

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：33902

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659849

研究課題名(和文) 幹細胞と脱細胞化マトリックスによる再細胞化歯髄モデルの構築

研究課題名(英文) Assembly of recellularized-dental pulp models using stem cells and decellularized dental pulp matrix

研究代表者

中村 洋 (NAKAMURA, HIROSHI)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：40064878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：界面活性剤により脱細胞化した歯髄由来の歯髄擬態マトリックス (decellularized dental pulp-mimicking matrices (ddpm)) の抽出・精製をおこない、精製したddpm上に幹細胞を播種し、経時的に total RNA を抽出し、歯髄細胞分化関連マーカーの遺伝子発現動態をRT-PCR法を用いて評価した。ddpmにより幹細胞には、歯髄細胞と比較して、歯髄細胞分化関連マーカーの有意な遺伝子発現が認められた。ddpmは、幹細胞を用いた歯髄再生に有用なスキャホルドとなる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The decellularized dental pulp-mimicking matrices (ddpm) was extracted and purified by 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS). After the cells were seeded on ddpm for 7 days, cells exhibited neural crest cell markers (FoxD3, Sox10), neural progenitor cell markers (Notch-1, Nestin), odontoblast differentiation markers (Dspp, Dmp-1, Enamelysin) and vascular endothelial cell markers (Flk-1, VE-cadherin) by reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR).

we conclude that the parental stem cells retained a specification that following ddpm treatment shifted to platform differentiated to dental pulp-like specification.

Possible alternative stem cells from other tissues including skeletal muscle could potentially be adapted for tooth organ regeneration using ddpm and these new approaches for teeth regeneration needs to be explored.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：脱細胞化 再細胞化 ES細胞 iPS細胞 骨格筋幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

先行する医学領域においては、角膜、軟骨、血管、心筋などの再生に関連する臨床研究が盛んに行われている。歯髄組織は象牙質を再生する潜在能力を有し、歯髄幹細胞が象牙質の再生に関与することが示唆され、幹細胞を用いた細胞導入治療法が従来のう蝕治療法に代わる有効な手段となる可能性がある。興味深いことに、摘出した臓器に界面活性剤を灌流してすべての細胞を溶解し、細胞内構成要素を可溶化し脱細胞化した細胞外マトリックスを足場にして、再細胞化することにより臓器を再生する再生治療が近年注目されている。私達はこれまでに、 $\alpha 7$  integrinに着目して分取したヒト骨格筋細胞が多能性ヒト骨格筋幹細胞であることを報告した。また、神経堤細胞への分化機構の解析に有用なES細胞、さらに、成熟した細胞を初期胚の状態にリセットしたiPS細胞を用いて、象牙質・歯髄複合体の再生メカニズムを解析し、新規な幹細胞を用いた細胞導入象牙質・歯髄複合体再生治療法のモデルを確立している。

本研究では、脱細胞化した歯髄の細胞外マトリックスと歯髄細胞や骨格筋幹細胞、ES細胞とiPS細胞などの多分化能を有する幹細胞、さらに摘出した歯牙を基盤鋳型を用いて歯髄組織の再細胞化（歯髄再生）のメカニズムを明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究では、界面活性剤により脱細胞化した歯髄組織の細胞外マトリックスを精製した後、歯髄細胞、骨格筋幹細胞、ES細胞とiPS細胞を用いて、歯髄組織の再細胞化（歯髄再生）の効率について生化学的手法を用いて基礎的検討を行う。さらに、ラットを用いた *in vivo* において、摘出した歯牙を基盤鋳型として、再細胞化した歯髄組織の再生を観察することで、従来の歯髄保存治療であるう蝕治療法や覆髄法に代わる新規な歯髄再生モデルを構築することを研究目的とする。本研究は、歯科領域の重要な研究テーマである象牙質・歯髄複合体（歯髄）の再生を *in vitro* さらには *in vivo* レベルで確立することを目標とする。

本研究により、歯科領域における象牙質・歯髄複合体（歯髄）の再生、そして将来的には、歯の再生と従来のう蝕治療法に代わる新規な脱細胞化マトリックスと幹細胞を用いた細胞導入治療法のモデルを確立するもので、低侵襲性の新規な治療戦略の開発に通じるものと考えられる。

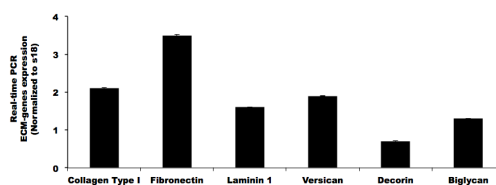
## 3. 研究の方法

本研究は、ラットの脱細胞化した歯髄の細胞外マトリックス上に歯髄細胞、歯髄幹細胞、骨格筋幹細胞、ES細胞とiPS細胞を播種し、歯髄組織の再細胞化（歯髄再生）の効率について生化学的手法（細胞生育性、アポトーシス、RT-PCR法による遺伝子解析、蛍光免疫染色、ALP染色、アリザリンレッド染色、ウェスタンブロット法、プロモーターassay、FACSによる細胞表面抗原解析と細胞周期解析、細胞接着能と細胞運動能の解析など）を用いて基礎的検討を行う。さらに、ラットを用いた *in vivo* において、摘出した歯牙を基盤鋳型として、再細胞化した歯髄組織の再生を観察する。

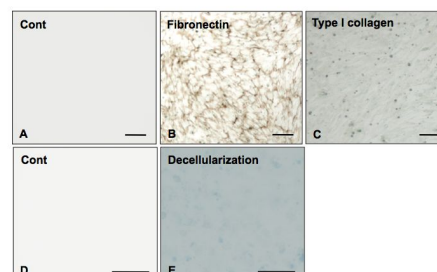
## 4. 研究成果

### (1) 歯髄脱細胞化細胞外マトリックス (ddpm) の精製

8週齢の雄性Wister系ラットの歯牙（前歯）を顎骨ごと摘出し、0.1% SDSを灌流した後、エタノールを用いてSDSの洗い流しを行い、歯髄由来の脱細胞化細胞外マトリックスを回収・精製を行なった。ddpmの構成成分をReal-time PCR法と免疫染色法を用いて検討した結果、ddpmはコラーゲンタイプI、FibronectinやVersicanなどの細胞外マトリックスから構成されていることが明らかとなった。



The ddpm genes were investigated by Real-time PCR (TaqMan). Bars represent means  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent determination performed.

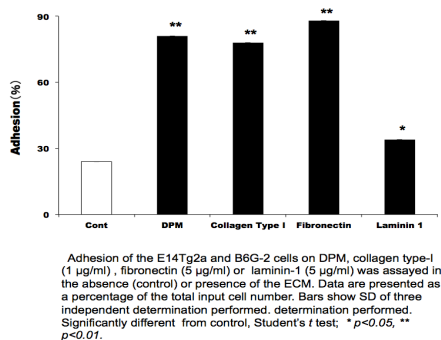


(A-C) The ddpm proteins were investigated by immunocytochemical analysis. (D, E) Remaining proteins after decellularization were confirming by Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining. Scale bars = 100  $\mu$ m.

### (2) 精製したddpm上に歯髄細胞、骨格筋幹細胞、ES細胞とiPS細胞を播種し、細胞生育性、

## 細胞接着性および細胞運動能について適正条件の検討

0.1% SDSで脱細胞化したddpm上に歯髄細胞, 骨格筋幹細胞, ES細胞とiPS細胞を播種し, 7日間培養後, 細胞生育性, 細胞接着性および細胞運動能について検討を行った結果, 統計学的有意な細胞生育性, 細胞接着性および細胞運動能が観察され, 0.1% SDSで5分間処理が脱細胞化には適正であることが明らかとなった。

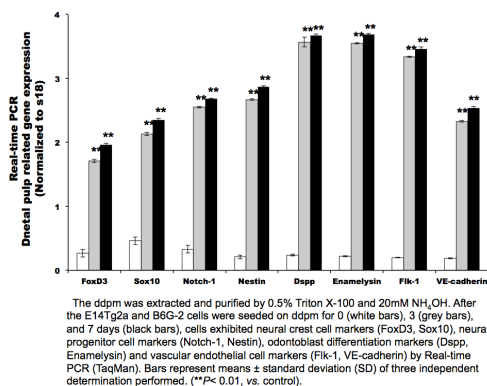


### (3) ddpmの石灰化能の検討

0.1% SDSで脱細胞化したddpm上に歯髄細胞, 骨格筋幹細胞, ES細胞とiPS細胞を播種し, 7日間培養後, ALP染色とアリザリンレッド染色によりddpmの石灰化能を観察した結果, 統計学的有意な石灰化能を有していることが明らかとなった。

### (4) ddpmの歯髄細胞分化能の評価

精製したddpm上に歯髄細胞, 骨格筋幹細胞, ES細胞(A)とiPS細胞を播種し, 経時的にtotal RNAを抽出し, 神経堤細胞マーカー(FoxD3, Sox10), 神経前駆細胞マーカー(Notch-1, Nestin), 象牙芽細胞分化マーカー(Dspp, Enamelysin), 血管内皮細胞マーカー(Flk-1, VE-cadherin)の遺伝子発現動態をReal-time PCR (TaqMan)法を用いて評価した結果, 歯髄細胞分化マーカーの発現が統計学的有意に観察された。さらに, 象牙芽細胞分化マーカー(DSP)の発現動態を免疫染色法を用いて観察した結果, DSP陽性細胞が統計学的有意に観察された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Nobuaki Ozeki, Makio Mogi, Hideyuki Yamaguchi, Taiki Hiyama, Rie Kawai, Naoko Hase, Kazuhiko Nakata, Hiroshi Nakamura, and Randall H. Kramer, Differentiation of human skeletal muscle stem cells into odontoblasts is dependent on induction of  $\alpha 1$  integrin expression, J Biol Chem., 査読有, 2014 Apr 1 Epub ahead of print in press.

Nobuaki Ozeki, Rie Kawai, Hideyuki Yamaguchi, Taiki Hiyama, Katsue Kinoshita, Naoko Hase, Kazuhiko Nakata, Ayami Kondo, Makio Mogi and Hiroshi Nakamura, IL-1 $\beta$ -induced matrix metalloproteinase-13 is activated by a disintegrin and metalloprotease-28-regulated proliferation of human osteoblast-like cells, Exp Cell Res., 査読有, 2014 Apr 15;323(1):165-77

〔学会発表〕(計4件)

尾関伸明, 山口秀幸, 檜山太希, 川合里絵, 中村 洋, マウス ES 細胞機能を制御する歯髄擬態マトリックスの開発, 第 11 回日本再生歯科医学会学術大会・総会, 2013 年 8 月 31 日, 日本大学理工学部 CST ホール

Ozeki N, Yamaguchi H, Kawai R, Nakata K, Nakamura H, Odontogenic potential of iPS and ES cells using decellularized dental pulp matrix, 第 9 回世界歯内療法会議, 第 34 回日本歯内療法学会学術大会, 第 11 回日韓合同歯内療法学会学術大会, 2013 年 5 月 26 日, 東京国際フォーラム

尾関伸明, 山口秀幸, 川合里絵, 茂木眞希雄, 中村 洋, マウス iPS 細胞と ES 細胞を用いた歯髄再生における歯髄脱細胞化マトリックスの役割, 第 12 回日本再生医療学会総会. 2013 年 3 月

22 日, パシフィコ横浜

尾関伸明, 山口秀幸, 川合里絵, 中村  
洋, 歯髄脱細胞化マトリックスを用いた  
iPS 細胞と ES 細胞の象牙質分化能, 第 10  
回日本再生歯科医学会学術大会・総会,  
2012 年 9 月 2 日, ニチイ学館 神戸ポート  
アイランドセンター

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

中村 洋 (NAKAMURA HIROSHI)  
愛知学院大学・歯学部・教授  
研究者番号 : 40064878

### (2)研究分担者

尾関 伸明 (OZEKI NOBUAKI)  
愛知学院大学・歯学部・講師  
研究者番号 : 70469005