

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861564

研究課題名(和文) 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた次世代歯科治療技術の開発

研究課題名(英文) Development of a new dentin regenerative therapy using adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

研究代表者

水野 光政 (Mizuno, Mitsumasa)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：20609812

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)：本研究ではラットの皮下脂肪組織から磁気ビーズを用いて採取した間葉幹細胞を用いて、小規模施設でも実施可能な歯の再生医療の開発を行った。精製した細胞は骨分化能を有し、3次元造形チタンメッシュを用いた大幅骨欠損の再生治療の実現可能性も示唆した。また、pColdベクターを利用しリコンビナントBMP2を大量に取得できる系を構築し以後の実験に使用した。ラットの歯質の欠損部位を作製しrADSCを移植すると30日後に硬組織形成が確認できた。当該部位は生理的応を示し機能回復の兆候を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：We developed the regenerative therapy of a dentition using the rat adipose-derived stem cells (rADSC) which they gathered using magnetic beads from a rat subcutaneous fat tissue in even small facilities in this study. The rADSC had bone differentiation ability, and suggested the possibility of the reproduction treatment of the large bone defect using the three-dimensional molding titanium mesh. In addition, we built the system that could acquire recombinant BMP2 using pCold vector in large quantities and used it for an experiment of afterward. The rADSC had transplanted to the loss part of the rat molar, it was able to confirm the hard tissue reformation 30 days later. The part showed a physiological reaction and was able to confirm a sign of the function recovery.

研究分野：歯科生化学

キーワード：再生歯科 脂肪由来間葉幹細胞 リコンビナントBMP2 骨再生

1. 研究開始当初の背景

再生医療の成功には特定の機能細胞への分化誘導系、医工学的な細胞増殖、分化の足場や成長因子などの徐放技術の開発などが必要であるが、鍵となる必要技術の一つとして幹細胞の応用が挙げられる。幹細胞とは自己増殖能と多分化能を兼ね備えた細胞であり、これまでに万能細胞としてES細胞やiPS細胞が樹立されてきたが、ES細胞は胎性の組織が必要となり、iPS細胞は初期化因子や生体移植時の腫瘍化・拒絶反応など、臨床応用を考えるにあたりクリアすべきハードルが存在している。近年、脂肪組織中に間葉系幹細胞に類似した多能性幹細胞を発見され、脂肪組織は形成外科手術の際の余剰組織として採取することは容易であり、局所麻酔下でも採取可能である。申請者はこれまでに、歯の再生医療の概念は実現可能である事を報告したが、歯の再生医療の臨床応用を実現するためには細胞シーズの探求や分化メカニズムの解明、生体外培養系の樹立など、越えなければならない課題が残されていた。

本研究では、歯の再生の早期実現の可能性を示すため、細胞シーズとして脂肪由来の間葉系幹細胞を用い、歯質再生治療系の構築を行い、サイトカインを用いた象牙質再生治療系の効率向上の検討および評価も行う。

2. 研究の目的

本研究課題では、次世代歯科治療としての歯の再生医療の実用化を目指し、その治療システム確立に向けた基盤技術の開発を進める。体性幹細胞は、免疫拒絶がないうえに倫理的問題の少ない自己由来の細胞である。体性幹細胞のうち骨髄由来間葉系幹細胞は、骨・軟骨・腱・筋肉・脂肪・歯周組織など、多くの組織に分化することが示されており、この幹細胞を用いた骨再生医療、軟骨再生医療、血管再生医療はすでに臨床研究が実地されている。しかしながら、骨髄由来間葉系幹細胞は、体外培養を施さない限り一度に大量の骨髄採取を必要とし、そのためには採取に当たり全身麻酔を要する上、採取後の疼痛が避けられず、ドナーの負担が大きい。近年、採取後の疼痛も非常に少なく、ドナーサイトの変形・欠損も非常に軽微である脂肪組織からも幹細胞が取得できることが報告されている。この脂肪由来間葉系幹細胞を用いて歯の硬組織を再生させることにより、早期臨床応用の基盤とすることを目的とし、

1) 歯の再生治療に利用可能な幹細胞の探索、2) 間葉系幹細胞の象牙芽細胞分化因子の作製、3) 幹細胞を口腔内に移植し歯質を再生する技術開発、4) 再生した歯質の評価の項目について研究を推進する。本研究では大規模施設でなくても実現可能な再生医療を目指すため、可能な限り大掛かりな装置を使わず大きなコストのかからない方法を提案する。

3. 研究の方法

(1) 歯の再生治療に利用可能な幹細胞の探索：本実験では、幹細胞の取得源として脂肪組織を選択した。組織はF344N/SLCラットオス5-7週齢の鼠径部皮下より採得し、裁断したのち酵素処理をして細胞を単離した後磁気ビーズを用いてソーティングした。なお、すべての実験操作は「愛知学院大学歯学部動物実験実施規定」(承認番号AGUD 236号)に基づいて実施した。取得した細胞についてはフローサイトメトリーでCD抗原の陽性率を検査し、骨・軟骨・脂肪分化能を検証した。

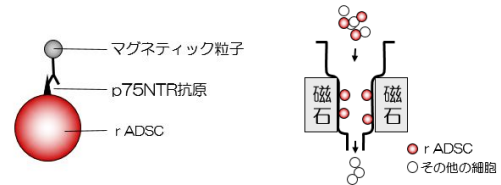


図1 rADSC精製の模式図

(2) 間葉系幹細胞の象牙芽細胞分化因子の作製：取得した幹細胞を硬組織形成細胞へ分化誘導するための因子としてBMP2が必要であったが、大量に入手するのは困難であるため、本実験ではpColdベクターを用いて遺伝子組み換えを行った大腸菌を用いて大量に精製した。精製したBMP2は既存の細胞株、およびrADSCを用いて骨分化誘導能の検証を行った。

(3) 幹細胞を口腔内に移植し歯質を再生する技術開発：F344N/SLCラットから採取した脂肪由来間葉系幹細胞を硬組織形成誘導した細胞をF344N/SLCラットオス5-7週齢の第一臼歯に移植した。移植窩は歯科用ラウンドバーで形成し、コラーゲンゲル中に包埋した細胞を挿入し、歯科用ガラスアイオノマーセメントで封入した。移植部の保護のためレジンを築盛を行った。移植後動物は通法にて飼育維持を行った。

(4) 再生した歯質の評価：移植動物は2-3日毎にカルセインの投与を行い、新生硬組織をラベリングした。移植後30日でサンプルを摘出し、マイクロCT、および非脱灰標本作製し蛍光顕微鏡を用いて移植部位の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 歯の再生治療に利用可能な幹細胞探索 安楽死させたラットの鼠径部からは1匹あたり左右側合わせて1.9g(n=20)であった。これを単離し細胞以外の成分を除去すると 4.8×10^6 (n=20)の細胞群を得ることができた。この細胞群のうち、P75NTR抗体で標識した細胞を磁気を用いてソーティングした結果、 4.4×10^5 のP75NTR陽性細胞を取得することができた(n=20)。FACS解析の結果、ソートされた細胞はCD29・CD90陽性、CD34・CD45陰

性であり、従来の研究で報告されている幹細胞の特徴と合致しており、以後この方法で作成した細胞群を脂肪由来間葉幹細胞(以下、rADSC)として取り扱った。

rADSC の分化能を検証するため、脂肪分化誘導・軟骨分化誘導・骨分化誘導を行いそれぞれ誘導能の試験を行った。

脂肪分化誘導実験は、rADSC をイソブチルメチルキサンチン・インスリン・デキサメタゾン添加した MEM 培地で 14 日間培養し、FABP4 の免疫染色と Oil Red 染色を用いて行った結果、いずれも陽性であった。

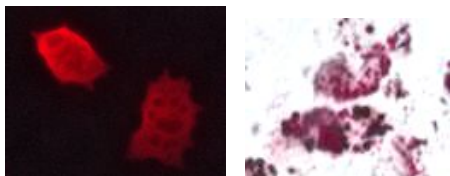


図2 FABP4 の免疫染色像(左)とアリザリンレッド染色像(右)

軟骨分化誘導実験は、rADSC を TGF- β 3 とアスコルベート-2-ホスフェートを添加した DMEM/F-12 培地で 21 日間培養し、アグリカンの免疫染色を行った結果陽性であった。

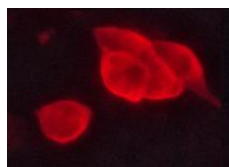


図3 アグリカンの免疫染色像

骨分化誘導実験は、rADSC をハイドロコルチゾン、グリセロフォスフェート、アスコルビン酸および rhBMP2 の添加を行った DMEM 培地を用いて 20 日間培養し、アリザリンレッド染色を行ったところ陽性であった。

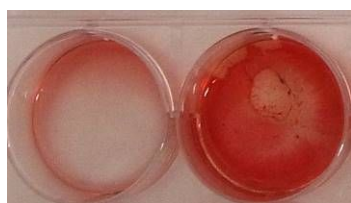


図4 骨分化誘導を行った rADSC (右) と行わなかった rADSC (左) のアリザリンレッド染色像

また、 5×10^6 個の細胞から 2.48×10^6 unit/ml の活性が検出された。

rADSC の骨分化能の安定性を確認するため、ADSC 増殖培地にて 10 代にわたって継代実験を行った。その結果、初代と 2 代目の細胞より 3 代目 ~ 10 代目 rADSC の方が高効率で骨分化能を有することが判明した。以後の実験では、3 代目以降 8 代目までの rADSC を使用した。

以上のことから、ラットの脂肪組織から未

分化な状態を維持して増殖可能で、脂肪・軟骨・骨分化能を持つ体性幹細胞である rADSC が精製できたこと実証された。今回用いた方法は従来より用いられているクリーンベンチと CO₂ インキュベータを有している施設であれば実施可能であり、小規模施設での再生医療の実現可能性を示唆している。

さらに、骨系性能を実証するため、チタンメッシュのスカフォールドを用いて rADSC を移植する実験を行った。担体のチタンメッシュは 3 次元射出造形機にて作成し、高密度に rADSC を播種したコラーゲンゲルをチタンメッシュに浸み込ませて 37 °C で 20 分間 CO₂ インキュベータに静置してゲルを硬化させた。ゲルと一体となったチタンメッシュを麻酔下のラットの鼠径部皮下に移植して通常通り飼育した。移植後 21 日で摘出したところ、チタンメッシュに埋もれるようにして形成された骨様の組織がみられた。この組織を薄切して HE 染色を行ったところ、皮質骨と海綿骨様の組織がチタンメッシュの内部にみとめられた。

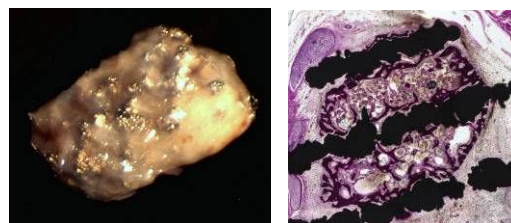


図5 骨が形成したスカフォールドの実体顕微鏡写真(左)と HE 染色像(右)

このチタンメッシュは立体的に設計・造形することのできるもので、CT 画像等からソフトウェア上で設計すれば大きな骨欠損に対して欠損部位と同じ形のチタンメッシュを作製することができる。上記のように骨分化誘導した幹細胞とともに移植すれば大掛かりな骨欠損を補綴することが可能となる。

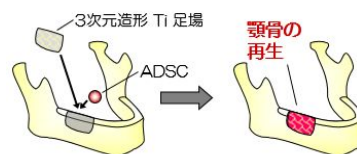


図6 3次元造形チタンメッシュを用いた骨再生の模式図

この知見はさらなる検証を行った後別途発表する予定である。

(2) 間葉系幹細胞の象牙芽細胞分化効率の向上

取得した rADSC を骨分化誘導するためには大量の分化因子を培地に添加することが必要である。無機成分については、一般的に大量に購入することができるが、BMP などのサイトカインについては入手が困難である。本研究では BMP2 を大量に精製する方法を探索

しそれを用いて骨分化誘導培地の添加剤として用いることにした。

ベクターサイドの EcoR と Xba の部位に hBMP2(BG148689.1)の Q283-R396 配列をインサートした pColdTMベクターを構築し、コンピテントセル DH5 をエレクトロポレーション法で形質転換して hBMP2 産生大腸菌株を作製した。pColdTMベクターは、大腸菌コールドショック遺伝子 cspA のプロモーター配列と 5' 非翻訳領域を利用して低温で BMP2 を発現誘導することにより、宿主大腸菌由来タンパク質の合成が抑制され可溶性画分から目的タンパク質を高効率で得ることができるとを特徴とする。

作成した大腸菌を LB 培地中で濁度 OD630 が 0.5 になるまで培養し、15 で 30 分間静置し、IPTG を添加して 15 で 20 時間振盪培養することで hBMP2 を産生させた。この大腸菌を氷冷下で破碎したものを遠心分離し、電気泳動をおこなった結果、その上清画分には多量の hBMP2 と同じ分子量のバンドが含まれることが判明した。濃度 200-300mM のイミダゾール添加 Tris-HCl バッファーに高い純度で溶出することが判明した。

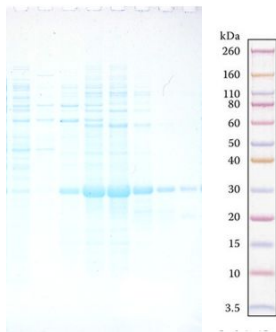


図7 イミダゾールを用いて BMP2 を溶出させたときの泳動ゲル写真。のレーンから順に、50, 150, 200, 250, 300, 350, 500mM のイミダゾールを添加した。

⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ ⑮ ⑯ ⑰ ⑱

この 60kDa 付近に出現した hBMP2 のダイマーと思われるバンドをアトプレップ®を用いて切り出して単離したものを rADSC の骨分化誘導培地に添加したところ、対照群と比較し ALP 活性が 100 倍以上増加した群が存在したが、再現性がとれないため追加実験にて検証の必要がある。

また、30kDa 付近に出現した hBMP2 のモノマーと思われるバンドを切り出して骨分化誘導培地に添加したところ、対照群と比較して ALP 活性が優位に低下した。これにより、本法にて精製した hBMP2 モノマーが rADSC を未分化な状態にて維持する培地に利用できる因子として活用できることが示唆された。

従来から入手可能な hBMP2 は、10ng オーダーであるが、本法にて精製し取得できるのはおよそ 10⁴ 倍の 100 μg オーダーであり、大量に作製できるのが利点である。

このリコンビナント BMP2 作製実験の結果については、別途学会等に発表し本研究の論文発表にも内容を掲載する。

(3) 幹細胞を口腔内に移植し歯質を再生する技術開発

移植する rADSC は増殖培地にて培養し、コンフルエントになった段階で骨分化誘導をし、14 日後に培養皿から剥がしコラーゲンゲル中に播種した。コラーゲンゲルはセルカルチャインサートに乗せて CO₂ インキュベータ内で 1 日間 3 次元培養を行った。この作業でサンプルは移植に適した形状となった。

吸入麻酔下にてラットを実験台に固定し、臼歯部に大きな齲蝕を処置した後に形成される様の高洞を形成した。そこに、rADSC を包埋したコラーゲンゲルを移植し歯科用ガラスアイオノマーセメントを用いて仮封し、その上に歯科用フローレジンにて固定した。

この移植術が研究開始前に想定したよりも遥かに困難であり本研究の進捗を大幅に遅らせる原因となった。第一に、ヒトの臼歯歯髄は髓質という円柱状の部屋がありその天井に相当するところまでを切削することを想定していたが、ラットの臼歯歯髄の髓質は大きく波を打つように湾曲し、存在する一番小さな歯科用回転切削器具を用いても容易に髓床底を貫通してしまうような形態であった。第二に、封入剤をラットが咀嚼や爪などで剥がしてしまうことがしばしば起こり、維持が困難であった。対合歯の抜歯および爪を切るなどの方法で対処することにより維持率は大幅に向上した。

このような歯内療法の実験ではヒトとは大きく構造の違う歯を持つラットは不適合であり、ウサギや犬などの動物種を選択すべきであったことが本研究の反省点である。

(4) 再生した歯質の評価

移植後、新生した骨を観察するため、2-3 日毎にカルセインを投与しラベリングした。移植 30 日後にマイクロ CT を撮影したところ、移植部位の周辺に石灰化した組織が観察された。

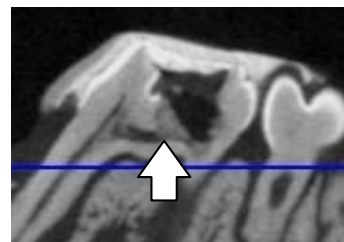


図8 移植 30 日後の歯の CT 像。矢印の部分に石灰化が認められた。

移植部位を摘出し、非脱灰標本を薄切し蛍光顕微鏡で観察したところ、既存の歯質よりも強い蛍光を有する部位がありこの部位が投与したカルセインを含有する移植後に再生した硬組織であることが示唆された。

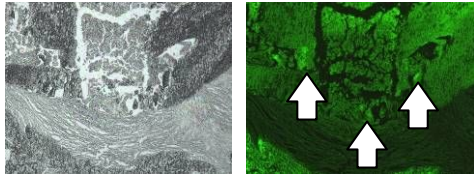


図9 移植30日後の歯の非脱灰標本の明視野像(左)と蛍光像(右)矢印の部分に新生した硬組織が見られた。

吸入麻酔下の移植動物の移植歯に歯科用パルパーを用いて凍らせたスポンジを当てて冷刺激を加えたところ、全例で逃避行為が見られた。このことより、移植部位の歯髄は生存しており再生した硬組織部にも神経終末が入っていることが示唆された。

再生した硬組織が象牙質であることを証明するため、脱灰標本にてDPPおよびDSPの免疫染色を行ったが、現在のところいずれのサンプルも陰性を示している。このことは再生した硬組織が象牙質ではなく、骨様の硬組織であることを示唆しているが、移植手技や期間を再度見直して陽性になるサンプルがないかを現在慎重に観察している。

今後全てのサンプルでこれらのマーカーが陽性とならない場合象牙質の再生ということはできないが、硬組織の再生は確認されているため歯冠の硬組織の回復という意味では目的は達成されたと考える。

総じて、本研究では胎性細胞や遺伝子組み換えを行わずにラットの皮下脂肪組織から磁気ビーズを用いて採取した間葉幹細胞を用いて、小規模施設でも実施可能な歯の再生医療について探求した。作製した細胞は脂肪・軟骨・骨に分化することが可能であり、3次元造形チタンメッシュを用いた大幅骨欠損の再生治療の可能性を示唆した。pColdベクターを用いて改変を行った大腸菌株を用いて大量にリコンビナントBMP2を取得することが可能となり、ダイマーは骨分化誘導に、モノマーは分化抑制に利用することができるサイトカインであった。ラットの歯質の欠損部位を作製し、当該部位に骨分化誘導をおこなったrADSCを移植すると30日後にマイクロCT上で硬組織形成が確認できた。カルセインラベリング実験によって、この硬組織は移植後に再生した骨様組織であることを確認し、象牙質マーカーは未だに確認できていないが、当該部位は生理的反応を示し機能回復の兆候を確認することができた。

一連の研究で得られたデータは国内外で口頭や論文にて発表する予定であるが、リコンビナントBMP2の実験においては精製する方法をブラッシュアップしてデータの再現性を確保するための検討する余地があり、象牙質再生のマーカーについても移植する前の細胞を象牙芽細胞と共培養したり象牙芽細胞を培養した上清を用いるなど手技や条件を改良することにより移植して硬組織化

した部位からDSPやDPPの陽性反応を得られる可能性を有する。発表までにはさらなる実験を重ねる必要があると考えている。

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0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権](計0件)

[その他](計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 光政 (Mitsumasa Mizuno)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：20689812