

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008 年～2010 年

課題番号：20390501

研究課題名(和文) 骨髄細胞を用いた新世代の歯の再生法 -オーダーメイド医療に向けて-

研究課題名(英文) Novel methods of regeneration of tooth using bone marrow cells
—aim at order medical treatment—

研究代表者 石川 博 (ISHIKAWA HIROSHI)

日本歯科大学・生命科学部・客員教授

研究者番号：30089784

研究成果の概要(和文)：

野生型 BALB/cA マウスの歯根膜、内エナメル上皮、歯髄ならびに大腿骨由来の細胞株を樹立した。エナメル上皮細胞にヒト乳歯歯髄由来の細胞を作用させると、アメロブラスチンを産生するようになった。この細胞と歯髄の細胞を横に並べて接触させコラーゲンゲル内に入れ細胞塊を作製し、ついで、これをヒトの歯根膜で包み、さらにその上をコラーゲンスポンジで巻いて、我々が開発した灌流培養装置で ETFs を添加培養し、歯の再生に成功した。

またヒトの骨髄を分散培養し、浮遊細胞を吸引除去し、接着性の細胞と細胞塊から out growth する細胞を長期間培養し、その中から幹細胞を分離し細胞株を樹立した。このうち 3/27 株は免疫不全マウスの皮下で 3 胚葉性テラトーマの作出したことから多分化能をもつ細胞であると思われる。この細胞を懸濁培養し胚様体を作り、ETFs にて胚子様構造体を成育させたが、現在まで歯の原基は見つかっていない。

研究成果の概要(英文)：

Several cell lines derived from periodontal membrane, dental pulp, inner enamel epithelium and bone marrow of BALB/cA mouse were established. When the enamel epithelial cells were cultured in the growth medium supplemented with the products of human dental pulp cells, the enamel epithelial cells produced ameloblastin. The pellets of ameloblastin producing cells and dental pulp cells were inserted into the collagen gel adjoining each other. Then these constructions were enveloped with human periodontal membrane. Lastly, they were enveloped with collagen sponge and cultured GM supplemented with the ETFs by circumfusion apparatus.

We established 27 tissue stem cell lines derived from human bone marrow. Three of them made teratoma when they were transplanted into the subcutis of nude mouse. The stem cells were cultured by hanging drop method with ETFs, the embryoid bodies were developed. The embryoid bodies were brought up with ETFs to the embryo-like structures by circumfusion apparatus. However, there is nothing of the tooth germ structures yet.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯、骨髄、組織幹細胞、灌流培養、歯根膜、エナメル上皮、マイクロ CT
RT-PCR

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、世界的にも注目を集める歯の再生研究は、その研究手法によってティッシュ・エンジニアリングによるアプローチと、発生学的アプローチの2つに大別することができる。まず、前者はアメリカの Dr. Yelick (フォーサイス研究所) のグループがよく知られている。これは細胞と足場材料を組み合わせる組織を再生させる方法で、ラットやブタの歯胚の細胞を生分解性の高分子材料に播種して歯の原基を作製し、それをラットやブタの腹腔内に移植して、組織の形成を解析する手法である (Arch Oral Biol 2005, J Dent Res 2004)。日本では上田実教授 (名古屋大学・東京大学) のグループが有名であるが、その研究手法はアメリカのグループとほぼ同じと考えてよい。一方、後者の発生学的アプローチによる歯の再生は、イギリスの Dr. Sharpe (キングス・カレッジ, J Dent Res 2004)、フランスの Dr. Lesot (レイ・パスツール大学, J Dent Res 2006)、日本の辻孝教授 (東京理科大学, Nat Methods 2007) のグループがある。これらはいずれもマウスの胎仔から発生途上にある歯胚を分離して、種々の上皮と間葉の組み合わせによって歯の原基を作り、これをマウスの腎被膜下に移植して、組織の形成評価をするものである。

このように熾烈な研究競争が繰り広げられている歯の再生研究ではあるが、未だに動物実験レベルにとどまり、幹細胞から培養下で歯の再生に成功したグループは存在せず、ましてやヒトの歯の再生に成功したグループは皆無であり、未だ手つかずの状態といえる。その原因として考えられるのは、ヒトをモデルとした再生研究において、ヒトサイズの大きさと正常形態を有する器官を作製する基盤技術がないことである。前述の動物実験の報告では、歯の完全再生に向けて着実な進歩を遂げてはいるものの、せいぜい 1 ~ 1.5 ミリのマウスの歯の大きさを制御するのみであり、2 ~ 3 センチのヒトの歯を再生させ得る技術ではない。さらに歯を再生するために胎児の歯胚から細胞を得るのでは生命倫理的にもそのハードルは高い。マウスを用いた従来法で、10 倍以上の大きさのヒトの組織を構築するのは、歯に限らずいかなる臓器でも不可能と思われる。そして従来のアプローチである動物に移植して歯の再生を誘導する研究手法は、ホストである異種動物由来の免疫原性やウイルス感染等の危険性があり、さらに異種動物に移植したものを自己

の身体に戻すということに、我々の精神的・生理的抵抗は否めない。研究材料として用いている歯胚の入手に関しても、ヒトの場合は不可能といっても過言ではなく、たとえ両親の許可が得られたとしても中絶胎児の歯胚を利用することは困難である。このような多くの問題を抱える医療に対して、厚生労働省が認可を承認することは考え難いため、特に規制の厳格な日本の医療において、従来の歯の再生研究では、その実現は極めて困難と言わざるを得ない。

(2) 我々は、さきにマウスの ES 細胞をアメリカのジェロン社の特許に全く抵触しないように受精卵の胚盤胞の内細胞塊を用いずマウスの 2 細胞期胚から樹立しこれを early ES (EES) 細胞と命名した。さらにキメラマウスの作出にも成功し樹立した EES 細胞は多分化能をもっていることを証明した (Human Cell 14:283-291, 2001. 平成 13 年日本組織培養学会賞 受賞)。この EES 細胞を懸濁培養して胚様体を作り、さらにこれを embryotrophic factors (ETFs) (Human Cell 13:185-195, 2000) 存在下に灌流培養して胚子様構造物を成育させることに成功し公表している (平成 14 年 日本ヒト細胞学会賞 受賞)。この胚子様構造体には心臓原基をはじめ各種器官・臓器の原基 (脳、眼、脈絡叢、消化管、肝臓、気管、軟骨、骨など) が存在しており、ここから肝臓の原基を採って培養すると、肝臓の構成細胞を one set 得ることができ、これを増殖させれば肝再生医療に用いることができる。実際、肝不全ラットにこの細胞を移植し肝不全ラットの寿命を著しく伸ばすことに成功している (日本ヒト細胞学会賞 受賞)。

2. 研究の目的

総務省が発表した「社会生活基本調査」によれば、我が国の高齢者の数は 2,400 万人にのぼったという。高齢者は、歯周病、外傷または加齢により歯が脱落することが多い。近年では糖尿病などの全身疾患との関連も指摘されている。歯の喪失後はそのまま放置したり、ブリッジや義歯またはインプラントに頼ることが多いが、これらではおそらく能力が低下して、噛みごたえを失い、料理の味を悪くするというクレームがよく聞かれる。またインプラント後に周囲の骨が吸収されて、せっかく入れたインプラントが抜け落ちてしまったという話も聞く。食事は単に栄養を摂るだけではなく、QOL を高めたための最重

要な要素である。もし、加齢や病気により歯が脱落した後に、自己の細胞から作った歯・歯周組織を移植できればQOLを高めるのにこの上ないことである。

そこで本研究の目的は、自己の骨髄の組織幹細胞や抜去歯由来の組織幹細胞から培養法を用いて免疫問題や感染の問題の全く生じないオーダーメイドの再生歯を作ること、そして、その移植法を開発することである。

3. 研究の方法

ヒト骨髄より組織幹細胞を樹立し、この幹細胞を懸濁培養（図1）して胚様体を形成し、これにembryotrophic factor (ETFs) を作用させつつ灌流培養して培養液に浮遊性の胚子様構造体を成育させる。この構造体中に存在する歯胚原基を採取し、さらに灌流培養してヒトの歯を成育させる。また、ヒト再生歯をヒトに最も近いとされるバブーンに移植し、ヒトへの移植の基礎実験とする。本研究は、自己骨髄の幹細胞から感染や免疫の全く心配のない歯を作り、自己に移植することを目的とする。そのための基礎実験としてマウスを使用する。

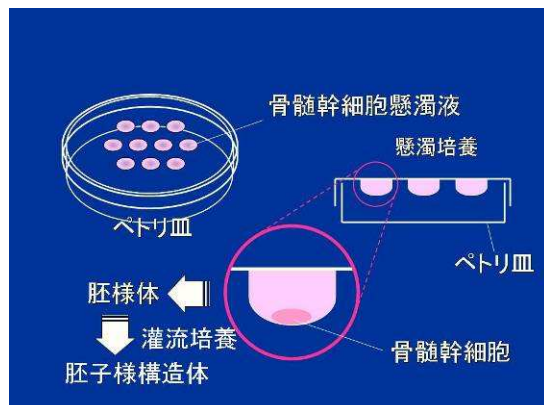


図1. 懸濁灌流培養による胚子様構造体の作製

(1) 骨髄由来の幹細胞株樹立：マウス大腿骨由来の骨髄細胞は flush out 法で採取する。ヒトの骨髄は骨折治療のためドリルで骨に穴をあける際、自然に流出する骨髄を採取する。

(2) 両者とも DMEM/F12 培養液(GM)にてピペティングし、静置培養する。およそ24時間後に培養液を交換し、以後、週2回の割でGMを交換する。付着細胞を長期間培養すると、小型球形細胞からなるコロニーが出現するので、これを colonial cloning し幹細胞株を樹立する。マウス骨髄由来の幹細胞株はLIFを添加し、ヒト骨髄由来の細胞株はFGF2を添加して未分化状態を維持する。幹細胞の分離にFACSを使用しないのは分離細胞のダメージと cell contamination を避けるた

めである。

(3) 幹細胞の同定：RT-PCR ならびに免疫不全マウスの皮下へ移植し、3胚葉性テラトーマの作出で確認する。

(4) マウスの内エナメル上皮細胞は生後3~5日令の歯冠表層の細胞を分離し株細胞を樹立する。

(5) マウス抜去歯を静置培養し out growth 法で歯根膜細胞株を樹立する。またヒト抜去歯から歯根膜をカミソリメスではぎ取り細切し out growth 法で細胞シートを作成する。

(6) 樹立した幹細胞をヌードマウスに移植し、三胚葉性奇形腫の作出をもって、多分化能を有する幹細胞であることを同定する。さらにRT-PCRにて *Nanog*, *Oct3/4*, *Sox2* の発現をもって再確認する。

(7) 幹細胞にETFsを作用させ、懸濁培養により胚様体を作成する。

(8) 胚様体をアロカ(株)製のチャンバーに入れ、前述のETFs添加培養液で灌流培養する。再生歯の成長過程をビデオ撮影する(既存のビデオ撮影装置を使用する)。

(9) 再生歯はマイクロCT、光顕組織切片、免疫染色、実体顕微鏡でその構造を解析する。

(10) 移植歯の host からの血行状態を観察するために、共同研究者の橋本尚詞が開発した蛍光ゼラチン灌流法を使い、移植歯の歯髄内への host からの血管新生を明らかにする(橋本尚詞, *Methods in Enzymology*, 307, 1999)。

(11) 移植再生歯の生着状態は、軟エックス線とマイクロCT、及び光顕組織切片により移植床との骨の結合状態を解析する。

4. 研究成果

野生型 BALB/cA マウスならびに c3H/He マウスゆらいの CSA バリエーション (Hspa9b 遺伝子) を発現する BALB/cA-csa コンジェニックマウスから採取した歯根膜、歯髄、内エナメル上皮、さらに大腿骨の骨髄を初代培養し、それぞれの細胞株を樹立した。マウス由来の歯根膜細胞は細胞シートを作りやすく、我々が開発した歯根形成に使用するには不向きであった。マウス骨髄由来の幹細胞株を図2に

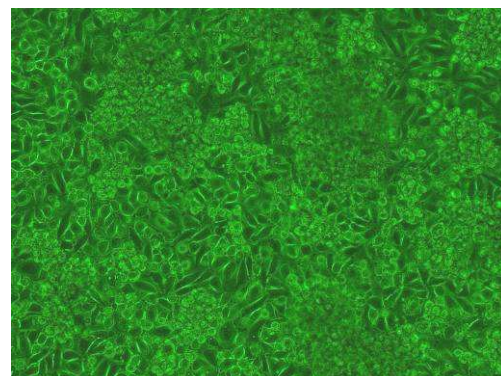


図2. マウス骨髄由来の幹細胞株

示す。

またヒトの骨髄を分散培養し、浮遊細胞を吸引除去し、接着性の細胞と骨髄片から out growth する細胞を長期間培養し、その中から幹細胞株 (図 3) を 27 株樹立した。このうち 3 株は免疫不全マウスの皮下で 3 胚葉性テラトーマを作出したこと、また RT-PCR にて *Nanog*, *Oct3/4*, *Sox2* を発現していたから多分化能をもつ細胞であると思われた。

この細胞を懸濁培養し胚様体を作り、ETFs にて胚子様構造体を成育させた (図 4) が、現在まで歯の原基は見つかっていない。

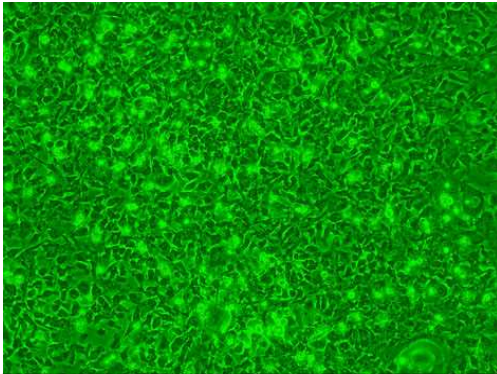


図 3. ヒト骨髄由来の組織幹細胞 RT-PCR にて *Nanog*, *Oct3/4*, *Sox2* の発現が認められた。

マウスのエナメル上皮細胞とヒト乳歯の歯髄細胞を接触させると、その境界部のエナメル上皮細胞が増殖し球形細胞になる (図 5)。この細胞はついで接着細胞となり、アメロブラスチンを産生するようになった。アメロブラスチン産生・マウスエナメル上皮細胞塊とヒト乳歯の歯髄細胞塊をコラーゲンゲル内で接触培養し、ヒトの歯根膜細胞シートで巻き、その上をコラーゲンスポンジで巻いて ETFs 添加 GM で灌流培養すると硬組織が再生された。マイクロ CT で観察すると、エナメル様構造物に囲まれた歯髄様構造が認められる (図 7)。

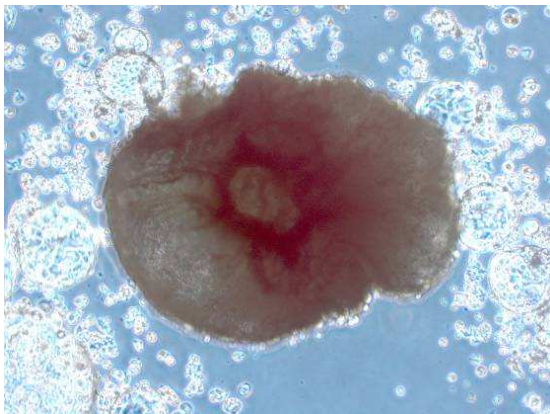


図 4. ヒト骨髄幹細胞由来胚子様構造体

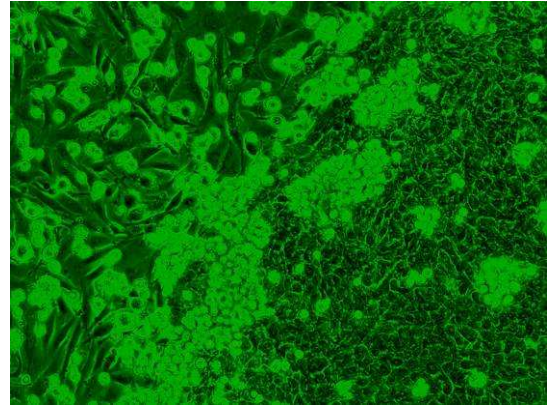


図 5. マウスのエナメル上皮細胞とヒト乳歯の歯髄細胞を並置培養すると境界部のエナメル上皮細胞の形態が球形に変化する。

ヒトの乳歯の歯髄細胞を初代培養すると、形態的に様々な形の細胞が出現する。その多くは同種の細胞ごとにコロニーを形成している。そこから colonial cloning し、ゾウゲ芽細胞の分離に成功した。この細胞は容易に硬組織を形成した (図 6)。そこでヒト乳歯の歯髄細胞を再生歯の作製に使用することとした。

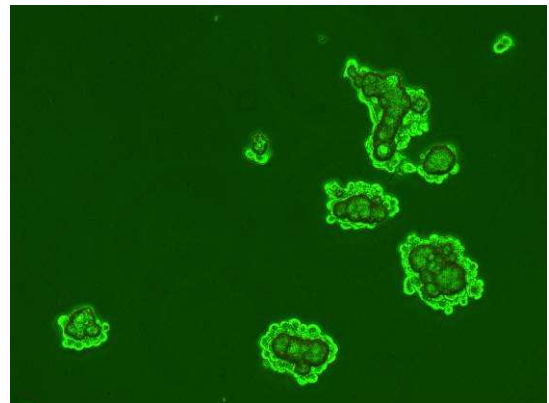


図 6. ヒト乳歯由来の歯髄細胞はゾウゲ様構造物を作る

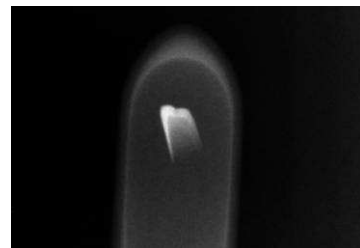
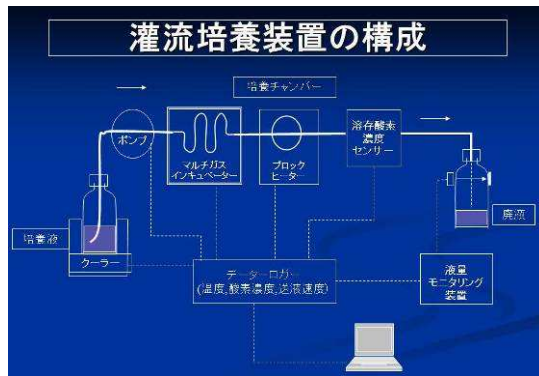


図 7. 培養で作製した完全再生歯 (約 5 mm)

アロカ（株）の大山先生が作製した灌流培養装置。上部の2つは4℃に冷却しているETFs入り培養液。下の2本の瓶は排液瓶である。冷却された培養液は細いチューブでチャンバーに導入され、チャンバー周囲のアルミ板内を通過する過程で37℃に加温される。その設計図を（図8）に示す。



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 18 件）

- ①Thais Miyuki Hirata, Nikolay Ishkitiev, Yaegaki Ken, Bogdan Calenic, Ishikawa Hiroshi, Nakahara Taka, Vanyo Mitev, Tanaka Tomoko, Markus Haapasalo. Expression of multiple stem-cell markers in dental-pulp cells cultured in serum-free media. JOE Tomoko Vol. 36, 2010, pp. 1139-1144,
- ②Nikolay Ishkitiev, Ken Yaegaki, BogdanCalenic, Taka Nakahara, Hiroshi Ishikawa, Vanyo Mitiev and Markus Haapasalo. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. J Endod, 査読有, Vol. 36: No. 5, 2010, pp. 469-474
- ③Yamashita T, Takahashi N, Hashimoto H, Tachibana T, Nakahara T, Ohyama A, Yanaga K, Establishment and characterization of a cell line (IGSK-3) secreting

hCG, ACTH, PTHrp derived from primary poorly differentiated adenocarcinoma of the stomach. Human Cell, 査読有, Vol. 21, No. 2, 2008, pp. 88-94

④Tamagawa T, Ishiwata I, Ishikawa H, Nakamura Y, Differentiation of amnion cells (HAM) into the cell with neural phenotype. Human Cell, 査読有, Vol. 21: 2008, pp. A30-31

⑤Ishikawa H, Nakahara T, Ohyama A, Hashimoto H, Tachibana T, Ishiwata I, Establishment of melanin containing cell line and nerve cell line derived from the anlage of the eyeball in the embryonic monster developed from early embryonic stem cell. Human Cell, 査読有, Vol. 121, No. 3, 2008. pp. A31

⑥Tanaka K, Hashimoto H, Tachibana T, Ishikawa H, Ohki T., Apoptosis in the small intestine of neonatal rat using blue light-emitting diode devices and conventional halogen-quartz devices in phototherapy. Pediatr Surg Int. 査読有, Vol. 24, No. 10, 2008, pp. 837-842

⑦田部井功、石川博、細胞移植療法の材料源としてのラット ES 細胞からヒト羊膜（幹）細胞まで、実験医学(増刊)「再生医療へすすむ最先端の幹細胞研究」Vol. 26, No. 5, 2008, pp. 192-198

⑧Tamagawa T, Ishiwata I, Ishikawa H, Nakamura Y. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human amnion-derived fibroblast-like cells, Human Cell, 査読有 21, 2008, pp38-45

〔学会発表〕（計 55 件）

①川上未有希、石川博、鈴木見奈子、富永徳子、立花利公、中原貴、田中彰、又賀泉。マウス E S 細胞を細胞源とする唾液腺の再生。第 10 回の本再生医療学会総会（ポスター）。東京、3月2日。再生医療（増刊号）10；280, 2011.

②田巻友一、中原貴、石川博、佐藤聡。ヒト抜去歯およびその付着組織由来間葉系幹細胞と長骨由来骨髄細胞の in vitro 比較解析。第 10 回の本再生医療学会総会（ポスター）。東京、3月2日。再生医療（増刊号）10；242, 2011.

③中原貴、井出吉昭、富永徳子、石川博。再生歯インプラントの実現に向けた歯根・歯周組織ユニットのインビトロ形成と移植評価、第 55 回日本口腔外科学会総会、幕張、2010,10,16-18. (Japanese Journal of oral & maxillofacial surgery 56(総会特別号)p133). (最優秀口演発表賞ならびに李春根賞。)

④中原貴、田巻友一、井出吉昭、富永徳子、那須優則、佐藤聡、石川博。"器官再生法"に

よる歯根・歯周組織-複合体のインビトロ形成と再生組織の解析。第9回日本再生医療学会 3月18日、広島、2010。日本再生医療学会雑誌 9, 276, 2010。

⑤田巻友一、中原貴、石川博、佐藤聡。抜去歯とその付着組織からの各種細胞群の自己複製能ならびに多分化能の in vitro 比較解析。第9回日本再生医療学会3月18日、広島2010。日本再生医療学会 9,275,2010。

⑥橋本尚詞、石川博、日下部守昭。幹細胞移植実験のための細胞起源同定法。第27回日本ヒト細胞学会学術集会、2009,8,22~23、東京

⑦中原貴、田巻友一、井出吉昭、富永徳子、那須優則、佐藤聡、石川博。シャーレ上での器官形成：器官再生法による歯根・歯周組織ユニットの形成。J.Oral Biosci.51:supple 2009,p76(1C1110)。

⑧富永徳子、中原貴、井出吉昭、那須優則、佐藤聡、石川博、佐藤田鶴子。ラット歯根膜からの各種細胞の分離法の検討。第6回日本再生歯科医学会（ポスター賞）。2008

⑨富永徳子、中原貴、井出吉昭、那須優則、佐藤聡、石川博、佐藤田鶴子。ラット歯根膜からの各種細胞の分離法の研究。第6回日本再生歯科学会学術大会・総会。東京、9月12-13日、2008。

⑩玉川 朝治、石渡 勇、石川 博、中村 幸夫。羊膜から樹立した細胞株（HAM）の神経細胞への分化誘導。第26回日本ヒト細胞学会、東京、8月30-31日、2008。

⑪ Tabei,I, Nakahara,T, Ishiwata,I, Ishida,Y, Ohyama,A, Yanaga,K and Ishikawa,H. Evaluation of an hepatocyte cell line derived from human amniotic stem cell. , Transplantation 86(2S) : 321,2008. Sydney Australia,10-14, August 2008.

⑫石川博。再生医療の最新の知見---肝臓・腎臓の再生について。第20回 小児腎臓用学会,特別講演。福岡、国際会議場。2008.6.12

⑬田部井功、中原貴、大山晃弘、橋本尚詞、立花利公、石渡勇、石田祐一、内田賢、矢永勝彦、大木隆生、石川博。ヒト羊膜細胞より肝細胞の作成と肝不全ラットへの移植によるその機能評価。第108回日本外科学会、2008年5月15~17日、長崎、日本外科学会雑誌 109、臨時増刊(2)、264、2008。

〔図書〕(計2件)

① 田部井功、石渡勇、石川博。細胞移植法の材料源としての幹細胞の可能性。pp. 336-350。幹細胞の分化誘導と応用—ES細胞・iPS細胞・体性幹細胞研究最前線—NTS, 2009

② Hashimoto H, Ishikawa H, and Kusakabe M. Preparation of Whole Mount and Thick Sections for Confocal Microscopy.

In: Techniques in Confocal Microscopy (ed. by P. Michael Conn) Elsevier Inc, 2010 ,pp.79-104.

〔産業財産権〕

○出願状況(計3件)

①名称：歯根・歯周組織ユニット形成方法、および再生歯

発明者：中原貴、石川博、佐藤聡、太田正人
権利者：学校法人・日本歯科大学

種類：特許

番号：特願2010-527809

出願年月日：2011年6月10日2月28日

国内外の別：国内

②名称：歯根・歯周組織ユニット形成方法、および再生歯

発明者：中原貴、石川博、佐藤聡、太田正人
権利者：学校法人・日本歯科大学

種類：特許

番号：13/040、672

出願年月日：2011年3月4日

国内外の別：外国(US)

③名称：歯根膜・歯周組織ユニット形成方法、および再生歯

発明者：中原貴、石川博、佐藤聡、太田正人
権利者：学校法人・日本歯科大学

種類：特許

番号：09811533.0

出願年月日：2011年3月4日

国内外の別：外国(EP)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 博 (ISHIKAWA HIROSHI)

日本歯科大学・生命歯学部・客員教授

研究者番号：30089784

(2) 研究分担者

佐藤 聡 (SATO SOU)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号：70235357

中原 貴 (NAKAHARA TAKA)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：10366768

那須 優則 (NASU MASANORI)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：50130688

井出 吉昭 (IDE YOSHIAKI)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：70409225

橋本 尚詞 (HASHIMOTO HISASHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：80189498

立花 利公 (TACHIBANA TOSHIAKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：80163476

日下部 守昭 (KUSAKABE MORIAKI)

東京大学・農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号：60153277