

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253101

研究課題名(和文) 未知なる歯髄細胞の機能を解析し、新たな歯髄再生療法の臨床的展開を目指す。

研究課題名(英文) Analyzing the unknown potential of dental pulp cells, and aiming to the new clinical development of regenerative therapy of dental pulp tissue

研究代表者

横瀬 敏志 (Yokose, Satoshi)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：90245803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄細胞の多分化能を調べた結果以下の結論が得られた。1 歯髄組織(歯の神経がある組織)に存在するいろいろな組織に分化する細胞を利用して、もう一度歯髄組織を再生する方法を見出した。2 ヒトのES細胞から歯髄細胞を分化させ、これを歯髄の再生療法に応用する方法を確立した。3 新たな歯髄保護(虫歯や歯周病で歯の神経が失われないように保護する方法)法のために、機能性ガラス(いろいろな活性物質を放出できる小さなガラスビーズ)や魚のコラーゲンを応用して象牙質形成(歯の大部分を構成する硬い組織)を促進させる方法を確立した。これらの結果は、歯の保存するために大切な歯髄保護と歯髄再生療法の発展に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：This study presented the following conclusions: 1 Dental pulp tissue contains stem cells which can apply for regenerative dental pulp therapy. Therefore, we established culture system to isolate the stem cells from dental pulp tissue and confirmed that the stem cells differentiated into mature odontoblasts producing mineralized dentin matrix. 2 We established the methods to make ES cells differentiate into mature odontoblasts and to apply the cells for regenerative dental pulp therapy. 3 In order to attempt to develop regenerative dental pulp therapy, we tried to use functional glass beads and fish collagen as the biomaterials for scaffold of the stem cells. The stem cells included in the scaffold differentiated into mature odontoblasts which produced abundant mineralized dentin matrix. These results can contribute to development of regenerative dental pulp therapy in clinical application.

研究分野：保存治療学

キーワード：歯髄組織 再生療法 象牙質形成 Ectodin 生体活性ガラス スフェロイド ES細胞 レーザー

1. 研究開始当初の背景

保存治療において歯を保存することは8020 運動に直結する重要な課題である。しかしながら歯の喪失原因を調べると、多くの場合この歯の命とも言える歯髄組織を失うことから始まっている。そこで歯を保存するために歯髄組織の保存療法と再生療法を確立しようと考えた。そのために歯髄細胞の機能を根本的に調べ直し、実際に臨床で応用するために必要な基本的なデータを蓄積することに主眼を置いた。

2. 研究の目的

歯を保存するための保存治療の発展には、新しい視点に立った歯髄再生療法が期待されている。そのために、まず歯髄の発生過程を詳細に検討することにより歯髄細胞・歯髄幹細胞の分化メカニズムの本態を明らかにする。さらに、明らかになった歯髄幹細胞の特性から、新しい歯髄幹細胞分離システムを構築する。また、生体の種々の間葉系幹細胞、ES 細胞にこの知見を応用し、歯髄細胞を誘導する。その後、適切なスキャフォールドを用いて歯髄の再生を誘導する。最終的には、再現性のある治療法として確立させるために、細胞の採取から移植までの流れを標準化することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 歯髄組織の発生過程を中心に、歯髄細胞・歯髄幹細胞の分化のメカニズムを解明する。そのためにヒト・ラットの歯髄組織から多分化能を有する未分化間葉細胞を分離し、二次元培養と3次元培養方法を確立し、これらの細胞を使用して象牙芽細胞へ強力に分化誘導する因子(増殖因子、物理的な刺激因子)を探索した。

(2) ヒト ES 細胞から歯髄細胞を誘導する培養方を確立して、その細胞を用いて歯髄組織としての機能を有するかを検証した。

(3) 歯髄細胞が象牙質形成を行う象牙芽細胞に分化し、さらに効率良く機能できる細胞周囲環境を提供するためのスキャフォールド(担体、足場)の材料を検討した。臨床応用を踏まえて、安全性の高い生体活性ガラスと魚由来のコラーゲンを使用して歯髄細胞への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 歯髄幹細胞の分離培養方法の確立と分化促進因子の発見

ラットの歯髄組織から酵素法によって分離した培養歯髄細胞を用いて、Ectodin の作用を調べた結果以下の結果が得られた。Ectodin は歯髄組織の中でも象牙細管、象牙芽細胞にその発現が見られた。さらに干渉 RNA を用いて ectodin の遺伝子のノックダウンを行った結果、図 1 に示すように培養 20

日目には石灰化象牙質形成を反映する黒色の結節の形成と、アルカリフォスファターゼ活性が抑制されることが示された(左の上下が対照群。右の上下が ectodin をノックダウンした歯髄細胞)。

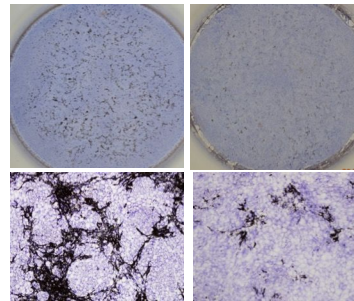


図 1

これによって ectodin が象牙芽細胞の象牙質形成に強く関与することが明らかにされた。一般に ectodin は wnt (ウイント) シグナルの中でもカノニカル経路に対して抑制因子になることが知られている。さらにこの wnt シグナルの主要因子である wnt10a と wnt6 が象牙芽細胞の分化や象牙質形成に深く関与することもしられている。そこで ectodin の作用機序を探るために、ectodin と wnt10a の関係を調べたところ、図 2 に示すようにカノニカル経路に作用する wnt10a の遺伝子発現が ectodin の遺伝子をノックダウンすることによって強く抑制されることが分かった。すなわち ectodin は象牙芽細胞の分化・象牙質形成に対して wnt10a を介して調整していることを明らかにした。

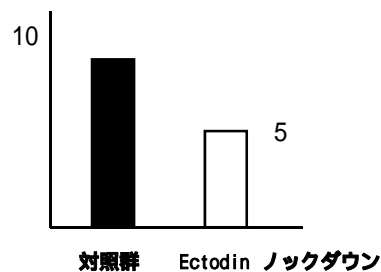


図 2 Wnt10a の遺伝子発現

歯髄組織から歯髄の幹細胞を分離して、効率良く象牙芽細胞へ分化させるための培養方法として3次元培養法を考えた。これはスキャフォールドフリー(担体を有さない培養方法)のスフェロイド培養法で、この状態で培養したところ、スフェロイド体の内部では歯髄幹細胞の分化は抑制されたが、外側では歯髄幹細胞の分化が促進され、象牙質形成が見られた。また、歯髄幹細胞の分化にはインテグリンシグナルが重要であることがわかり、さらにはペリオスチンという物質が象牙質形成を抑制している可能性が見出された。これらの結果はスフェロイド培養法が歯髄組織の再生療法や歯髄保護法の開発に有用であることがわかり、臨床応用が比較的簡単に行える可能性を示した。

低出力レーザー照射が象牙芽細胞の分化を促進し象牙質形成を促進させる可能性を見出した。Ectodin は象牙芽細胞の分化や象牙質形成に対して積極的に作用する因子であるが、歯を削った後に半導体レーザーを低出力で照射すると象牙芽細胞に対してectodin の発現を誘導することが分かった。これによって低出力レーザー照射刺激も象牙質形成促進因子になることが分かった。

(2) マウス ES 細胞における象牙芽細胞への分化にかかわるシグナルカスケードの検索

マウスの ES 細胞を用いて象牙芽細胞へ分化する過程で働く細胞内でのシグナル伝達を詳しく調べた結果、2 インテグリン、細胞外基質メタロプロテナーゼインデューサー(Emmprin)ならびに MMP-3 の遺伝子およびタンパク質の発現が観察された。さらに ES 細胞から象牙芽細胞へ分化してゆく過程でこれらの遺伝子ならびにタンパク質は互いに作用しあって 2 インテグリン⇨細胞外基質メタロプロテナーゼインデューサー(Emmprin)⇨MMP-3 シグナルカスケードの存在が明らかになった。

(3) 象牙芽細胞にとって分化と象牙質形成を亢進させるためのスキャフォールド(担体、足場)の構築

歯髄組織から分離した培養歯髄細胞に魚由来のコラーゲンペプチドを添加して、象牙芽細胞への分化と象牙質形成能に対する影響を調べた結果、未分化な細胞が象牙芽細胞に分化して象牙質形成を促進させることが分かった。そしてこの魚由来のコラーゲンを歯髄の再生療法に応用するためにスキャフォールド(担体、足場)として使用できるように酸処理と凍結乾燥を行った結果、八二カム構造が形成され、歯髄細胞の吸着が良好になり、細胞増殖と象牙質形成にとって最適な細胞外環境を構築できた。これによって歯髄再生療法に魚由来のコラーゲンペプチドが有用であることが示された。

歯髄保護法や歯髄再生療法に応用するためのスキャフォールド(担体、足場)の材料として生体活性ガラスに着目した。すでに骨組織の再生療法には使用されている材料であるが歯髄腔という特殊な環境で使用できるように工夫が必要であった。我々は生体活性ガラスに含まれるストロンチウムという物質に着目し、石灰化基質を形成することを確認した。そしてアルギン酸ナトリウムと石膏を添加して生体活性ガラスを歯髄組織の覆髄材として応用する方法を確立した。その結果、生体活性ガラスの材料に接している面に、象牙質の形成が認められ、実験群全ての歯髄組織に対して象牙質形成が確認された。これらの結果はストロンチウムを多く含む生体活性ガラスは新規覆髄材として歯髄保護法や歯髄再生療法に応用できることが確認で

きた。

以上のように歯髄再生療法の確立のための細胞レベルから材料に至る貴重なデータが数多く得られ、今後の新たな歯髄再生療法の構築と臨床応用に貢献できる成果であったと考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

T. Yamazaki, T. Kikui, S. Yokose: Histological demonstration of bone healing in rat tibiae influenced by diode laser irradiation. Japan Society for Laser Surgery and Medicine 37, 80-86, 2016. 査読有

横瀬敏志: 歯髄再生療法とレーザー治療腎と骨代謝 29, 49-58, 2016. 査読有

松本典祥, 泉利雄(他 8 人中 7 番目): PS リポソームと生体ガラスの併用がラット頭蓋骨欠損部に及ぼす骨形成促進作用効果の解明 日本外傷歯学会誌 11, 55-60, 2016 査読有

川島伸之, 齋藤 正寛, 興地隆史: Osr2 (odd-skipped related 2) はマウス歯乳頭細胞の硬組織形成細胞への分化を促進する 歯内療法学会誌 37, 38-44, 2016 査読有

M. Zhou, N. Kawashima, N. Suzuki 他 5 名: Periostin is a negative regulator of mineralization in the dental pulp tissue. Odontology, 103, 152-159, 2015 DOI: 10.1007/s10266-014-0152 査読有

N Suzuki, K. Takimoto, N. Kawashima: Cathepsin K Inhibitor Regulates Inflammation and Bone Destruction in Experimentally Induced Rat Periapical Lesion. J Endod. 41, 1474-1479, 2015 DOI: 10.1016/j.joen.2015.04.013 査読有

K. Yamamoto, T. Ikeda, K. Yanagigich, S. Yamada, Y. Hayashi: The Characterization of Fish(Tilapia) Collagen Sponge as a Biomaterial. Int. J. Polymer Science 06/2015; 2015:1-5, DOI: 10.1055/2015/957385 査読有

尾関伸明, 長谷奈央子, 茂木眞希雄, 中田和彦: 幹細胞由来高純度象牙芽細胞を用いた *in vitro* 歯髄炎モデルにおける MMP-3 の新規知見. 日本歯科保存学雑誌 58(5): 347-355, 2015 査読有

N. Ozeki, N. Hase, H. Yamaguchi, T. Hiyama, R. Kawai, A. Kondo, K. Nakata, M. Mogi: Polyphosphate induces matrix metalloproteinase-3-mediated proliferation of odontoblast-like cells derived from induced pluripotent stem cells. *Exp Cell Res* 2015; 333: 303-315. 査読有

Y. Hashimoto, E. Matsuzaki, K. Higashi, F. Takahashi-Yanaga, A. Takano, M. Hirata, F. Nishimura: Sphingosine-1-phosphate inhibits differentiation of C3H10T1/2 cells into adipocyte. *Molecular and Cellular Biochemistry* 401,39-47 2015 査読有

M.Yamamoto, N.Kawashima, N.Takashino, Y.Koizumi, K.Takimoto, N.Suzuki, M.Saioto, H.Suida: Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation of dental pulp cells. *Arch.Oral Biol.* 59,310-317, 2014.Doi.org/10.1016/j.archoralbiol.2013.12.006 査読有

N.Ozeki, N.Hase, T.Hiyama, H.Yamaguchi, R.Kawai, A.Kondo, K.Nakata, M.Mogi: L-1 -induced, matrix metalloproteinase-3-regulated proliferation of embryonic stem cell-derived odontoblastic cells is mediated by the Wnt5 signaling pathway.*Exp.Cell Res.* 323, 69-86 2014 doi:10.1016/j.yexcr.2014.05.006. Epub 2014 May 20. 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

上田堯之、門倉弘志、鈴木瑛子、横瀬敏志: Wnt10a と ectodin はラット培養歯髄細胞の dentinogenesis を誘導する 第 143 回日本歯科保存学会 2015 年 11 月 12 日、文京シビックホール、東京

上田堯之、門倉弘志、横瀬敏志: ラット歯髄培養細胞における ectodin の象牙芽細胞文化に及ぼす影響について 第 142 回日本歯科保存学会 2015 年 6 月 25、26 日北九州国際会議場(福岡、北九州市)

山田志津香、池田 毅、柳口嘉治郎、林善彦: う蝕と歯周病予防に有効なキトサンオリゴマー含有軟性チューイングガムの試作第 143 回日本歯科保存学会 2015 年 11 月 12 日、文京シビックホール、東京

柳口嘉治郎、山本耕平、松裏貴史、池田

毅、山田志津香、林 善彦: 根尖孔を介した試作 S-PRG フィラー含有ルートキヤナルシーラーの骨内組織反応 143 回日本歯科保存学会 2015 年 11 月 12 日、文京シビックホール、東京

Bakhit A, Kawashima N, Hashimoto K, Noda S, Nara K, T.Okiji: Cytotoxic Effects of New Calcium Silicate-based Sealers on an Osteoblastic Cell Line 第 143 回日本歯科保存学会 2015 年 11 月 12 日、文京シビックホール、東京

橋本健太郎、川島伸之、野田園子、奈良圭介、Alamuddin Bakhit、齋藤正寛、興地隆史: 次亜塩素酸ナトリウムおよび EDTA で処理した象牙質ディスクにおける歯乳頭細胞の接着と分化 2015 年 11 月 12 日、文京シビックホール、東京

横瀬敏志: 歯髄組織の保存について考える 第 142 回日本歯科保存学会 2015 年 6 月 25 日 北九州国際会議場(福岡、北九州市)

川島伸之、山本弥生子、橋本健太郎、Alamuddin Bakhit、小泉悠、辺見浩一、大井智恵、鈴木規元、興地隆史: 歯髄組織及び歯肉組織より得られた間葉系幹細胞の硬組織形成細胞への分化能の比較第 142 回日本歯科保存学会 2015 年 6 月 25、26 日 北九州国際会議場(福岡、北九州市)

畠山純子、松本典祥、赤尾瑛一、泉健太郎、西崎竜司、中山英明、水上正彦、松崎英津子、泉利雄、阿南壽: PS リポソームおよびハイドロキシアパタイトの併用による骨欠損修復への応用 2015 年 6 月 25 日 北九州国際会議場(福岡、北九州市)

尾関伸明、山口秀幸、長谷 奈央子、檜山太希、川合里絵、茂木 眞希雄、松本 享、中田和彦: IL-1 β 誘導オートファジー関連遺伝子 Atg5 はマウス ES 細胞由来象牙芽細胞の細胞増殖を制御する 2015 年 6 月 25 日 北九州国際会議場(福岡、北九州市)

Hashimoto K, Kawashima N, Bakhit Y, Yamamoto M, Koizumi Y, Takahashi S, Ohi C, Suzuki N: ALPase Activity of Pulp Cells on EDTA and NaClO-treated Dentin. 2015 IADR/AADR/CADR General Session in Boston, Mass., USA, March 11-14, 2015 Hynes Convention Center, Boston, MA

N. Kawashima, K. Hashimoto, A. Y.

Bakhit, M. Yamamoto, Y. Koizumi, S.
Takahashi, C. Ohi, N. Suzuki:
Mineralizing Properties of
Gingiva-derived Mesenchymal Stem
Cells Cultured in 3D-condition. 2015
IADR/AADR/CADR General Session in
Boston, Mass., USA, March 11-14, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

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 0 件)

なし

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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横瀬 敏志 (Yokose Satoshi)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号: 90245803

(2) 研究分担者

川島 伸之 (Kawashima Nobuyuki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究

科・助教

研究者番号: 60272605

西村 英紀 (Nishimura Fusanori)

広島大学・医歯(薬)学総合研究

科・教授

研究者番号: 80208222

泉 利雄 (Izumi Toshio)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号: 40248547

金指 幹元 (Kanazashi Mikimoto)

神奈川歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 80339811

尾関 伸明 (Ozeki Nobuaki)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号: 70469005

池田 毅 (Ikeda Takashi)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号: 90244079