

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463021

研究課題名(和文) 羊膜上培養歯髄由来細胞シートを用いた新規骨再生医療に関する研究

研究課題名(英文) Study of bone regeneration using osteoblast differentiation-inducing dental pulp-derived cell sheet

研究代表者

山本 俊郎 (Yamamoto, Toshiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40347472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨分化誘導した羊膜を基質とした培養歯髄由来細胞シート(以下、羊膜上培養歯髄由来細胞シート)を作成、組織学的・免疫学的に歯根膜に類似していた。この同培養シートを免疫不全マウス腰背部皮下に移植すると、軟X線所見にて不透過像を認め、アリザリンレッドS染色、von Kossa染色で高い染色性とオステオカルシン陽性を示し、異所性の骨形成を認めた。さらに、歯槽骨欠損ラットモデルの骨欠損部位に同培養シートを移植すると、移植した部位では移植をしない部位と比べ顕著な骨再生を認めた。以上から、骨分化誘導した羊膜上培養歯髄由来細胞シートは、歯周組織の再生治療へ応用しうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： In the present study, we developed an osteoblast differentiation-inducing dental pulp-derived cell sheet on a human amniotic membrane by culturing the cell-membrane complex in a medium supplemented with osteoblast-inducer reagent. Implantation of the osteoblast differentiation-inducing dental pulp-derived cell sheet on the dorsal skin of nude mice led to the formation of calcified tissue. Similarly, implantation of the osteoblast differentiation-inducing sheet on periodontal bone defects in rats led to a significant increase in bone formation compared with the control sheet of cells cultured in a control medium. These findings suggest that the osteoblast differentiation-inducing dental pulp-derived cell sheet on a human amniotic membrane may be useful for the regeneration of periodontal tissue.

研究分野：再生医療

キーワード：培養シート 歯髄由来細胞 羊膜 骨分化誘導

1. 研究開始当初の背景

- (1)近年、骨髄間葉系幹細胞を用いた歯周組織の再生が試みられている。発生学的に歯根膜と同じ間葉系組織で分化能と表面抗原が類似する歯髄由来細胞は(文献) 歯の内部に位置するため放射線などの有害刺激が少なく、酸素濃度が低いために遺伝子への影響が少なく、従来、抜歯後に医療廃棄物として処理されていた乳歯、智歯などの永久歯から比較的簡便に入手が可能であるとともに、歯根膜と比べて細胞増殖能が高く(文献)、細菌感染の機会が少ないためにシート作成の再現性が高い。さらに歯髄は、歯根膜と比べ間葉系幹細胞が多く存在し(文献)、骨髄や脂肪と比べ間葉系幹細胞を低侵襲で簡便に入手でき、歯髄バンクも既に存在することから安定した細胞の供給も可能である。
- (2)羊膜は胎盤の最表層を覆う薄膜で、免疫学的に胎児を母体から隔離する特異な機序が存在する。分娩後に胎盤からほぼ無菌的に採取され、胎盤は分娩後に通常廃棄される組織であるために、倫理的、技術的に入手が容易である。発生学的にはES細胞から3~4段階分化した段階であると考えられ、羊膜組織中に多機能幹細胞が含まれている可能性がある。そして、免疫原性をもち、各種細胞の培養基底膜としても適しており、加えて、抗炎症作用・感染抑制作用などを有し、他の組織にはない特徴を備えている。生物学的材料としては皮膚移植、膣形成術、腹部手術の際の癒着・瘢痕防止、皮膚熱傷後など創部の被覆による治癒促進、さらに眼表面の再建などの手術療法に用いられ(文献)、細胞培養基質としてだけでなく、移植材料としても高い有用性と有効性が注目されている。
- (3)これまでに我々は、羊膜を基質とした培養口腔粘膜上皮細胞シートの作成方法(文献)を確立、各種口腔粘膜上皮欠損患者に対し臨床応用を行い、拒絶反応等の異常なく良好な結果を得、羊膜が細胞培養の基質として適し、

また新たな再生医療的治療法として極めて有用かつ有効であることを報告した(文献)。次に、この細胞培養系を歯根膜由来細胞に応用、培養歯根膜シートの作成に成功、*in vivo*で自家移植を行う技術を開発した(文献 ,)。さらに、この培養歯根膜シート作成技術を応用し、培養歯髄由来細胞シートの作成に成功、同培養シートが培養歯根膜シートと類似した組織構造であり、細胞染色で骨分化能を有することを突き止めている(文献)。

2. 研究の目的

- (1)歯髄幹細胞が骨分化能を有することから、羊膜上培養歯髄由来細胞シートを骨分化誘導培養で作成することで、骨再生を目的とした新規培養シートの作成と最適化する。
- (2)羊膜独自の有用性を併せ持つ新たな培養シートとしての特性を検討する。

3. 研究の方法

(1)羊膜の採取および保存方法

羊膜は、帝王切開予定の妊婦から採取する予定であったが、安定した供給が得られなかったため、特定非営利活動法人・再生医療支援機構・近畿羊膜バンク(京都)からの研究用羊膜の供給とした。

(2)歯髄組織の採取と培養および羊膜上での歯髄由来細胞の培養

抜歯術施行後の抜去歯をセメントエナメル境で横断、歯髄組織のみを無菌的に採取した。歯髄組織をコラゲナーゼ処理後、細分し、感染症フリーの10%ウシ胎仔血清(FBS)と抗菌薬を添加した α -MEMを用い初代培養(文献)。その後3~4継代培養、骨分化誘導培地(ペニシリン・ストレプトマイシン, グリセロン酸, アスコルビン酸, デキサメサゾン含有10%FBS DMEM)を用いて羊膜上にこれら歯髄由来細胞を播種・培養した。

(3)羊膜上培養歯髓由来細胞シートの組織学的・免疫組織学的検討

作成された同培養シートが、どの程度正常歯根膜に近いかを以下の項目にて検討を行った。

- ・組織学的検討...正常歯根膜は、紡錘形で線維芽細胞様を呈した形態的な特徴を持った細胞が層をなしている。そこで、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い細胞形態が形成されているかを組織学的に検討した。
- ・免疫組織化学的検討...歯根膜は間葉系幹細胞を含み、細胞間にはデスモゾームやタイト結合の細胞接着装置が存在する。そこで、細胞増殖と同様の接着構造が形成されているか検討した。すなわち、蛍光抗体染色法を用いて間葉系細胞マーカー（ビメンチン）細胞増殖マーカー（Ki-67）間葉系幹細胞マーカー（CD44, CD105, CD146 など）デスモゾーム構成タンパク（デスモブラキン）およびタイト結合構成タンパク（ZO-1）の局在について蛍光抗体染色法で検討した。また、基底膜構成成分の局在についても基底膜構成細胞接着タンパク（ラミニン 5/10）基底膜構成コラーゲン（type I collagen）について検討した（文献）。

(4)羊膜上培養歯髓由来細胞シートの骨分化能の検討

作成した同培養シートから歯髓由来細胞を採取、mRNAを抽出後、real-time PCR法を用いて骨分化マーカー（ALP, オスオポンチン, オステオカルシン, 骨シアロタンパク質）や転写因子（Runx2, オステリックス）について検討した。さらに、ALP染色、アリザリンレッド S 染色、von Kossa 染色などの細胞染色で骨分化能について検討した。

(5)骨分化誘導させた羊膜上培養歯髓由来細胞シートの移植

7週齢雄 BALB/c ヌードマウスの腰背部皮膚を切開剥離、コントロール培地または骨分化誘導培地を用いて約4週間培養して

作成した同培養シートを静置、縫合した。移植4週間後、ペントバルビタール麻酔下で軟X線装置を用い、画像評価を行うとともに、ペントバルビタール麻酔薬の過剰投与により安楽死させたマウスより移植片を採取、免疫組織学的検討を加えた。さらに、6週齢雄 SD ラットの顎第2臼歯歯頸部にワイヤーを4週間結紮し、歯槽骨欠損モデルを作成した。その後、歯槽骨欠損部位に骨分化誘導した同培養シートを移植した群を実験群、4週間静置した群を対象群とし、マイクロCTで画像評価を加えた。なお本研究は、本学動物実験委員会で許可を受けている。

4. 研究成果

(1)羊膜上培養歯髓由来細胞シートの組織学的・免疫組織学的検討ならびに骨分化能の検討

骨分化誘導した羊膜上歯髓由来細胞は、ヘマトキシリン・エオジン染色において羊膜上で単層構造を示した。そして、間葉系細胞マーカーであるビメンチン、細胞増殖マーカーであるKi-67陽性を認めるとともに、細胞間には細胞間接着マーカーであるZO-1の発現を認め、歯根膜と類似していた。さらに、間葉系幹細胞マーカーであるCD44、CD105、CD146の局在も認めた。骨分化誘導した同培養シートは、アリザリンレッド S 染色で高い染色性を示すとともに、免疫組織化学でオステオカルシンの発現を認め、骨分化誘導がなされていた。なお real-time PCR 法での検討では、RNA抽出が不十分であったために結果が得られなかった。

(2)骨分化誘導させた羊膜上培養歯髓由来細胞シートの移植

ヌードマウス腰背部皮下に移植した骨分化誘導した同培養シートは、軟X線所見にて不透過像を認め、アリザリンレッド S 染色、von Kossa 染色において高い染色性を示すと

ともに、免疫染色でオステオカルシン陽性であったことから、移植後も石灰化した組織が維持されていることが考えられた(図1)。マウス歯槽骨欠損部分に骨分化誘導した同培養シートを移植した実験群は、対照群と比べて有意に骨の増生がみられた($p < 0.05$)(図2)。

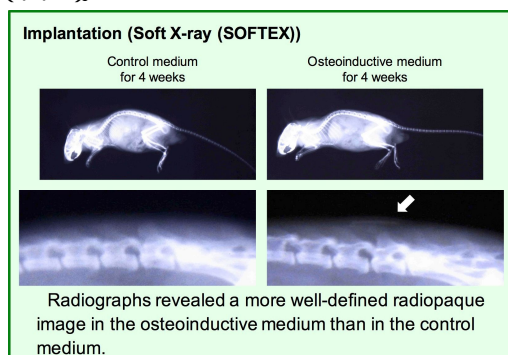


図1 ノードマウスへの移植

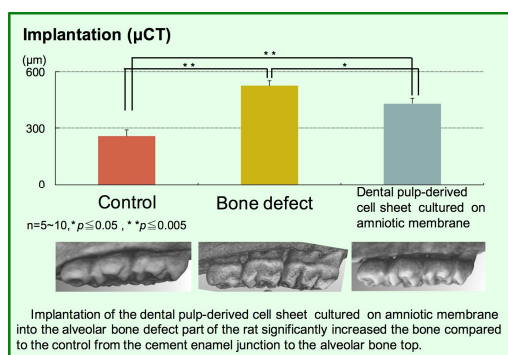


図2 骨欠損部分への移植

<引用文献>

Huang GT-J *et al.* Mesenchymal stem cells derived from dental tissue vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*, 88, 2009, 792-780.

Tamaoki N *et al.* Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res*, 89, 2010, 773-778.

村田智子。Stage-specific embryonic antigen-4 を用いた歯の幹細胞の同定。岡山歯会誌、29、2010、1-13。

Nakamura T *et al.* Transplantation of

cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*, 88, 2004, 1280-1284.

Amemiya T *et al.* Human oral epithelial and periodontal ligament cells sheets cultured on human amniotic membrane for oral reconstruction. *J Oral Tissue Engin*, 1, 2004, 89-96.

Yamamoto T *et al.* Usefulness for a cultured human oral epithelial cell sheet on human amniotic membrane following removal of minor salivary gland tumor surgery. *J Oral Tissue Engin*, 5, 2007, 54-58.

Amemiya T *et al.* Experiences of preclinical use of periodontal ligament-derived cell sheet cultured on human amniotic membrane. *J Oral Tissue Engin*, 6, 2008, 106-112.

Adachi K, Amemiya T *et al.* Human periodontal ligament cell sheets cultured on amniotic membrane substrate. *Oral Dis*, 2013, 582-590.

Honjo K *et al.* Evaluation of a dental pulp-derived cell sheet cultured on amniotic membrane substrate. *BioMed Mater Eng*, 25, 2015, 203-212.

Morito A *et al.* Effects of basic fibroblast growth factor on the development of the stem cell properties of human dental pulp cells. *Arch Histol Cytol*, 72, 2009, 51-64.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- (1)羊膜の基質上で培養したヒト骨膜由来細胞シートの開発。雨宮 傑、遠藤悠美、浅井 拓、足立哲也、足立圭司、西垣 勝、大迫文重、山本俊郎、金村成智。日歯保存

誌 59、2016、394-401。

DOI:http://doi.org/10.11471/shikahozon
.59.394

(2)Ken-ichi Honjo, Toshiro Yamamoto,
Tetsuya Adachi, Takeshi Amemiya,
Masakazu Kita, Narisato Kanamura, Osam
Mazda. Evaluation of a dental
pulp-derived cell sheet cultured on
amniotic membrane substrate. *BioMed
Mater Eng*, 査読有, 25, 2015, 203-212.
DOI: 10.3233/BME-151270.

(3)Takeshi Amemiya, Takahiro Nakamura,
Toshiro Yamamoto, Shigeru Kinoshita,
Narisato Kanamura. Autologous
transplantation of oral mucosal
epithelial cell sheets cultured on an
amniotic membrane substrate for intraoral
mucosal defects. *PLoS ONE* 10, 2015,
e0125391.
DOI: 10.1371/journal.pone.0125391.

[学会発表](計12件)

Toshiro Yamamoto, Ken-Ichi Honjo,
Takeshi Amemiya, Taku Asai, Masakazu Kita,
Narisato Kanamura. Bone differentiation
induction of dental pulp-derived cell
sheet cultured on human amniotic membrane
and its application to alveolar bone
regeneration. 39TH Asia Pacific Dental
Congress. 2017年5月22~25日. The
Venetian Macao (Macao).

堀口智史、山本俊郎、佐藤良樹、本城賢一、
足立圭司、植西俊裕、西垣 勝、大迫文重、
雨宮 傑、中村 亨、金村成智。ヒト羊膜上
培養歯髄由来細胞シートの骨分化誘導と歯
槽骨再生への応用。第145回日本歯科保存学
会2016年度秋季大会。2016年11月27~28
日。キッセイ文化ホール(長野県松本市)。
Toshiro Yamamoto, Ken-ichi Honjo, Masaru
Nishigaki, Takeshi Amemiya, Masakazu

Kita, Narisato Kanamura. Examination of
implanted dental pulp-derived cell sheet
cultured on human amniotic membrane in
nude mice. The 94th General Session and
Exhibition of the International
Association for Dental Research. 2016年
6月22~25日. COEX convention center &
exhibition center (Seoul, Korea).

本城賢一、山本俊郎、山本健太、滝沢茂太、
木村 功、雨宮 傑、中井道明、金村成智。
羊膜を基質とした培養歯髄由来細胞シート
の Maus 腰背部皮下での免疫組織学的検討。
第60回日本口腔外科学会総会・学術大会。
2015年10月16~18日。名古屋国際会議場
(愛知県名古屋市)。

本城賢一、山本俊郎、雨宮 傑、金村成智、
喜多正和。ヌードマウス腰背部へ移植した羊
膜培養歯髄由来細胞シートの免疫組織化学
的検討。第62回日本実験動物学会総会。2015
年5月28~30日。京都テルサ(京都府京都
市)。

山本俊郎、本城賢一、雨宮 傑、松下雄亮、
中村 亨、金村成智。 *in vivo* における羊膜
上培養歯髄由来細胞シートの免疫組織化学
的検討。第58回春季日本歯周病学会学術大
会。2015年5月15~16日。幕張メッセ(千
葉県千葉市)。

Toshiro Yamamoto, Takeshi Amemiya,
Narisato Kanamura. Examination of
implanted pulp cells cultured on human
amniotic membrane sheet in mice. 37TH Asia
Pacific Dental Congress. 2015年4月3~5
日. Suntec Singapore (Singapore,
Singapore).

本城賢一、山本俊郎、足立圭司、大迫文重、
雨宮 傑、坂下敦宏、喜多正和、金村成智。
マウス腰背部皮下に移植した羊膜上培養歯
髄由来細胞シートの免疫組織学的検討。第
141回日本歯科保存学会2014年度秋季大会。
2014年10月30~31日。山形テルサ(山形

県山形市)。

Ken-ichi Honjo, Toshiro Yamamoto,
Fumishige Oseko, Takeshi Amemiya,
Masakazu Kita, Osam Mazda, Narisato
Kanamura. Examination of bone
differentiation for human dental
pulp-derived cells cultured on amniotic
membrane. 96TH AAOMS Meeting, Scientific
Sessions and Exhibition. 2014年9月8～
13日. Hawaii convention center, Hilton
Hawaiian village (Honolulu, Hawaii) .

本城賢一、山本俊郎、西野悠貴、木村 功、
雨宮 傑、中井道明、金村成智。歯周組織再
生を目指して作成した羊膜上培養歯髓由来
細胞シートの骨分化に関する検討。第45回
日本口腔外科学会近畿支部会学術集会。2014
年6月21日。奈良県橿原文化会館(奈良県
奈良市)。

本城賢一、山本俊郎、市岡宏顕、足立圭司、
大迫文重、雨宮 傑、喜多正和、金村成智。
骨分化を目指した羊膜上培養歯髓由来細胞
シートの作成。第14回日本抗加齢医学会総
会。2014年6月5～8日。大阪国際会議場(大
阪府大阪市)。

本城賢一、山本俊郎、足立圭司、雨宮 傑、
金村成智。骨分化誘導した羊膜上培養歯髓由
来細胞シートの免疫組織化学的検討。第57
回春季日本歯周病学会学術大会。2014年5
月23～24日。長良川国際会議場(岐阜県岐
阜市)。

〔その他〕

第60回日本口腔外科学会 優秀ポスター発
表賞(ゴールドリボン賞)受賞。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 俊郎 (YAMAMOTO Toshiro)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研
究院)・講師

研究者番号：40347472

(2) 研究分担者

雨宮 傑 (AMEMIYA Takeshi)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研
究院)・助教
研究者番号：90398389

喜多 正和 (KITA Masakazu)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研
究院)・准教授
研究者番号：60153087

金村 成智 (KANAMURA Narisato)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研
究院)・准教授
研究者番号：70204542