

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861890

研究課題名(和文) Wntシグナルを活性化し増殖させた歯髄幹細胞と歯の硬組織は骨補填材になりうるか？

研究課題名(英文) Can teeth hard tissue and multiplied mesenchymal stem cells by activating Wnt signaling pathway derived from dental pulp be useful for bone graft material?

研究代表者

檀上 敦 (DANJO, ATSUSHI)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：80452712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨再生のための足場としては脱灰していない象牙質が一番細胞増殖、接着の面で優れていた。Wntシグナルを活性化した歯髄細胞の細胞増殖能はコントロールに比べて優れており、それに伴い石灰化量も多かった。免疫不全マウスの背部皮下への移植実験では骨組織の形成が確認できたが、コントロールと比べて有意な差をもって多くの硬組織を形成したとは言えなかった。細胞が局所にとどまるために何らかの方策が必要であると考え。

研究成果の概要(英文)：The non-decalcified dentin for scaffold for bone regeneration was good in cell proliferation and adhesion. The cell proliferation ability of the dental pulp cells which activated Wnt signaling pathway was superior to control, and there was much calcified quantity with it. I can confirm the ectopic osseous tissue formation by the transplant experiment to the back skin of the immunodeficient mice, but we can not trust that the Wnt signaling activated cells can formed the hard tissue of most with the difference that was more meaningful than control. We think one of the reason is cell diffusion, so we have to develop a new method to localize the transplanted cells to make more hard tissue.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：再生医療 歯髄細胞 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

顎口腔領域の手術において骨移植が必要になる場面は多い。骨移植材料としては腸骨や脛骨等の骨髄を多く含む長管骨が望ましいと考えられているが、骨採取のために新たな手術侵襲を伴うという欠点がある。そこで自家新鮮骨に代わる細胞や骨基質の供給源を検索し検証する必要があると考えた。埋伏智歯は口腔外科外来において日常的に抜歯され、その抜去歯は医療廃棄物として破棄されている。歯には歯根膜細胞、歯髄細胞などの幹細胞を含む細胞成分と骨の硬組織の主成分であるハイドロキシアパタイト (HA) が豊富なエナメル質や象牙質が含まれており、骨組織再生に必要な3つの要素である足場、細胞、成長因子のうち足場と細胞がそろっている。そこで抜歯した埋伏智歯を骨補填材料として利用することを目的として、研究を計画した。

2. 研究の目的

歯髄細胞は骨髄と同様に幹細胞を含み骨芽細胞へ分化しうる細胞だといわれている。われわれはこれまでに歯髄と歯の硬組織を用いて骨補填材として利用できないかどうかを検討してきた。そして、抜歯した智歯を NOD/scid マウスの背部皮下に移植して象牙質や骨組織が再生されることや (Yamashita Y et al., 2002)、歯髄組織単独でも同様の組織再生が認められることと、さらに骨基質中に多く認められる IGF-1 を併用するとより多くの骨組織が形成されることを報告してきた (山下ら、2005)。現在、歯の硬組織から抽出した HA と歯髄細胞をマウス皮下に移植することで骨が形成されることを確認している。しかし、歯髄細胞は1本の歯から採取できる細胞に限られていることから、移植に必要な細胞の増殖に時間を要し、骨形成量も十分でなかった。そこで、歯髄細胞を増殖させるために Wnt シグナル経路に着目した。古典的 Wnt

シグナル経路は Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) を抑制することによってカテニンの分解が抑制されて活性化する。実際に GSK3 を抑制することで古典的 Wnt シグナル経路を活性化することは骨量を増加させることが報告されている (Gambardella A et al, 2011)。これは間葉系幹細胞を増殖させさらに骨芽細胞への分化を誘導するからであると考えられる。そこで歯髄細胞において Wnt シグナルを活性化させる GSK3 阻害剤を添加することで幹細胞の増殖と、骨形成が促進されるかどうか、また歯の硬組織とともにマウスに移植を行い、効果的に骨形成がおこるのかどうかを評価することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

1. 骨再生のための足場としての歯の硬組織形態の検討 (脱灰していないエナメル質、脱灰していない象牙質、脱灰した象牙質の比較)

脱灰していない歯と脱灰後の歯を同じサイズに破砕し、歯髄細胞とともに培養した。各足場の細胞接着能、細胞増殖能を比較した。

2. Wnt シグナルを活性化した歯髄細胞の細胞増殖能と骨芽細胞への分化誘導の評価
Wnt シグナルを活性化する GSK3 の阻害剤 6-bromo-indirubin-3'-oxime (BIO) か SB216763 を添加した歯髄細胞を培養し、細胞増殖実験 (WST-8 法; 比色定量法)、BrdU 染色、コロニー形成実験、骨芽細胞分化誘導実験 (ALP 染色、ALP 活性の定量、von Kossa 染色、Alizarin Red 染色、カルシウム量の比色定量、ALP, Runx2, osteocalcin の遺伝子の定量) を行った。

3. 免疫不全マウスの背部皮下への移植実験 (骨誘導能の評価)

歯髄細胞が最も増殖した足場である非脱灰の歯を用い、歯髄細胞の増殖効果が一番高かった GSK3 阻害剤の濃度 (BIO ; 0.2mM, SB216763; 5mM) で刺激した歯髄細胞と1週間

共培養し、足場とともに細胞を NOD/Scid マウス背部皮下に移植した。8週間後に摘出し、組織学的評価を行った。対照群は GSK3 阻害剤の溶媒のみを細胞に添加した細胞を使用して足場とともに細胞を NOS/Scid マウスに移植したものとした。

4. 免疫不全マウスの頭頂骨骨欠損部への移植実験（骨伝導能の評価）

歯髓細胞が最も増殖した足場である非脱灰の歯を用い、歯髓細胞の増殖効果が一番高かった GSK3 阻害剤の濃度 (B10 ; 0.2mM, SB216763; 5mM) で刺激した歯髓細胞と1週間共培養した。NOS/Scid マウスの頭頂骨に直径 3mm の骨欠損をラウンドバーで作製し、その骨欠損部位に共培養した歯髓細胞と非脱灰の歯を移植した。4週間後に欠損部の骨形成を組織学的に評価した。対照群は GSK3 阻害剤の溶媒のみを細胞に添加した細胞を使用して足場とともに細胞を NOS/Scid マウスに移植したものとした。

4. 研究成果

骨再生のための足場としては脱灰していない歯が細胞増殖、接着の面で優れていた。Wnt シグナルを活性化した歯髓細胞の細胞増殖能はコントロールに比べて優れており、それに伴い石灰化量も多かった。しかしながら、その細胞増殖能の促進効果は他の報告と比べると低濃度で起こっていた。また、一般的に効果があるといわれている濃度においては対照群と有意差がなかった。これらの事に関しては、細胞培養条件や、細胞濃度等で異なると思われるが、今後再度検証が必要となってくるだろうと思われる。免疫不全マウスの背部皮下への移植実験では骨組織の形成が確認できたが、コントロールと比べて有意な差をもって多くの硬組織を形成したとは言えなかった。骨欠損部への移植実験では実験群、対照群ともに十分な骨形成を示しており、有意な差は認めなかった。これらのことから、今回の実験では invitro では Wnt シグ

ナル活性化に伴う細胞増殖効果は明らかであったが、in vivo では骨伝導能、骨誘導能ともにその効果が有意なものでなかったといえる。今後さらに検証を続け、今回の実験結果を詳細に分析したいと考える。

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 25 件)

1. Numb chin 症候群として発症したびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) の 1 例 檀上 敦、山下佳雄、下平大治、進藤岳郎、内橋和芳、後藤昌昭 日口外誌 61 巻 1 号 p.10-14 査読有
2. Milk basic protein supplementation enhances fracture healing in mice. Yoneme H, Hatakeyama J, Danjo A, Oida H, Yoshinari M, Aijima R, Murata N, Watanabe T, Oki Y, Kido MA. Nutrition 2015 Feb;31(2):399-405. 査読有
3. A Parallel-group comparison study of celecoxib with loxoprofen sodium in third mandibular molar extraction patients. Yamashita Y, Sano N, Shimohira D, Danjo A, Goto M Int J Oral Maxillofac Surg. 2014 43(12):1509-13. 査読有
4. 下顎非対称を伴う下顎前突症患者に対する両側下顎枝矢状分割術後の経時的機能回復の検討 下顎対称症例との比較研究 山下佳雄、近藤成智、隅 康二、重松正仁、檀上 敦、後藤昌昭 日顎変誌 24 巻 3 号 p.239-245 査読有
5. 上顎悪性腫瘍切除後に使用したプレート型骨膜下インプラント支持による顎補綴装置の長期経過 山下佳雄、井上将成、下平大治、檀上 敦、後藤昌昭 Jpn J Maxillofac Impl 13(1) p.15-20 査読有
6. CT データを用いて 3D プリンタで製作された頭蓋顔面骨模型を使っての復顔 山口能正、檀上 敦、山下佳雄、後藤昌昭 顎顔面補綴 37(2) p.96 査読無
7. 超音波骨切削器具を用いて切削したラット頭蓋骨の組織学的評価 回転切削器具との比較 檀上 敦、山下佳雄、合島伶央奈、下平大治、井上将成、後藤昌昭 Jpn J of Maxillofac Impl 13(3) p.173 査読無
8. アルミナセラミック人工骨にて下顎骨再建した患者に対してデンタルインプラントを用いて咬合再建を行った 1 例 山下佳雄、下平大治、井上将成、檀上 敦、後藤昌昭 Jpn J Maxillofac Impl 13(3) p.150 査読無
9. 診断時に心臓転移を認め、治療中に下肢

- 動脈塞栓症を合併した ALK 陽性未分化大細胞型リンパ腫の 1 例 永井功造、須山ゆかり、飯田千晶、田代克弥、檀上 敦、甲斐敬太 日本小児血液・がん学会雑誌 51(4) p.347 査読無
- 1 0 . 関節突起骨折に対する保存的治療後の骨性治癒の 3 次元的评价 井上将成、山下佳雄、重松正仁、下平大治、檀上 敦、後藤昌昭 日口科誌 63(4) p.357 査読無
- 1 1 . 乳塩基性タンパク投与によるマウス骨折治癒促進効果 米女博司、畠山純子、檀上 敦、合島怜央奈、村田直久、渡辺敏之、沖 雄二、城戸 瑞穂 J Oral Biosci Suppl. 2014 巻 p.191 査読無
- 1 2 . 舌下腺窩と側方舌側孔の解剖学的位置関係 内田雄基、檀上 敦、重松正仁、山下佳雄、後藤昌昭 日口腔インプラント誌 27 巻特別号 p.145 査読無
- 1 3 . 口蓋粘膜に発症した節外性 NK/T 細胞リンパ腫の 1 例 吉武憲子、山下佳雄、井上将成、下平大治、檀上 敦、後藤昌昭 日口科誌 63(3) p.296 査読無
- 1 4 . 父子に対して行った外科的矯正治療 山下雄平、山下佳雄、檀上 敦、野口信宏、下平大治、井上将成、後藤昌昭 日顎変形誌 24(2) p.172 査読無
- 1 5 . 両側唇顎口蓋裂を伴った染色体 22q11.2 欠失 (CATCH 症候群) 症例に対して当科が行った一貫治療 蘭満紀子、檀上 敦、山下佳雄、近藤成智、後藤昌昭 日口蓋誌 39(2) p.178 査読無
- 1 6 . オルガミンによる直接穿刺硬化療法後に局所の著明な腫脹を来した上唇部血管腫の 2 例 野口智幸、檀上 敦、西原正志、江頭秀哲、入江裕之、山下佳雄、後藤昌昭 Jpn J Radiol 32suppl p.80 査読無
- 1 7 . 抜歯後疼痛に対する傾向消炎鎮痛薬による鎮痛効果の検討 Celecoxib と Loxoprofen の臨床効果と比較 佐野直人、山下佳雄、下平大治、檀上 敦、野口信宏、後藤昌昭 日口科誌 63(1) p.61 査読無
- 1 8 . 眼窩上皮テーパーの経時的劣化 山口能正、檀上 敦、重松正仁、山下佳雄、後藤昌昭 顎顔面補綴 36(2) p.106-107 査読無
- 1 9 . 両側性に認められた二分下顎管 重松正仁、檀上 敦、野口信宏、山下佳雄、後藤昌昭 日口腔インプラント誌 26(3) p.532-563 査読無
- 2 0 . 口腔内乾燥を訴える患者に認められた口唇粘膜上皮のバリア機構の破綻 宇都宮怜子、合島怜央奈、吉住潤子、木附智子、檀上 敦、山下佳雄、城戸瑞穂 J Oral Biosci Suppl. 2013 巻 p.139 査読無
- 2 1 . CT と解剖により計測した舌下腺窩の深さと 1 の比較 内田雄基、檀上

敦、野口信宏、山下佳雄、後藤昌昭 日口腔インプラント誌 26 巻特別号 p.267 査読無

2 2 . 超音波骨切削器具を用いて切削した骨の組織学的評価 檀上 敦、山下佳雄、合島怜央奈、香月 武、後藤昌昭 日口腔インプラント誌 26 巻特別号 p.245 査読無

2 3 . 交通外傷後のインプラント補綴 山口能正、野口信宏、檀上 敦、山下佳雄、後藤昌昭 日口腔インプラント誌 26 巻特別号 p.221 査読無

2 4 . 外傷による上顎前歯部欠損に対して便宜抜去歯を移植した 1 例 檀上 敦、山下佳雄、野口信宏、下平大治、後藤昌昭 日口外傷誌 12 巻 1 号 p.73 査読無

2 5 . 顔面非対称に対する下顎枝矢状分割術後の機能回復の経時的変化(第 2 報) 山下佳雄、檀上 敦、下平大治、野口信宏、近藤成智、隅 康二、後藤昌昭 日顎変形誌 23 巻 2 号 p.113 査読無

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
0 件

6 . 研究組織
(1)研究代表者
檀上 敦 (DANJO, Atsushi)
佐賀大学・医学部・講師
研究者番号：80452712

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

なし