

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463187

研究課題名(和文) 早老症をモデルとした老化制御機構の解明に関する小児歯科的アプローチ

研究課題名(英文) Study of the anti-aging effects of stem cells from human exfoliated deciduous teeth using progeria mice

研究代表者

山座 治義 (Yamaza, Haruyoshi)

九州大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：30336151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、脱落乳歯由来幹細胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth; SHED)の抗酸化ストレス作用および多分化能による抗老化作用の可能性を検索するとともに、老化制御機構の解明を目的とした。SHEDの単離に成功するとともに、早老症モデルマウスを用いて、SHEDの老化制御機構について解析中である。また本研究課題と関連して、老化関連疾患である骨粗鬆症モデルマウスへのSHED投与により、骨密度の増加が確認された。現在、詳細な解析を行っているところである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the anti-aging effects of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). We succeeded to isolate SHED and are analyzing the mechanism of aging using progeria mice with SHED administration. In addition, we confirmed the increasing of the bone density in osteoporosis mice with SHED administration and are analyzing its detail mechanism.

研究分野：小児歯科

キーワード：小児歯科 ヒト脱落乳歯由来幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

本邦では、65歳以上の高齢者人口および高齢化率は、平均寿命の延長や低い出生率を反映して今後も上昇を続け、平成27(2015)年には国民の約4人に1人が65歳以上の高齢者という本格的な高齢社会が到来するものと見込まれている。このように他の国に類をみない超高齢化社会を迎えるにあたり、医療や介護など年々膨らむ高齢者福祉への費用抑制が急務となり、その対策の一つとして老化制御機構の解明による健康寿命の延長があげられる。

老化は生後直後から始まるといわれ、回避することができない生命現象である。老化のメカニズムとして、消耗説や神経内分泌説、フリーラジカル説など様々な学説が提唱されているが、詳細については未だ明らかにされていない。研究代表者は、多くの生物種でその効果が実証されているカロリー制限による抗老化・寿命延長機構の解明をインスリンシグナル伝達系を中心に検索を行ってきた。また、カロリー制限を授乳期の母体に応用して、小児の成長発育や代謝への影響についても検索を行っている(研究費5)。

一方、早老症は年齢よりも早期に全身的な老化現象が出現する早発性老人症で、原因の多くはDNA修復酵素遺伝子の異常である。症状として、一般的な加齢現象と同様に肝機能や腎機能の低下、耐糖能を含む代謝機能の低下などがあり、老化現象との関連について注目されている疾患である。

概日リズムの調節に重要な役割を果たす時計遺伝子の一つであるBmal1遺伝子のノックアウトマウスは、体重増加が早期に抑制され、また短寿命であることから早老症モデルマウスとして注目を浴びている(Kondratov RV. et al., 2006)。Bmal1ノックアウトマウスの寿命短縮機構の詳細は不明であるが、インスリンを産生する膵臓細胞の萎縮に関連した耐糖能の異常や、各臓器の活性酸素種(Reactive oxidative species; ROS)の産生が上昇しており、寿命制御機構とインスリンシグナル伝達系との関連性や、老化現象における酸化ストレスの影響を裏付ける所見である。近年の小児肥満の増加の原因の一つに、朝食を食べないなどの食習慣の乱れから生じる概日リズムの変調が注目されている。肥満や生活習慣病の発症は老化現象の促進と関連していることから、時計遺伝子の老化・寿命制御機構との関連性については、小児の健全な発育発達の側面からも興味深いところである。

乳歯は永久歯との交換時期に自然脱落して、生体にとって従来は『捨てる』ものであった。その歯髄組織から幹細胞の特徴(自己複製能と多分化能)を有するヒト脱落乳歯由来幹細胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth; SHED)が単離された(Miura M. et al., 2003)。

SHEDは免疫寛容性という特徴を有し

ていることから同種あるいは異種への移植が可能であり、ヒト自己免疫疾患モデルマウスへのSHED移植により、腎機能の回復が組織学的、生化学的に実証された(研究費3、論文投稿中)。また、SHEDの肝細胞への分化誘導に成功し、SHEDあるいはSHEDから分化誘導した肝細胞の肝疾患モデルマウスへの移植により、肝臓での移植片の生着と肝機能の回復が確認された(研究費2、論文作成中)。このようにSHEDは骨髄由来幹細胞と同様に幹細胞としての優れた能力を有しており、骨髄や脂肪組織のように外科的侵襲を施すことなくアプローチできることから、細胞治療の幹細胞ソースとして理想的である。近年、骨髄由来幹細胞の新たな能力として、酸化ストレスに対して耐性能を有することが報告された(Cho KO. et al., 2012, Dey R. et al., 2012)。このことから、SHEDが各臓器でROS産生を抑制できることが予想され、SHEDが早老症の老化現象を抑制することも推定される。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、SHEDの抗酸化ストレス作用および多分化能による抗老化作用の可能性を検索するとともに、老化制御機構の解明を目的とする。早期に老化現象が出現する早老症モデルマウスにSHEDやSHEDから分化誘導したインスリン産生細胞を移植して、モデルマウスにける各臓器の活性酸素種の産生抑制や、寿命延長機構に重要な関連を示すインスリンシグナル伝達系を解析するとともに、老化制御に関与する遺伝子やシグナル伝達系の同定と解析を行う。以上のことから、本研究課題では小児歯科的アプローチによる老化現象の解明に挑む。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、早老症モデルマウスへのSHEDおよびSHEDから分化誘導した細胞の移植による抗老化・寿命延長効果の可能性とそのメカニズムの検索による老化制御機構の解明を目的に、以下の項目について研究を推進する。

1. 早老症モデルマウスへのSHED移植による老化現象抑制(ROS産生抑制、各臓器の代謝機能の改善、骨形成の亢進、生殖能の回復、寿命延長など)の検索
2. SHEDの細胞への分化誘導法の確立
3. 分化誘導した細胞の早老症モデルマウスへの移植と、老化現象抑制の検索
4. 老化制御機構に関連する遺伝子やシグナル伝達系の同定と解析

## 4. 研究成果

ヒト乳歯歯髄から通法によりSHEDの単離・培養に成功した。SHEDの特徴として、フローサイトメトリを用いて幹細胞マーカー(STRO-1, CD146, CD73, CD105:陽性)や造血幹細胞マーカー(CD34, CD45, CD14,

CD11b：陰性)の発現を確認した。SHED の Doubling assay と BrdU を用いた自己増殖能の確認を行った。

SHED の細胞への分化誘導法を確立するために、骨髄由来間葉系幹細胞での細胞への分化誘導法を参考に、SHED の細胞への分化誘導を行った。分化誘導後の細胞を RT-PCR 法や免疫染色法、ウエスタンブロット法を用いて、細胞特異的マーカー(Insulin, Pdx-1, Nkx6.1, GLUT2 など)の発現を検索したが、結果は陰性であった。

SHED の全身投与による老化制御機構への影響を検索するために、早老称モデルマウスである Bmal1 ノックアウトマウスのヘテロ接合体の雌雄ペアを導入した。Bmal1 ノックアウトマウスはホモ接合体では不妊であることから、ヘテロ接合体での系統維持を行った。同マウスの遺伝型については通法に従い、特異的プライマーを用いた PCR 法でジェノタイプングを行った。寿命集団については、野生型とホモ接合体の実験群を作成し、ホモ接合体の実験群については、SHED 投与群と非投与群に分けて現在、寿命曲線を作成中である。

本研究課題に関連した実験として、野生型マウスに SHED を静脈内投与して寿命への影響を観察している。SHED 投与群では非投与群に比べて、寿命が延長する傾向にあり、現在も継続中である。また、老化関連疾患である骨粗鬆症日て、そのモデルマウスへの SHED 投与により、骨密度の増加が認められた。以上の実験については、詳細な解析を行っている。

#### <参考文献>

- Kondratov RV. et al., Genes Dev. 2006 20(14): 1868-1873
- Miura M. et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2003 100(19): 5807-5812
- Cho KO. et al., Cell Biol Int 2012 Oct 5
- Dey R. et al., Cerebellum 2012 Jul 24

#### 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 17 件)

1. Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Ma L, Hoshino Y, Nonaka K, Terada Y, Kukita T, Shi S, Yamaza T. Immune therapeutic potential of stem cells from human supernumerary teeth. J Dent Res. 2013 Jul;92(7):609-15.
2. 増田啓次, 柳田憲一, 小笠原貴子, 山座治義, 大隈由紀子, 西垣奏一郎, 廣

藤雄太, 野中和明, 先天性全盲, 精神遅滞および下垂体機能低下症を合併する透明中隔視神経異形成症の患児に全身麻酔下で歯科治療を行った 1 例, 日本障害者歯科学会雑誌 35(1): 22 -27 2013

3. 増田啓次, 山座治義, 西垣奏一郎, 小笠原貴子, 大隈由紀子, 柳田憲一, 野中和明, Hallermann, Streiff 症候群に歯肉腫瘍を伴う先天歯を認めた 1 例, 小児歯科学会雑誌 51(4): 461-466 2013
4. 増田啓次, 小笠原貴子, 山座治義, 大隈由紀子, 西垣奏一郎, 廣藤雄太, 柳田憲一, 野中和明, Langer-Giedion 症候群に埋伏過剰歯, 永久歯萌出遅延, 叢生を認めた 1 例, 小児歯科学会雑誌 51(4): 467 -472 2013
5. 増田啓次, 大隈由紀子, 小笠原貴子, 山座治義, 西垣奏一郎, 柳田憲一, 廣藤雄太, 野中和明, 6 か月齢で Lowe 症候群と診断された 1 症例の歯科的所見, 小児歯科学会雑誌 51(4): 473 -478 2013
6. 木船敏郎, 増田啓次, 山座治義, 野中和明, トモシンセンスを応用した新しい側方歯幅径予測法の開発, 小児歯科学会雑誌 53(1): 27-34 2015
7. 山座治義, 増田啓次, 柳田憲一, 西垣奏一郎, 小笠原貴子, 廣藤雄太, 野中和明, Angelman 症候群の患児に多数歯齶蝕を認めた 1 例, 小児歯科学雑誌 52(4): 559 -564 2014
8. 増田啓次, 山座治義, 西垣奏一郎, 小笠原貴子, 柳田憲一, 廣藤雄太, 野中和明, 鼻腔内の過剰歯を本院耳鼻咽喉科と連携し内視鏡下に摘出した 1 例, 小児歯科学雑誌 52(4): 551 -558 2014
9. 増田啓次, 中村志保, 山口登, 小笠原貴子, 山座治義, 西垣奏一郎, 柳田憲

- 一，廣藤雄太，野中和明，  
Dandy-Walker variant の患児に歯の  
形成不全症の合併が疑われた 1 例，小  
児歯科学雑誌 52(3): 440 -447 2014
10. Masuda K, Kawano S, Yamaza H,  
Sakamoto T, Kiyoshima T,  
Nakamura S, Nonaka K. Complete  
resolution of a calcifying cystic  
odontogenic tumor with  
physiological eruption of a dislocated  
permanent tooth after  
marsupialization in a child with a  
mixed dentition: a case report. *World  
J Surg Oncol.* 2015 Sep 17;13:277.  
doi: 10.1186/s12957-015-0697-0.
  11. Yamaza T, Alatas FS, Yuniartha R,  
Yamaza H, Fujiyoshi JK, Yanagi Y,  
Yoshimaru K, Hayashida M,  
Matsuura T, Aijima R, Ihara K,  
Ohga S, Shi S, Nonaka K, Taguchi T.  
In vivo hepatogenic capacity and  
therapeutic potential of stem cells  
from human exfoliated deciduous  
teeth in liver fibrosis in mice. *Stem  
Cell Res Ther.* 2015 Sep 10;6(1):171.  
doi: 10.1186/s13287-015-0154-6.
  12. Ma L, Aijima R, Hoshino Y, Yamaza  
H, Tomoda E, Tanaka Y, Sonoda S,  
Song G, Zhao W, Nonaka K, Shi S,  
Yamaza T. Transplantation of  
mesenchymal stem cells ameliorates  
secondary osteoporosis through  
interleukin-17-impaired functions of  
recipient bone marrow mesenchymal  
stem cells in MRL/lpr mice. *Stem  
Cell Res Ther.* 2015 May 27;6:104.  
doi: 10.1186/s13287-015-0091-4.
  13. Shimokawa I, Komatsu T, Hayashi  
N, Kim SE, Kawata T, Park S,  
Hayashi H, Yamaza H, Chiba T,  
Mori R. The life-extending effect of  
dietary restriction requires Foxo3 in  
mice. *Aging Cell.* 2015  
Aug;14(4):707-9. doi:  
10.1111/ace1.12340.
  14. Kamohara R, Yamaza H, Tsuchiya T,  
Komatsu T, Park S, Hayashi H,  
Chiba T, Mori R, Otabe S, Yamada K,  
Nagayasu T, Shimokawa I.  
Overexpression of the adiponectin  
gene mimics the metabolic and  
stress resistance effects of calorie  
restriction, but not the anti-tumor  
effect. *Exp Gerontol.* 2015  
Apr;64:46-54. doi:  
10.1016/j.exger.2015.02.011.
  15. 増田啓次, 山座治義, 松石裕美子, 磯  
村麻衣子, 柳田憲一, 西垣奏一郎, 小  
笠原貴子, 廣藤雄太, 野中和明 . 混合  
歯列期小児の全身麻酔中に生じた幼若  
永久歯外傷の 1 例 . 小児歯科学会雑誌  
53(3): 421 -426 2015
  16. 増田啓次, 山座治義, 磯村麻衣子, 柳田  
憲一, 小笠原貴子, 西垣奏一郎, 廣藤雄  
太, 野中和明 . 非感染性下顎骨骨髄炎  
と掌蹠膿疱症を伴う SAPHO 症候群の  
1 例 . 小児歯科学会雑誌 53(3): 427  
-434 2015
  17. 木船敏郎, 増田啓次, 山座治義, 野中  
和明 . トモシンセシスパノラマエック  
ス線写真のみを使った下顎の即時混合  
歯列分析法の開発 . 小児歯科学会雑誌  
53(4): 495 -500 2015
- [学会発表](計 23 件)
1. Haruyoshi Yamaza, Kazuaki  
Nonaka. Dihydroorotate  
dehydrogenase depletion inhibits  
mitochondrial function in  
osteoblasts. Gordon Research  
Conferences: Craniofacial

- Morphogenesis & Tissue Regeneration, March 30 - April 4, 2014. Lucca (Barga), Italy
2. Haruyoshi Yamaza, SHED in regenerative dental medicine. USJI Week Event5: Contribution of US-Japan exchange of researchers in development of the molecular basis of dental and maxillofacial regenerative medicine leading collaboration among South-East Asian countries and US-Japan, 2013.09.06. Washington D.C., USA
  3. 眞田知基, 大隈由紀子, 小笠原貴子, 西垣奏一郎, 山座治義, 増田啓次, 柳田憲一, 野中和明. 鼻腔内に過剰歯の萌出を認めた一例. 第 31 回日本小児歯科学会九州地方会, 2013.10.20. 福岡
  4. 宮崎晶子, 柳田憲一, 大隈由紀子, 小笠原貴子, 西垣奏一郎, 山座治義, 増田啓次, 野中和明. 顔面脂肪腫により顎骨の変形をきたした一例. 第 31 回日本小児歯科学会九州地方会, 2013.10.20. 福岡
  5. 江藤友美, 小笠原貴子, 大隈由紀子, 西垣奏一郎, 山座治義, 増田啓次, 柳田憲一, 野中和明. 脳肋骨下顎症候群の患児にエナメル質形成不全を認めた 1 例. 第 31 回日本小児歯科学会九州地方会, 2013.10.20. 福岡
  6. 星野慶弘, 山座孝義, 馬蘭, 山座治義, 野中和明. ヒト歯髄幹細胞に対するピリルピンの影響. 第 55 回歯科基礎医学会 2013.09.22. 岡山
  7. 馬蘭, 山座孝義, 星野慶弘, 山座治義, 野中和明, 久木田敏夫. Expression of erythropoietin receptor on stem cells from exfoliated deciduous teeth. 第 55 回歯科基礎医学会 2013.09.22. 岡山
  8. 大隈由紀子, 山座治義, 柳田憲一, 増田啓次, 小笠原貴子, 野中和明. Lowe 症候群患児の歯科的特徴. 第 51 回日本小児歯科学会大会 2013.05.23. 岐阜
  9. 小笠原貴子, 柳田憲一, 増田啓次, 山座治義, 西垣奏一郎, 大隈由紀子, 野中和明. 透明中隔欠損-視神経異形成症の患児に全身麻酔下で治療を行なった 1 例. 第 51 回日本小児歯科学会大会 2013.05.23. 岐阜
  10. 山座治義, 柳田憲一, 大隈由紀子, 小笠原貴子, 増田啓次, 野中和明. 乳歯齲蝕を伴う Angelman 症候群の 1 例. 第 51 回日本小児歯科学会大会 2013.05.24. 岐阜
  11. Haruyoshi Yamaza. Dihydroorotate dehydrogenase depletion hampers mitochondrial function and osteogenic differentiation in osteoblasts. 頭脳循環 Kick Off Symposium, 2015.02.27. Fukuoka, Japan
  12. Haruyoshi Yamaza. Inhibition of mitochondrial function by depletion of Dihydroorotate dehydrogenase depletion in osteoblast. The 25th Fukuoka International Symposium On Pediatric/Maternal-Child Health Research, 2014.08.30. Fukuoka, Japan
  13. 小笠原貴子, 柳田憲一, 西垣奏一郎, 山座治義, 増田啓二, 野中和明. 下顎骨骨吸収を伴うパーキット白血病患児で化学療法終了後に骨梁回復を認めた一例. 第 32 回日本小児歯科学会九州地方会, 2014.11.23. 北九州
  14. 西垣奏一郎, 柳田憲一, 小笠原貴子, 山座治義, 増田啓二, 野中和明. 骨髄異形成症候群を合併した Dubwitz 症

- 候群患児に対する歯科的対応 . 第 32 回日本小児歯科学会九州地方会,2014.11.23. 北九州
15. 星野慶弘、山座孝義、馬蘭、友田恵利佳、山座治義、野中和明 . ビリルビン影響下におけるヒト歯髄幹細胞の機能回復 . 第 56 回歯科基礎医学会 2014.09.27. 福岡
16. 宮崎晶子、柳田憲一、松石裕美子、小笠原貴子、西垣奏一郎、山座治義、増田啓二、野中和明 . 脳幹奇形を伴う Goldenhar 症候群の一例 . 第 52 回日本小児歯科学会大会 2014.05.17. 東京
17. 山座治義、柳田憲一、西垣奏一郎、小笠原貴子、増田啓二、野中和明 . 外胚葉異形成症の歯科的管理の 1 例 . 第 52 回日本小児歯科学会大会 2014.05.16. 東京
18. 松石裕美子、柳田憲一、小笠原貴子、西垣奏一郎、山座治義、増田啓二、野中和明 . 第一第二鰓弓症候群が疑われる硬軟口蓋裂を有する新生児の 1 例 . 第 52 回日本小児歯科学会大会 2014.05.16. 東京
19. 柳 佑典, Alatas, Fastima Safira, 吉丸 耕一郎, 林田 真, 大賀 正一, 山座 治義, 山座 孝義, 田口 智章 . 四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウスに対するヒト脱落乳歯幹細胞移植療法の有効性に関する研究 . 第 51 回日本小児外科学会 2014.05.09. 東京
20. 渡邊圭子、宮崎晶子、磯村麻衣子、松石裕美子、友田恵利佳、廣藤雄太、小笠原貴子、山座治義、増田啓二、野中和明 . ウィスコット オルドリッチ症候群の患児における歯科的対応 . 第 33 回日本小児歯科学会九州地方会,2015.11.15. 福岡
21. 木船敏郎、増田啓二、山座治義、野中和明 . エックス線画像のみで可能な簡易混合歯列分析法 (下顎) . 第 33 回日本小児歯科学会九州地方会,2015.11.15. 福岡
22. 宮崎晶子、山座治義、柳田憲一、増田啓二、小笠原貴子、西垣奏一郎、野中和明 . 全身麻酔法を用いた当科での歯科治療における医療連携 . 第 53 回日本小児歯科学会大会 2015.05.22. 広島
23. 小笠原貴子、磯村麻衣子、柳田憲一、山座治義、西垣奏一郎、増田啓二、野中和明 . 非感染性下顎骨髄炎を伴う SAPHO 症候群の 1 例 . 第 53 回日本小児歯科学会大会 2015.05.22. 広島
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)  
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)  
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  
山座 治義 (YAMAZA, Haruyoshi)  
九州大学・大学院歯学研究院・講師  
研究者番号：30336151
- (2)研究分担者  
なし
- (3)連携研究者  
星野 慶弘 (HOSHINO, Yoshihiro)  
九州大学病院・医員  
研究者番号：20444797
21. 木船敏郎、増田啓二、山座治義、野中和明 . エックス線画像のみで可能な簡