

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592889

研究課題名(和文)臨床応用に向けた象牙質再生のための幹細胞分化促進と歯髄再生法の確立

研究課題名(英文)Accerlation of stem cell differentiation for dentine regeneration and establishment of pulp regeneration for dental clinics.

研究代表者

林 宏行(HAYASHI, Hiroyuki)

大阪歯科大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：50098018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：リシン、ロイシン、または、トリプトファンによる多孔質ハイドロキシアパタイト(HA)担体気孔での骨髄幹細胞の接着は、トリプトファンが高い効果を示した。In vivoで、アルギン酸ゲル懸濁骨髄細胞を播種した多孔質HA担体の多くの気孔に骨形成を認め、外径8mmの多孔質HA担体の中空の直径が2、3、または、4mmの中で、3mmのHAが有意に骨形成効果を示した。

直径8mmの円筒状HAとその中空に入れた5mm径の円柱状スポンジからなる二相性担体に骨髄細胞あるいは口腔粘膜由来細胞と線維芽細胞を播種してラット背部皮下に埋入して、HA相に骨、スポンジ相に疎な結合組織と小血管を含む歯髄-象牙質複合体を再現した。

研究成果の概要(英文)：The attachment of the bone marrow stem cell in the porous hydroxyapatite (HA) scaffold pore with lysine, leucine or the tryptophan was examined. Tryptophan was significantly effective. In porous HA scaffold with seeding of bone marrow cells seeding suspended in alginate gel, osteogenesis was recognized in many pores of the scaffold in vivo. Furthermore, in the porous HA scaffold (Diameter: 8mm) with a hollow center (Diameter: 2, 3 or 4mm), significant increase of bone formation was shown in the scaffold with a hollow center of which diameter is 3mm.

Bone marrow cells or oral mucosa derived cells and fibroblasts were seeded in columnar sponge inserted into a hollow center of cylindrical HA. Biphasic scaffold consisted of HA with a hollow center 5 mm in diameter and columnar sponge in a hollow center of the HA. Oral mucosa derived cells and fibroblasts were seeded in the columnar sponge. Bone marrow cells were seeded in the HA.

研究分野：歯内治療学

キーワード：象牙質再生 幹細胞 分化 二相性担体

## 1. 研究開始当初の背景

歯の一部あるいは全部の再生が広く試みられるようになった。これまでに骨形成性タンパク質(BMP)による修復象牙質の形成、歯髄・象牙質構造の修復へのTransforming growth factor- $\beta$ の関与など、多くの基礎的な成果が公表されている。しかし、中胚葉組織のセメント質と象牙質そして外胚葉組織のエナメル質で構成される歯の構造は複雑であり、再生する歯の大きさの制御が困難であるために臨床応用への途はまだ開けていない。骨髄幹細胞から象牙芽細胞への分化の可能性も示唆されるが、その手段は確立されていない。

生後4日のラットの鐘状期歯胚由来の上皮細胞と間葉細胞を混合して移植したヌードラットに歯を再生した報告も見られるが、上皮細胞と間葉細胞を個々に培養した後に組み合わせる歯を再生できるとの報告は見当たらない。一方、歯髄細胞から象牙質様硬組織を形成した報告、また、歯胚から歯を再生する研究もあるが、これらについても臨床で実用できるレベルには達していない。

歯または歯髄・象牙質複合体の再生には *in vitro* でも *in vivo* でも担体が必要である。そして、多孔質の担体のすべての気孔に緻密に硬組織が形成されなければ強固な構造が得られない。象牙芽細胞の単離と培養は困難で、基礎的な実験には骨髄細胞が用いられることになる。骨髄細胞を用いた多孔質ハイドロキシアパタイト(HA)担体での骨形成では気孔壁に沿って一層の骨が形成されるのみでその気孔全体を満たす骨形成は認められず、また、担体中央の気孔には骨形成が認められない。担体全域にわたって気孔に緻密な骨を形成させる手法と新たな担体の開発が続けられている。

これらのことが、この研究を立案した背景である。

## 2. 研究の目的

歯の構造は複雑で、再生は困難と考えられる。しかし、骨と同様にオステオカルシンが象牙芽細胞でも発現し、骨と象牙質とに遺伝子学的類似性のあることが明らかにされ、*in vivo*での骨髄幹細胞から象牙芽細胞への分化の可能性も示唆、歯髄細胞から象牙質様硬組織を形成した報告、また、歯胚から歯を再生する研究もあるが、臨床で実用できるレベルには達していない。

このような現状に立って、第一に、骨髄幹細胞から象牙芽細胞あるいは歯髄細胞の分化を誘導して、再生象牙質による歯の欠損部の補填、歯髄・象牙質複合体を再生し、歯の機能を維持するために歯髄除去後の根管への歯髄の再生を臨床で実現する方途の確立を目指し、第二に、骨髄幹細胞と線維芽細胞の混合培養で歯髄細胞への分化を図ってそのメカニズムを明らかにし、さらにその結果から歯髄組織および象牙質の再生を *in vivo*で実現させて歯根膜を有する歯の再生の展望を開くことを目的とする。

## 3. 研究の方法

多孔質HA担体にリシン、ロイシン、トリプトファンあるいはデキストランをコーティングし、気孔中に骨髄細胞を播種、細胞接着性を高めて、HA担体気孔内での骨形成を増進させ得る化学物質のスクリーニングを *in vivo*で行った。さらに、豊富な数の幹細胞を入手し難い歯科領

域の実情を考え、少ない幹細胞を確実に気孔内に付着させ、そこに効果的に骨形成を誘導するため、アルギン酸ゲルを支持体として骨髄細胞を懸濁してHA担体に播種するとともに担体気孔に陰圧で注入する方法を採用した。また、中空の担体を用いることによって細胞に担体外から豊富な栄養供給がなされるように、円筒状担体の利用が合理的である結果を過去に得られている。

これらの *in vivo*実験でFischer 344 rat背部皮下に埋入(6週)する担体として、中空構造を中心にもつHA担体は外形10mm、中空径2mm、3mm、および、4mmの3種類、気効率55%、を選択し、気孔内での骨形成をオステオカルシン定量と組織学的検索で検討した。

骨髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導は困難であるが、象牙芽細胞への分化には促進因子として理解されているデキサメタゾン、アスコルビン酸そして -グリセロリン酸を使用して硬組織形成を誘導する手法が *in vitro*での一般的な方法である。この方法に加えて、リシンやロイシンによる *in vitro*でのそれらアミノ酸の細胞増殖能および硬組織形成能も検討した。

また、少数の骨髄細胞で効率的に多孔質HA担体気孔内に骨を形成させるために有効な円筒状の担体の中空部分の径が骨髄細胞による骨形成量に影響することを明らかにした。その結果を元にしてHA担体を歯根と想定して骨髄細胞を播種し、骨形成の誘導と中空部への歯髄組織再生を試みた。さらに、骨形成後のHA担体2個を並べてラット皮下に埋入して歯根膜に変わる結合組織で2個を繋いで引っ張り試験を実施した。

Fischer 344 ラット大腿骨から骨髄細胞を採取、アルギン酸ゲルに骨髄細胞を混じり、多孔質HA担体気孔内にゲルを注入、細胞播種して、象牙質を模した構造の再生を図った。また、歯根状HA担体内での骨形成とともに、歯髄細胞への分化を期待し血管上皮細胞と骨髄細胞を含むアルギン酸ゲルを担体中空部に注入、実験を行った。これらの担体はFischer 344 ラット背部皮下に埋入(6週)し、気孔内骨形成をオステオカルシン定量で検討した。また、中空部の組織形成は組織学的に観察を行った。

歯科領域で骨髄由来幹細胞を得難いために幹細胞のソースを確立するために口腔粘膜由来細胞も使用し、口腔粘膜から幹細胞、さらに、歯髄細胞への分化を期待して粘膜由来細胞を増殖させてHA担体に播種し、*in vivo*での骨形成の可能性を検討した。そのために、アルギン酸ゲルを幹細胞の支持体として担体気孔内に粘膜由来細胞を播種して気孔内骨形成を図り、アルギン酸ゲルの有効性を確認した。

## 4. 研究成果

(1)気孔中に骨髄細胞を播種、細胞接着性を高めて、HA担体気孔内での骨形成を増進させ得る化学物質の *in vivo*でのスクリーニングではオステオカルシン定量によってリシンおよびロイシンでの骨形成促進が認められたが、トリプトファンによる骨形成が有意に顕著な値が得られた。担体内での細胞接着性の向上、あるいは、細胞分化に大きな影響を及ぼす化学物質として有効と認められた。

(2)アルギン酸ゲルを支持体として骨髄細胞を

懸濁して HA 担体に播種する際に担体を陰圧中に置いて細胞を担体内に十分に入り込むような手法をとって細胞播種を行って、有意に多くのオステオカルシン量の定量結果が得られた。組織学的検索でも多くの気孔に骨形成が認められ、in vitro でも効果が示唆される結果が得られた。

(3) In vivo で Fischer 344 rat 背部皮下に埋入(6週)する担体として中空構造を中心にもつ気効率 55%、外形 10mm、中空径 2 mm、3 mm、および、4 mm の 3 種類の HA 担体を選択し、気孔内での骨形成をオステオカルシン定量と組織学的検索で検討した。その結果は直径 3mm の中空を有する HA 担体での骨形成が最も多かった。

(4) In vitro での象牙質形成の代替として骨形成試験を行い、リシンあるいはロイシンなどのアミノ酸の添加での硬組織形成は、デキサメタゾン、アスコルビン酸と  $\gamma$ -グリセロリン酸を使用しての硬組織形成量を超える効果を示さなかった。

(5) 少数の骨髄細胞で効率的に多孔質 HA 担体気孔内に骨を形成させるために有効な円筒状の担体の中空部分の径が骨髄細胞による骨形成量に影響することが明らかになり、直径 3mm の中空を有する HA 担体での骨形成が最も多かったため、その HA 担体を歯根と想定して用いた。骨髄細胞を播種し、中空部にはアルギン酸ゲルに線維芽細胞を播種して in vivo での歯髄組織の再現を試みたが血管の増殖は歯髄に比べて多く、線維成分も豊富で歯髄とは異なった組織像を呈した。

さらに、骨形成後の HA 担体 2 個を並べてラット皮下に埋入して歯根膜に変わる結合組織で 2 個を繋いで引っ張り試験を実施したが、ヒト歯根膜の強度を超える引っ張り強さは得られなかった。

(6) Fischer 344 ラット大腿骨から採取した骨髄細胞をアルギン酸ゲルに混じて多孔質 HA 担体気孔内注入した結果、多くの気孔に骨形成を認めるとともに、中空部にも形成された硬組織が浸潤した結合組織とともに観察された。

(7) Fischer 344 ラット口腔粘膜を採取して培養・分離した細胞を HA 担体に播種し、ラット背部皮下に埋入した結果、形成された骨を含む気孔は極めて少数であった。アルギン酸ゲルを支持体として口腔粘膜由来細胞を担体気孔内に播種したところ、オステオカルシン量が有意に増加した。顕著な骨形成を示す気孔が少数ではあったが、今後の実験方法の改良で口腔粘膜由来細胞による骨形成の可能性が示唆された。

## 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 4 件)

Yabuuchi T, Yoshikawa M, Kakigi H, Havashi H, Hybrid scaffolds composed of amino-acid coated sponge and hydroxyapatite for hard tissue formation by bone marrow cells, Journal of Biomedical Science and Engineering, 査読

有、Vol.7, No.6, 2014, pp. 316-329.

<http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2014.76034>

Yoshikawa M, Kakigi H, Yabuuchi T, Havashi H, Effects of laminin on hard tissue formation by bone marrow cells in vivo and in vitro, Journal of Biomedical Science and Engineering, 査読有、Vol.7, No.1, 2014, pp. 15-23.

<http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2014.71003>

Yoshikawa M, Shimomura Y, Kakigi H, Tsuji N, Yabuuchi T, Havashi H, Effect of L-lysine in culture medium on nodule formation by bone marrow cells, Journal of Biomedical Science and Engineering, 査読有、Vol.5, No.10, 2012, pp. 587-592.

<http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2012.510072>

Kakigi H, Yoshikawa M, Havashi H, Osteogenesis by bone marrow cells in a novel hybrid alginate/calcium phosphate sponge scaffold, Journal of Oral Tissue Engineering, 査読有、Vol. 9, No. 3, 2012, pp. 113-125.

[学会発表](計 16 件)

Masataka Yoshikawa, Hideyuki Kakigi, Takayoshi Yabuuchi, Norimasa Tsuji, Bone formation in the hybrid scaffold consisting of hydroxyapatite and tryptophan- or lysine-coated sponge, 5th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, 2014年7月8-11日、Dresden, Germany.

Masataka Yoshikawa, Hideyuki Kakigi, Takayoshi Yabuuchi, Hiroyuki Havashi, Hybrid scaffolds composed of leucine-coated sponge and porous hydroxyapatite for hard tissue formation by bone marrow cells, 5th International Conference on Tissue Engineering, 2014, 2014年6月20-25日、Greece, Kos

Yoshikawa M, Kakigi H, Yabuuchi T, Tsuji N, Havashi H, Hard tissue formation by bone marrow cells in hybrid scaffold with tryptophan or lysine coating sponge / hydroxyapatite, International Bone -Tissue -Engineering Congress 2013, 2013年12月16~21日、Singapore

Hideyuki Kakigi, Masataka Yoshikawa, Norimasa Tsuji, Hiroyuki Havashi, Effects of two amino acids for hard tissue formation by bone marrow stem cells in vitro, International Bone -Tissue -Engineering Congress 2013, 2013年12月16~21日、Singapore

Yoshikawa M, Kakigi H, Tsuji N, Yabuuchi T, Havashi H, Hard tissue formation by bone marrow cells in tryptophan-coated sponge scaffolds, World Conference on Regenerative Medicine, 2013年10月23~25日、Leipzig, Germany

Kakigi H, Yoshikawa M, Havashi H, Effect of leucine for bone generation in porous hydroxyapatite scaffolds, World Conference on Regenerative Medicine, 2013年10月23~25日、Leipzig, Germany

Yabuuchi T, Yoshikawa M, Havashi H, Amino

acid coating on a porous scaffold for osteogenesis in the pores by bone marrow cells, World Conference on Regenerative Medicine, 2013年10月23～25日、Leipzig, Germany  
柿木栄幸、好川正孝、辻 則正、林 宏行、骨髓幹細胞による硬組織形成に及ぼすアミノ酸の効果、日本歯科保存学会2013年度秋季学術大会(139回)、2013年10月18日、秋田県総合生活文化会館(秋田市)

Yabuuchi T, Yoshikawa M, Havashi H, Effects of amino acids for osteogenesis by bone marrow cells, 13th International Conference of the European Ceramic Society, 2013年6月23～27日、Limoges, France

Yoshikawa M, Kakigi H, Tsuji N, Yabuuchi T, Havashi H, Porous hydroxyapatite scaffold with a hollow center for bone formation in vivo, 13th International Conference of the European Ceramic Society, 2013年6月23～27日、Limoges, France

藪内崇督、柿木栄幸、辻 則正、好川正孝、林 宏行、アルギン酸ナトリウム/リン酸カルシウム複合スポンジ状担体での骨髓幹細胞による硬組織形成、日本歯科保存学会2012年度春季学術大会(136回)、2012年6月29日、沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)

Yoshikawa M, Kakigi H, Shimomura Y, Tsuji N, Havashi H, Osteogenesis in porous hydroxyapatite scaffolds with bone marrow cells in alginate gel, International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, 2012年7月18～20日、Dresden, Germany

Kakigi H, Yoshikawa M, Havashi H, Hard tissue formation in a hybrid alginate/tri-calcium phosphate sponge *in vitro*, International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, 2012年7月18～20日、Dresden, Germany  
Kakigi H, Yoshikawa M, Havashi H, Hard tissue formation in a novel hybrid alginate/calcium phosphate sponge *in vitro*, 15th European conference on composite materials, 2012年6月24-28日、Venice, Italy

Yoshikawa M, Kakigi H, Tsuji N, Havashi H, Hard tissue formation in sponges by bone marrow cells suspended in an alginate gel, 15th European conference on composite materials, 2012年6月24-28日、Venice, Italy

Yoshikawa M, Shimomura Y, Tsuji N, Yabuuchi T, Kakigi H, Havashi H, Osteogenesis by dextran coating on and among fibers of poly-vinyl formal sponge, 2012 Sino-Japan Dental Conference 日中歯科医学大会2012、2012年4月27日、成都、中華人民共和国

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 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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

林 宏行 (HAYASHI Hiroyuki)  
大阪歯科大学・歯学部・名誉教授  
研究者番号：50098018

##### (2) 研究分担者

好川 正孝 (YOSHIKAWA Masataka)  
大阪歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：70148451

##### (3) 連携研究者

なし

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)