

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670877

研究課題名(和文)孫が祖父母を救う

研究課題名(英文)Recovery of grandparents by grandchildren

研究代表者

野中 和明 (Nonaka, Kazuaki)

九州大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90128067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、乳歯より間葉系幹細胞(SHED)を単離した。SHEDの骨粗鬆症における細胞治療への可能性を検索するために、モデルマウスにSHEDを全身投与した。投与後に骨密度や骨梁の回復が確認された。長管骨組織学的に解析した結果、骨梁の回復とともに、骨芽細胞の増加とTRAP陽性細胞の減少が認められた。遺伝子発現解析でRunx2, ALP, Osteocalcinの発現がSHED投与群で上昇していた。血清中の骨吸収に関連するsRANKLとCTXの濃度をELISA法で測定した結果、SHED投与群で低下していた。以上のことから、SHEDの全身投与は骨形成を促進するとともに、骨吸収を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We isolated mesenchymal stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). To examine the therapeutic efficacy of SHED on osteoporosis, SHED was intravenously transplanted into MRL/lpr mice which were the model for osteoporosis. Systemic transplantation of SHED recovered the reduction of bone density and structures in MRL/lpr mice by microCT analysis. Histological analysis showed SHED transplantation increased and decreased the number of osteoblasts and TRAP-positive cells, respectively, in the long bones. Gene expression analysis showed that the expression levels of Runx2, ALP, and Osteocalcin were significantly increased in the bones. In addition, SHED transplantation reduced the serum concentrations of soluble receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand (sRANKL) and C-terminal telopeptides of type I collagen (CTX), which were related with bone resorption. These results indicated systematic SHED transplantation promoted the bone formation and inhibited the bone resorption.

研究分野：小児歯科

キーワード：乳歯幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会における爆発的医療費増大は、若年者の社会経済的負担増という深刻な問題を惹起している。そこで子ども達と高齢者の相互扶助的視点からの生命学的学術研究推進が、この重大な社会経済的問題を軽減できるひとつの方策として期待される。しかしながら、ヒトのライフサイクルを網羅した研究の実現は皆無であった。そこで『孫の恩返し(子ども社会から大人社会への恩返し)』を具体化した本研究課題の遂行は、社会経済的救済のみならず世代間互助によるヒトの心と絆の安定に無限の光明を灯すことができる。

### 2. 研究の目的

こどもは社会の宝であり神秘的可能性を秘めた存在である。小児歯科学のスローガン『乳歯は生命の源である』がその具体例のひとつである。少子化と高齢化の日本社会で高齢者医療に貢献できるライフサークルを網羅した新規医療の開拓が小児歯科医療の使命である。我々は永久歯との交換による『自然脱落直後の乳歯歯髄に多分化能や免疫制御能をもつ間葉系幹細胞が保持されている』ことを発表した。そこで本研究課題ではトランスレーショナルリサーチ推進の視点から、骨粗鬆症モデルマウスを用いて『乳歯幹細胞療法の高齢者骨粗鬆症への応用の可能性』を解き明かし、疾患予防と進行抑制をもたらす新薬開発の糸口を開拓する。

### 3. 研究の方法

1. ヒト乳歯歯髄組織からの SHED の単離：乳歯歯髄から通法により SHED を単離して、フローサイトメトリーにて幹細胞表面マーカーの発現を検索し、*in vitro* での分化誘導による多分化能を確認する。  
2. SHED の骨粗鬆症モデルマウスへの移植  
3. 疾患モデルマウスへの SHED 移植後の解析：骨の経時的变化：マイクロ CT を用いて、SHED 移植後の疾患モデルマウスにおける骨密度、皮質骨および骨梁を検索する。試料採取：SHED 移植後 4 週間で、疾患モデルマウスより血清と大腿骨を採取し、大腿骨の一部は組織切片作成に供する。血清サンプルと大腿骨の一部は凍結保存し、骨形成と骨吸収に関連する分子の検索に活用する。可溶性 RANK ligand (sRANKL) と I 型コラーゲン C-テロペプチド (CTX) の測定：骨吸収に関連する破骨細胞分化因子 (sRANKL) と骨基質の分解産物で骨吸収量を反映する指標である CTX の血清濃度を ELISA 法で測定する。骨芽細胞および破骨細胞特異的因子、骨基質の発現解析：骨芽細胞特異的因子 (Runx2, ALP, Osteocalcin) 遺伝子の発現量の変化、骨基質主成分の I 型コラーゲン遺伝子・タンパク質の発現量の変化を RT-PCR 法とウエスタンブロット法でそれぞれ検索する。組織学的検索：骨組織切片の作製後、HE 染色にて骨梁、

骨髄、皮質骨の変化を検索する。また、TRAP 染色にて破骨細胞数の変化を検索する。

### 4. 研究成果

1. 交換期で脱落したヒト乳歯より間葉系幹細胞 (SHED) を単離した。単離した SHED は以下の特性を示し、間葉系幹細胞の特性を有していることが証明された。

細胞培養下での増殖活性とコロニー形成能、自己複製能。

フローサイトメトリーにより、造血系幹細胞特異的細胞表面マーカーは陰性、間葉系幹細胞に特異的な細胞表面マーカーが陽性。

間葉系幹細胞特異的遺伝子の発現。

特殊な細胞培養条件下での多分化能：骨芽細胞様細胞、軟骨細胞様細胞、脂肪細胞様細胞、内皮細胞様細胞、神経細胞様細胞、肝細胞様細胞への分化。

2. 骨粗鬆症モデルマウスである MRL/lpr mice に SHED を静脈投与した。コントロールとして間葉系幹細胞の Gold Standard である人骨髄幹細胞 (BMSC) を同様に投与した。投与後にマイクロ CT にて、骨密度や骨梁の回復が SHED および BMSC 投与群で確認された。また、長管骨組織学的に解析した結果、骨梁の回復とともに、骨芽細胞の増加と TRAP 陽性細胞の減少が認められた。において、骨芽細胞特異的因子 (Runx2, ALP, Osteocalcin) 遺伝子の発現が SHED および BMSC 投与群で上昇していた。さらに、血清中の骨吸収に関連する sRANKL と CTX の濃度を ELISA 法で測定した結果、SHED および BMSC 投与群で低下していた。以上のことから、SHED の全身投与は骨形成を促進するとともに、骨吸収を抑制することが示唆された。

### 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 12 件)

1. 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 Mar 23. DOI: 10.1111/ace1.12340
2. 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 Feb 16; 64C:46-54. DOI: 10.1016/j.exger.2015.02.011
3. Yamaguchi N, Nakamura S, Yamaza H, Nishigaki S, Masuda K, Yanagita K,

- Nonaka K. Clinical approach to a suspected case of first branchial arch syndrome. Case Rep Med. 2014: 506804  
DOI: 10.1155/2014/506804
4. 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. DOI: 10.1177/0022034513490732
  5. 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. [http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j\\_journal.html](http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j_journal.html)
  6. 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齲蝕を認めた 1 例, 小児歯科学雑誌 52(4): 559 -564 2014. [http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j\\_journal.html](http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j_journal.html)
  7. 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. [http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j\\_journal.html](http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j_journal.html)
  8. 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. [http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j\\_journal.html](http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j_journal.html)
  9. 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. <http://www.kokuhoken.or.jp/jsdh-hp/html/journal/>
  10. 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. [http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j\\_journal.html](http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j_journal.html)
  11. 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. [http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j\\_journal.html](http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j_journal.html)
  12. 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. [http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j\\_journal.html](http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/j_journal.html)
- 〔学会発表〕(計 22 件)
1. 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
  2. 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
  3. 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
  4. 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 Dubowitz 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
  5. 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
  6. 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
  7. 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
  8. 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
  9. 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
10. 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
  11. Fang Jingxian. Zebrafish as Model for Craniofacial Research. Kyudai Oral Bioscience 2013 -8th International Symposium-, 2014.02.28. Fukuoka, Japan
  12. Kazuaki Nonaka, Asian-Pacific Regenerative Medicine Realization Consortium. 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
  13. 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
  14. Lan Ma. Cryopreservation of Dental Pulp Tissue of Exfoliated Deciduous Teeth is a Suitable Stem Cell Bank for Regenerative Medicine. The 24th Fukuoka International Symposium On Pediatric/Maternal-Child Health Research, 2013.08.31. Fukuoka, Japan
  15. 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
  16. 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
  17. 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
  18. 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ビンの影響. 第 55 回歯科基礎医学学会 2013.09.22. 岡山
  19. 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 回歯科基礎医学学会 2013.09.22. 岡山
  20. 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
  21. 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
  22. 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. 乳歯齶蝕を伴う 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
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)
- 〔その他〕  
ホームページ等
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
野中 和明 (NONAKA, Kazuaki)  
九州大学・大学院歯学研究院・教授  
研究者番号: 90128067
- (2)研究分担者  
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