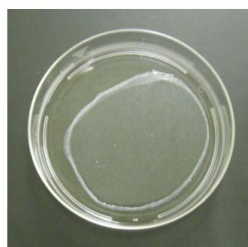


図1. ヒト歯髄幹細胞シート

また細胞シートを骨誘導培地にて1週間培養するとアリザリンレッドに染色される石灰化基質の形成を認めた。さらに免疫蛍光染色および RT-PCR 法により骨関連マーカーを発現していた(図2)。

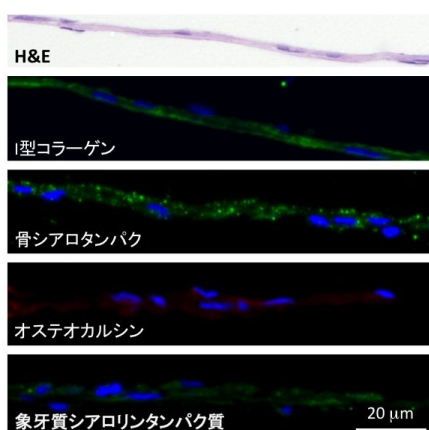


図2. ヒト歯髄幹細胞シートの骨関連タンパクの発現

(5) ヒト歯髄幹細胞シートによる骨再生 ヒト歯髄幹細胞シートをマウス頭蓋骨欠損部位に移植したところ、移植後6週に欠損部に骨形成が認められた。この結果から細胞シートの移植により骨形成が誘導されたことが示された(図3)。

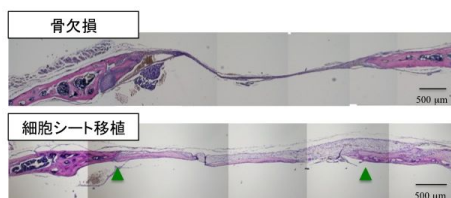


図3. ヒト歯髄幹細胞シートの移植により骨再生誘導

(6) ヒト歯髄幹細胞からの軟骨細胞シートの作製とその特性

歯髄幹細胞を軟骨誘導培地にて2週間培養することにより軟骨細胞シートを作製した。作製した細胞シートはアルシアンブルー染色に陽性を示し、免疫蛍光染色および RT-PCR 法にて軟骨関連マーカーの発現を確認した。

(7) 軟骨細胞シートによる軟骨再生

歯髄幹細胞より作製した軟骨細胞シートをマウス皮下に移植したところ、移植後6週に皮下内で白色の移植体を確認した(図4)。これを組織学的に観察したところ、軟骨関連タンパク質の発現を認めた。この結果より軟骨細胞シートは生体内で分解されずに軟骨の性質を維持して存在することが示された。

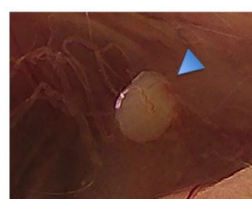


図4. ヒト歯髄幹細胞より作製した軟骨細胞シート移植後6週目の肉眼所見

## 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 2件)

館原 誠晃、今村 武浩、手塚 充樹、竹部 祐生亮、徳山 麗子、里村 一人. 歯髄幹細胞の回収を可能とする歯髄組織凍結保存法の開発、日本口腔組織培養学会学、査読有、Vol 22、No. 1、2013、5-6

Tatehara S, Tadokoro S, Imamura T, Tezuka M, Tokuyama R, Satomura K. Human dental pulp stem cell sheet for bone tissue engineering. Journal of tissue engineering and regenerative medicine 2012, Vol.6, supplement 1 pp 5

〔学会発表〕(計 7件)

館原 誠晃、田所 晋、今村 武浩、竹部 祐生亮、井出 信次、徳山 麗子、里村 一人. ヒト歯髄幹細胞を用いた軟骨細胞シートの有用性. 第13回日本再生医療学会総会(2014年3月4~6日、京都)

Tatehara S, Tadokoro S, Imamura T, Takebe Y, Tokuyama R, Satomura K. Human dental pulp stem cell sheets for bone tissue engineering. The 21<sup>st</sup> ICOMS (2013. 10. 21-24, Barcelona, Spain)

館原 誠晃、田所 晋、今村 武浩、竹部 祐生亮、井出 信次、徳山 麗子、里村 一人. ヒト歯髄幹細胞を用いた軟骨細胞シートの作製. 第26回日本口腔診断学会・第23回日本口腔内科学会 合同学術大会

(2013年9月13, 14日, 東京)

舘原 誠晃、今村 武浩、手塚 充樹、竹部 祐生亮、徳山 麗子、里村 一人．歯髄幹細胞の回収を可能とする歯髄組織凍結保存法の開発．第49回日本口腔組織培養学会学術大会(2012年11月17日 広島)

舘原 誠晃、今村 武浩、手塚 充樹、田所 晋、徳山 麗子、里村 一人．ヒト歯髄幹細胞より作製した細胞シートによる骨組織再生．第57回日本口腔外科学会総会・学術大会(2012年10月19~21日 横浜)

Tatehara S, Tadokoro S, Imamura T, Tezuka M, Tokuyama R, Satomura K. Human dental pulp stem cell sheet for bone tissue engineering. 3<sup>rd</sup> TERMIS World Congress 2012 (2012. 9. 5 - 8, Vienna, Austria)

舘原 誠晃、今村 武浩、手塚 充樹、田所 晋、徳山 麗子、里村 一人．ヒト歯髄幹細胞より作製した細胞シートの特性について検討．第56回日本口腔外科学会総会・学術大会(2011年10月21~23日、大阪)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

舘原 誠晃 (TATEHARA Seiko)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：90380089

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし