

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月20日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592528

研究課題名（和文） 歯の発生過程における上皮-間葉相互作用の分子メカニズムを応用した歯再生医療の開発

研究課題名（英文） Development of tooth regenerative therapy applied molecular mechanisms of epithelial - mesenchymal interactions in tooth morphogenesis

研究代表者

永井 宏和（NAGAI HIROKAZU）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：50282190

研究成果の概要（和文）：本研究では、歯の発生過程における上皮-間葉相互作用を応用した歯再生医療の開発を試みた。細胞源としてはヒト骨髄由来あるいはヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞を、スキャホールドとしては低結晶性炭酸アパタイトを用いた。その結果、間葉系幹細胞は石灰化能を有し、象牙芽細胞へ分化が可能であること、炭酸アパタイトは生体内で破骨細胞によって吸収されること、炭酸アパタイト上で培養した間葉系幹細胞が骨芽細胞へ分化することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we try to develop the tooth regenerative therapy applied to molecular mechanisms of epithelial - mesenchymal interactions in tooth morphogenesis. We used mesenchymal stem cells derived from human bone marrow or human adipose tissue for cell source of tooth regenerative therapy, and used low crystalline carbonate apatite for scaffold of tooth regenerative therapy. As a result, it was revealed that 1) mesenchymal stem cells have potency of odontoblastic differentiation, 2) carbonate apatite was resorbed by osteoclast in vivo, 3) mesenchymal stem cells cultured on carbonate apatite differentiated into osteoblastic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：再生医学，歯の再生医療，間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、失われた歯の治療は義歯やインプラントなどの人工材料による治療が行われているが、近年、幹細胞を用いた歯の再生医療の研究が活発に行われるようになり、失われた歯を取り戻すことも夢ではなくなりつつ

ある。しかしながら、歯の再生に関する多くの研究は、ブタやマウスの歯胚や歯髄由来の細胞を用いており、臨床応用を考えると、ヒト成体細胞を用いた基礎実験の蓄積が必須であり、豊富な細胞を供給できると考えられる幹細胞を用いた新たな歯再生医療の開発

が重要である。歯の発生過程において、エナメル芽細胞と象牙芽細胞は上皮-間葉相互作用によって、その増殖や分化が制御されている。このシグナル伝達に関与する因子としては、骨形成タンパク (BMP) やトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β)、線維芽細胞増殖因子 (FGF) などがあり、また、エナメル蛋白も重要な因子の一つである。特に BMP は歯胚形成の段階で発現部位が上皮から間葉へと移行することから、その中心的な役割を担っていると考えられる。一方、再生医療の3大要素のひとつである scaffold (細胞の足場) についていうと、骨再生用 scaffold の研究は盛んに行われているが、歯再生用 scaffold の研究はほとんどない。骨再生用 scaffold としてはハイドロキシアパタイトが有用なことが知られているが、焼結体であるハイドロキシアパタイトは体内で吸収されず、再生された骨の中に異物として残留する重大な欠点がある。歯の再生医療を考えると、生体内で吸収される生体材料が不可欠である。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪、骨格筋など様々な間葉系細胞への分化能を有し、再生医療の細胞源として注目を浴びている。申請者らは、間葉系幹細胞を用いた骨再生医療を目指し、ヒト骨髄から間葉系幹細胞を分離、培養し、その特性を明らかにしてきた。近年、間葉系幹細胞が神経細胞や肝細胞などの上皮系細胞へ分化が可能なことや、その起源が神経堤細胞であることなどが明らかにされたことから、申請者らは、歯の再生医療において、間葉系幹細胞が象牙芽細胞だけでなく、上皮系のエナメル芽細胞の細胞源として有用と考えた。

歯の発生過程において、エナメル芽細胞と象牙芽細胞は上皮-間葉相互作用によって、その増殖や分化が制御されている。このシグナル伝達に関与する因子としては、骨形成タンパク (BMP) やトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β)、線維芽細胞増殖因子 (FGF) などがあり、また、エナメル蛋白も重要な因子の一つと考えられている。申請者らは、マウス歯胚からエナメル芽細胞株および象牙芽細胞株を樹立し、その特性を明らかにしてきた。これらの不死化歯原性細胞株と間葉系幹細胞との相互作用を歯の再生医療の開発に応用することを考えた。

歯の再生医療を考えると、生体内で吸収される生体材料が不可欠である。申請者らは、焼結操作なしに低結晶性炭酸アパタイトを作製することに成功し、この低結晶性炭酸アパタイトが生体内で吸収されて骨に置換されることを明らかにしてきた。本研究では、この低結晶性炭酸アパタイトが骨再生用

scaffold のみならず、骨芽細胞に類似した象牙芽細胞の分化を促進する歯再生用の scaffold としても有用であると考えた。

そこで、本研究では、歯再生の細胞源としてヒト間葉系幹細胞を、歯再生用 scaffold として低結晶性炭酸アパタイトを用い、不死化歯原性細胞からのシグナル (上皮-間葉相互作用) を用いた新しい歯の再生医療を開発しようと考えた。

3. 研究の方法

(1) ヒト間葉系幹細胞の特性

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) とヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) の形態と増殖能を検討した。

ヒト間葉系幹細胞を骨分化誘導培地、軟骨分化誘導培地、脂肪分化誘導培地にて培養し、その骨、軟骨、脂肪への分化能を検討した。

(2) ヒト間葉系幹細胞の歯原性細胞への分化

間葉系幹細胞を、基底膜成分の調整品であるマトリゲルあるいは基底膜成分のラミニン、IV型コラーゲンをコートした培養皿上で、エナメル蛋白の主成分であるアメロゲンinを培地に加えて培養し、アリザリンレッド染色により石灰化能を、RT-PCR法により象牙芽細胞分化マーカー遺伝子 (象牙質シアロリントタンパク: DSPP, 象牙質基質タンパク質: DMP-1) の発現を調べ、間葉系幹細胞の象牙芽細胞への分化を検討した。

(3) 低結晶性炭酸アパタイトの吸収

新生仔ウサギの大腿骨から破骨細胞を分離し、低結晶性炭酸アパタイトブロックおよびハイドロキシアパタイト焼結体ブロック上で培養し、破骨細胞による吸収を検討した。

(4) 低結晶性炭酸アパタイトの生体内での挙動

低結晶性炭酸アパタイト顆粒をラットの背部皮下に埋植し、生体内での挙動を検討した。

低結晶性炭酸アパタイトおよびハイドロキシアパタイトの顆粒を、ラットの頭頂骨に形成した直径8mmの骨欠損に移植し、生体内での挙動を検討した。

(5) ヒト間葉系幹細胞の低結晶性炭酸アパタイト上での挙動

低結晶性炭酸アパタイトブロックおよびハイドロキシアパタイト焼結体ブロック上で、間葉系幹細胞を培養し、細胞の増殖能および骨芽細胞分化マーカー遺伝子 (I型コラーゲン, アルカリフォスファターゼ, オステオポンチン, オステオカルシン) の発現を調べた。

(6) 低結晶性炭酸アパタイトのタンパク吸着能

タンパク溶液中に低結晶性炭酸アパタイト

ト顆粒を浸漬し、上清中のタンパク濃度を測定して、タンパク吸着能を検討した。

(7)間質系細胞との共培養によるエナメル芽細胞の増殖と分化

エナメル芽細胞と間質系細胞を共培養し、間質系細胞から分泌されるタンパクがエナメル芽細胞の増殖と分化に与える影響を検討した。間質系細胞としては、shh あるいは Wnt5a 遺伝子を導入した Swiss-3T3 細胞を用いた。

(8)マウス歯原性細胞株の *in vivo* での異所性歯形成能

マウス歯胚から分離したエナメル芽細胞株 (ALC) を、基底膜成分由来のマトリゲル®を担体としてヌードマウス皮下に移植した。6, 20, 40 週後に試料を摘出し、組織学的評価を行った。

象牙芽細胞株 (OLC) と胎生 14.5 日のマウス歯胚から分離した歯原性上皮をペレット状にして共培養し、同系マウスの腎被膜下に移植した。2 週間後に標本を摘出し、組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1)ヒト間葉系幹細胞の特性

MSC, ADSC とも紡錘形で線維芽細胞様の形態をしていたが、その増殖能は MSC の方が速く、倍加時間は MSC が 20 時間、ADSC が 35 時間であった。

骨分化誘導培地で培養すると、両細胞とも石灰化がみられ、骨分化マーカー (I 型コラーゲン, アルカリフォスファターゼ, オステオカルシン) の発現が上昇した。

軟骨分化誘導培地で培養すると、両細胞とも軟骨基質の産生がみられ、軟骨分化マーカー (II 型コラーゲン, X 型コラーゲン, アグリカン) の発現が上昇した。

脂肪分化誘導培地で培養すると、両細胞とも脂肪滴が形成され、脂肪分化マーカー (C/EBP α , PPAR γ , aP2 など) の発現が上昇した。

MSC と ADSC の骨, 軟骨, 脂肪への多分化能が示された。

(2)ヒト間葉系幹細胞の歯原性細胞への分化

間葉系幹細胞を基底膜成分の調整品であるマトリゲル上で培養するとカルシウムの沈着が観察された。さらに、アメロゲンを加えて培養した間葉系幹細胞は、象牙芽細胞のマーカー遺伝子である DSPP (象牙質シアロリントタンパク) と DMP-1 (象牙質基質タンパク質) の発現が増強した。

間葉系幹細胞の象牙芽細胞への分化が示された。

(3)低結晶性炭酸アパタイトの吸収

炭酸アパタイトブロックでは破骨細胞による吸収窩が認められたが、ハイドロキシアパタイト焼結体では吸収窩は認められな

かった。炭酸アパタイトが破骨細胞によって吸収されることが明らかとなった。

(4)低結晶性炭酸アパタイトの生体内での挙動

ラットの背部皮下に移植した炭酸アパタイトの顆粒径は経時的に小さくなり、生体内で吸収されることが明らかとなった。また、組織切片での検討では、炭酸アパタイト顆粒の周囲には多数の異物巨細胞がみられた。

ラットの頭頂骨に形成した直径 8 mm の骨欠損に移植した炭酸アパタイトの顆粒径は経時的に小さくなり、生体内で吸収されることが明らかとなった。また、組織切片での検討により、炭酸アパタイトの生体内での吸収は破骨細胞によるものであることが明らかとなった。

(5)ヒト間葉系幹細胞の低結晶性炭酸アパタイト上での挙動

間葉系幹細胞の細胞接着は炭酸アパタイトとハイドロキシアパタイトの間に有意差はなかったが、培養皿よりも有意に低かった。また、炭酸アパタイト上での細胞増殖能は培養皿よりも有意に低かったが、ハイドロキシアパタイトの間には有意差はなかった。炭酸アパタイト上で培養した間葉系幹細胞は、骨芽細胞の分化マーカーの発現が上昇しており、骨芽細胞への分化が示された。

(6)低結晶性炭酸アパタイトのタンパク吸着能

炭酸アパタイトはタンパクを吸着するものの、その吸着量はハイドロキシアパタイトの半分程度であった。炭酸アパタイトはアルブミンなどの中性タンパクの吸着能は低く、塩基性蛋白を吸着しやすい傾向がみられた。

(7)間質系細胞との共培養によるエナメル芽細胞の増殖と分化

共培養により、エナメル芽細胞のコロニー数は増加し、中に小結節が形成された。エナメル芽細胞の Runx2 の発現は Wnt5a により抑制され、Notch の発現は Shh および Wnt5a によって抑制されており、これらの形態形成タンパクがエナメル芽細胞の分化・増殖に関与していることが示唆された。

(8)マウス歯原性細胞株の *in vivo* での異所性歯形成能

ヌードマウスの皮下にマトリゲル®を担体として移植したエナメル芽細胞は、内部がアメロゲン陽性の結節を形成し、エナメル器に類似した細胞塊が観察された。移植後 40 週では、移植片部は硬化し、X 線不透過像とアリザリンレッド染色陽性を呈した。

象牙芽細胞株 (OLC) と胎生 14.5 日のマウス歯胚から分離した歯原性上皮とをペ

レット状にして、同系マウスの腎被膜下に移植すると、2週間後には歯胚様組織を形成した。

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0件)

〔学会発表〕(計9件)

- ①. 中田 憲, 桑島精一, 山崎雅人, 高野裕史, 福田雅幸. 間質系細胞の支持と形態形成タンパクがエナメル芽細胞の増殖と分化に与える影響. 第56回社団法人口腔外科学会総会・学術大会, 2011年10月22日, 大阪国際会議場, (大阪)
- ②. 小代田宗一, 小代田理江, 堀川彩夏, 牧野晃大, 遊佐和之, 小泉幸央, 杉山俊博. マウスエナメル芽細胞前駆細胞と象牙芽細胞前駆細胞の共培養による石灰化促進. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月8日, 神戸ポートアイランド (神戸)
- ③. 藤澤健司, 湯浅哲也, 永井宏和, 池村光代, 佐藤裕子, 大江 剛, 山本克史, 都留寛治, 石川邦夫, 宮本洋二. 低結晶性炭酸アパタイトの顎骨再建への応用に関する基礎的研究(第5報) 顆粒径が炭酸アパタイトの吸収と骨形成に及ぼす影響. 第32回日本バイオマテリアル学会大会, 2010年11月29日, グランドプリンスホテル広島 (広島)
- ④. 湯浅哲也, 藤澤健司, 永井宏和, 大江 剛, 佐藤裕子, 池村光代, 山本克史, 都留寛治, 石川邦夫, 宮本洋二. 低結晶性炭酸アパタイトの顎骨再建への応用に関する基礎的研究(第4報) イヌ顎骨内における組織反応. 第32回日本バイオマテリアル学会大会, 2010年11月29日, グランドプリンスホテル広島 (広島)
- ⑤. 中田 憲, 桑島精一, 高野裕史, 福田雅幸. 歯由来細胞株を用いた歯の再生医療の開発 マウス皮下におけるエナメル芽細胞の特性. 第55回社団法人口腔外科学会総会・学術大会, 2010年10月17日, 幕張メッセ (千葉)
- ⑥. 永井宏和, 佐々井明子, 大江 剛, 茂木勝美, 内田大亮, 玉谷哲也, 中田 憲, 宮本洋二. ヒト幹細胞を用いた歯再生医療に関する基礎的研究 間葉系幹細胞の歯原性細胞への分化. 第54回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2009年10月10日, 札幌コンベンションセンター (札幌)
- ⑦. 舘原誠晃, 宮本洋二, 永井宏和, 藤澤健司, 桃田幸弘, 湯浅哲也, 高野栄之, 福田雅幸. 低結晶性炭酸含有アパタイトの

顎骨再建への応用に関する基礎的実験 : 骨組織内での長期評価. 第54回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2009年10月10日, 札幌コンベンションセンター (札幌)

- ⑧. 高野栄之, 桃田幸弘, 湯浅哲也, 舘原誠晃, 藤澤健司, 宮本洋二. 低結晶性炭酸含有アパタイトの顎骨再建への応用に関する基礎的研究 ウサギ上顎洞内での組織学的検討. 第39回社団法人日本口腔インプラント学会・学術大会, 2009年9月27日, 大阪国際会議場 (大阪)
- ⑨. 舘原誠晃, 宮本洋二, 永井宏和, 藤澤健司, 桃田幸弘, 湯浅哲也, 高野栄之, 福田雅幸. 低結晶性炭酸アパタイトの顎骨再建への応用に関する基礎的研究 骨組織内での長期評価. 第63回特定非営利活動法人日本口腔科学会学術集会, 2009年4月17日, アクトシティ浜松 (浜松)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 宏和 (NAGAI HIROKAZU)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
研究者番号: 50282190

(2) 研究分担者

宮本 洋二 (MIYAMOTO YOUJI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号: 20200214
中田 憲 (NAKATA AKIRA)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号: 50400510
杉山 俊博 (SUGIYAMA TOSHIHIRO)
秋田大学・医学部・教授
研究者番号: 00127242
玉谷 哲也 (TAMATANI TETSUYA)
徳島大学・病院・講師
研究者番号: 30274236
内田 大亮 (UCHIDA DAISUKE)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 20335798

(3) 連携研究者

なし