

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293405

研究課題名(和文) ラット切歯歯髄幹細胞による臼歯歯髄の再生：自己幹細胞移植による歯髄再生への展開

研究課題名(英文) Regeneration of rat molar pulp tissue by the implantation of stem cells from incisor pulp: development of a rat model of autologous pulp tissue engineering

研究代表者

興地 隆史 (OKIJI, Takashi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：80204098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、自己幹細胞移植によるラット臼歯歯髄再生の実験系の構築、および血管内皮細胞・幹細胞混合移植による組織再生促進の検証を目的とした。生活断髄後のラット上顎第一臼歯歯冠歯髄腔にラット骨髄間葉系幹細胞(MSC)を添加したPLLA/ハイドロゲル混合三次元スキャホールドを埋植すると、術後1週で歯髄様組織が形成された。さらに、MSCとラット血管内皮細胞を混合移植すると、MSC単独移植と比較して血管新生関連因子や象牙質シアロリントンの遺伝子発現が亢進し、スキャホールドの吸収が迅速であるとともに、完全な被蓋硬組織形成が生じた。ラット切歯歯髄より単離した幹細胞を用いて同様の解析を実施中である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish an experimental autologous coronal pulp regeneration model using rat molars and examine whether co-implantation of endothelial cells with stem cells accelerates pulp tissue regeneration. Rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) with PLLA/peptide hydrogel constructs were implanted into the coronal pulp chamber of pulpotomized maxillary first molars of Wistar rats. One week after the implantation, a pulp-like tissue was generated in the pulp chamber. In teeth in which rat endothelial cells were co-implanted with MSCs, gene expression levels of pro-angiogenic factors such as Cxcl1 and dentin sialophosphoprotein were elevated compared with MSC-implanted teeth. The co-implanted teeth also showed accelerated scaffold absorption and complete dentin bridge formation. A similar analysis is in progress using stem cells isolated from rat incisor pulp tissues.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯学 歯内治療学 歯髄再生 歯髄幹細胞 血管内皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

歯髄に細菌感染が生じた場合、現在なお多数の症例で抜髄を施さざるを得ない。しかし、除去された歯髄組織の再生が可能となれば、歯の生来の機能が回復するとともに物性が向上し、歯の残存期間の飛躍的延長が期待される。このような観点から組織幹細胞移植による歯髄組織再生療法の可能性が探索されており、歯髄や歯乳頭由来の組織幹細胞をスキャホールドとともに埋植することにより歯髄様組織が形成されることを示した報告がなされつつある<sup>1,2)</sup>。申請者らも上述の点に着目して、組織幹細胞を用いた歯髄再生に対する検索を重ねており、米国ミシガン大学との共同研究において、組織幹細胞の一種であるヒト乳歯由来幹細胞を poly-L-lactic acid (PLLA) スキャホールド<sup>3)</sup>とともにヒト抜去歯スライス歯髄腔内に移植し、再生組織を免疫不全マウス背皮下において増殖させることにより、象牙芽細胞様細胞の配列を含め、正常歯髄組織に形態学的・組織学的・分子生物学的に類似した歯髄様組織を再生させることに成功している<sup>4,5)</sup>。

また、我々は、ラット歯髄では、2種の幹細胞マーカー (MAP1-B と CD146) を同時に発現する組織幹細胞様細胞の一群が、歯根膜組織と比較して多数存在することを見いだしている<sup>6)</sup>。

そこで本研究は、これまでの研究成果を進展させるべく、組織幹細胞をラット臼歯歯冠部歯髄腔へ PLLA/ペプチド水素ゲル混合型スキャホールドとともに移植し、組織幹細胞移植術の概念に基づく歯髄組織再生療法の有効性を評価するとともに、ラット臼歯における歯髄再生の実験系構築を図ることを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究では、ラット切歯歯髄より単離・培養・増殖させた切歯歯髄幹細胞を用いて、生活歯髄切断法により歯根部歯髄を保存しつつ、歯冠部歯髄を組織工学的手法により再生させることを究極の目標とし、以下の検索を実施した。

- (1) PLLA/ペプチド水素ゲル混合型 3次元スキャホールドとラット骨髄間葉系幹細胞を、根部歯髄を残し冠部歯髄のみを除去したラット臼歯へ移植し、歯髄の再生が誘導可能かどうかを、検証する。
- (2) これまでの我々の研究から、血管内皮細胞と幹細胞を混合して移植すると、幹細胞単独よりも組織再生が速やかに生じることが分かっている。そこで本研究では、幹細胞と血管内皮細胞を上記(2)と同様の手法を用いて混合移植し、速やかな歯髄の再生が生じるかどうかを検証する。

- (3) 自家幹細胞移植を想定した実験モデル確立のため、ラット切歯歯髄幹細胞の単離培養系を確立する。

## 3. 研究の方法

- (1) ラット臼歯歯冠部歯髄腔への幹細胞の移植

全身麻酔下で Wistar ラット上顎第一臼歯の冠部歯髄を除去したのち、ラット骨髄間葉系幹細胞、もしくは同幹細胞およびラット血管内皮細胞を添加した PLLA/ペプチド水素ゲル混合型三次元スキャホールドを同部に埋植し、水硬性セメントもしくは mineral trioxide aggregate で窩洞を封鎖した。

- (2) 再生組織の評価

移植 3-14 日後に動物を安楽死させたのち被験歯を採取し、再生組織を組織学的に評価した。さらに、再生組織に対して象牙芽細胞分化マーカー (nestin) や血管内皮細胞マーカー (CD31) を用いた免疫組織化学的解析、real-time PCR 法による血管新生関連遺伝子や象牙芽細胞関連遺伝子 (象牙質シアロリントタンパク遺伝子: *DSPP*) の発現解析、および Western blot 法による nestin および血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) のタンパク発現解析を行った。

- (3) ラット切歯歯髄幹細胞の単離・培養

雄性 Wistar ラット切歯歯髄をコラゲナーゼ・ディスパーゼ混合溶液処理することで得られた歯髄細胞を、CD146 抗体、MAP1B 抗体と反応させたのち、ダイナビーズを用いた磁気分離法により単離・培養した。これらの細胞における幹細胞関連遺伝子の発現を real-time PCR 法で解析した。

## 4. 研究成果

- (1) ラット臼歯歯冠部歯髄再生モデルの確立

PLLA/ペプチド水素ゲル混合型三次元スキャホールドをラット間葉系幹細胞とともに、根部歯髄を残し冠部歯髄のみを除去したラット上顎第一臼歯へ移植し、歯髄再生の様相を検証した。幹細胞・スキャホールド混合移植 3 日経過例では、スキャホールドに沿って細胞が観察されたが充実性組織は観察されなかった。しかしながら、幹細胞・スキャホールド混合移植後 7 日経過例では、ほぼ全ての移植部が歯髄様の充実性組織で満たされていた。一方、幹細胞を混合せずスキャホールドのみを移植した群においては、移植後 7 日経過しても移植部に充実性組織形成は認められなかった。また、両群とも観察期間を通じ明白な好中球浸潤は観察されなかった。さらに、移植後 7 日経過例において、CD43 陽性 T 細胞様細胞の密度を移植組織と正

常組織と比較したところ、有意差は認められなかった。

以上より、幹細胞混合三次元複合型スキャホールド移植7日間で、正常歯髄と組織学的に類似した歯髄様充実性組織の再生が可能である事が確認された。

### (2) 骨髄間葉系幹細胞・血管内皮細胞混合移植による歯髄組織再生の促進

上述のラット臼歯歯冠歯髄再生モデルを用いて、骨髄間葉系幹細胞・血管内皮細胞の混合移植の効果について解析し、混合移植により歯髄組織再生が促進することを確認した。

すなわち、混合移植群の再生組織では、幹細胞単独移植群と比較してスキャホールドの吸収が迅速に進行するとともに、移植2週間にはnestin陽性の象牙芽細胞様細胞の配列を伴う完全な被蓋硬組織形成が生じることを認めた。さらに、混合移植群の再生組織では、血管新生関連遺伝子 (*Bcl-2*, *Cxcl1*, *Cxcr2*) や象牙質シアロリントタンパク遺伝子、さらには血管内皮細胞増殖因子やnestinのタンパク発現が亢進するとともに、CD31陽性血管内皮細胞が単独移植群と比較して高密度に分布することが確認された。

以上のような、幹細胞と血管内皮細胞との混合移植による組織再生の促進は、歯髄組織に限らず独自性の高い知見といえることができる。混合移植後に血管新生促進因子の発現が亢進して再生組織における血管新生が促進されることから、歯髄の再生が迅速に生じたものと考えられる。

### (3) ラット切歯歯髄由来幹細胞様細胞の単離・培養系の確立

ラット切歯歯髄より CD146 抗体、MAP1B 抗体を用いた磁気分離法により、CD146 陽性/MAP1B 陽性幹細胞様細胞を単離・培養することが可能であった。これらの細胞が CD146、MAP1B、CD90、CD105 などの幹細胞関連遺伝子を発現することを確認し、ラット切歯歯髄幹細胞の培養実験系を確立した。

現在、これら CD146/MAP1B 陽性幹細胞をラット臼歯歯冠歯髄腔に移植し、骨マトリックスタンパクや血管新生関連遺伝子の発現解析から歯髄組織再生の評価を行っている。また、血管内皮細胞の培養系の樹立を目指し、ラット切歯血管内皮細胞 (CD146 陽性/MAP1B 陰性細胞) を単離し、血管内皮細胞マーカー (VEGFR など) の遺伝子発現解析を行っている。血管内皮細胞の培養系の樹立後、前述のラット切歯歯髄幹細胞様細胞とともに、自家移植を想定した混合移植を行い、歯髄組織の再生が促進できるかについて解析を進める予定である。

### <引用文献>

Shi S, *et al.* J Bone Miner Res. 18, 696, 2003.

Miura M, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 100, 5807, 2003.

Kaneko T, *et al.* Cancer Res 67, 9685, 2007.

Cordeiro MM, Kaneko T, *et al.* J Endod 34, 962, 2008.

Kaneko T, Okiji T, *et al.* Handbook of macrophages: life cycle, functions and diseases. 2012.

Kaneko T, Okiji T, *et al.* Cell Tissue Res. 351, 425-432, 2013.

### 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11件)

Ito T, Kaneko T, Sueyama Y, Kaneko R, Okiji T. Dental pulp tissue engineering of pulpotomized rat molars with bone marrow mesenchymal stem cells. *Odontology*; 印刷中 (査読有). DOI:10.1007/s10266-016-0283-0. Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. Effect of lipopolysaccharide stimulation on stem cell-associated marker-expressing cells. *International Endodontic Journal*; 印刷中 (査読有). DOI:10.1111/iej.12740.

金子友厚, 末山由希子, 伊藤崇史, 興地隆史. ラット臼歯冠部歯髄に対する組織再生実験モデルの確立. 歯界展望, 印刷中 (査読無).

Ohkura M, Ohkura N, Yoshida N, Yoshida K, Ida-Yonemochi H, Ohshima H, Saito I, Okiji T. Orthodontic force application upregulated pain-associated prostaglandin- $I_2$ /PG $I_2$ -receptor/TRPV1 pathway-related gene expression in rat molars. *Odontology*; 印刷中 (査読有).

Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Kaneko R, Okiji T. Implantation of endothelial cells with mesenchymal stem cells accelerates dental pulp tissue regeneration/healing in pulpotomized rat molars. *Journal of Endodontics* 2017; 43(6): 943-948 (査読有). DOI: 10.1016/j.joen.2017.01.035.

Sugawara S, Shigetani Y, Kenmotsu S, Okiji T, Ohshima H. Evaluation of a

new mouse model for studying dental pulpal responses to GaAlAs laser irradiation. *Journal of Oral Biosciences* 2017; 59(1): 38-43 (査読有). DOI: 10.1016/j.job.2016.10.002

Shigetani Y, Ohkura N, Yoshiba K, Ohshima H, Hosoya A, Yoshiba N, Okiji T. GaAlAs laser-induced pulp mineralization involves dentin matrix protein 1 and osteopontin expression. *Oral Diseases* 2016; 22(5): 399-405 (査読有). DOI: 10.1111/odi.12461.

金子友厚. 幹細胞を用いた歯髄組織再生におけるマクロファージ様細胞について. *日本歯内療法学会雑誌* 2015; 36(1):13-16 (査読有)  
[http://www.jea.gr.jp/gk\\_si/36-1.shtml](http://www.jea.gr.jp/gk_si/36-1.shtml)

Shigetani Y, Yoshiba K, Kuratate M, Takei E, Yoshiba N, Yamanaka Y, Ohshima H, Okiji T. Temporospatial localization of dentine matrix protein 1 following direct pulp capping with calcium hydroxide in rat molars. *International Endodontic Journal* 2015; 48(6): 573-581 (査読有) DOI: 10.1111/iej.12351.

Yoshiba N, Yoshiba K, Ohkura N, Takei E, Edanami N, Oda Y, Hosoya A, Nakamura H, Okiji T. Correlation between fibrillin-1 degradation and mRNA downregulation and myofibroblast differentiation in cultured human dental pulp tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2015; 63(6): 438-448 (査読有).

DOI: 10.1369/0022155415580622.

末山有希子, 金子友厚, 伊藤崇史, 興地隆史. 歯髄幹細胞および歯髄組織の CD146 mRNA 発現に対する

lipopolysaccharide 刺激の影響. *日本歯科保存学雑誌* 2015; 58(5): 282-289 (査読有).

DOI: 10.11471/shikahozon.58.282.

[学会発表](計30件)

1. Gu B, Kaneko T, Sueyama Y, Sone PP, Okiji T. Immunohistochemical characterization of M2 macrophages in a rat experimental model of coronal pulp tissue engineering. The 59th Symposium of the Japanese Society of Microscopy. 2016.11.19. 帝京平成大学. 東京都豊島区.

2. 金子友厚, 伊藤崇史, 末山有希子, 顧彬, 興地隆史. ラット臼歯生活断髄モデルにおける冠部歯髄の再生 -間葉系幹細胞・血管内皮細胞混合移植と MTA による窩洞封鎖の効果-. 日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会(第 145 回). 2016.10.27. キッセイ文化ホール, 長野県松本市.
3. 末山有希子, 金子友厚, 伊藤崇史, 興地隆史. ラット切歯歯髄組織の幹細胞関連因子発現および MAP1B/CD146 発現細胞に対する LPS 刺激の影響. 日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会(第 145 回). 2016.10.27. キッセイ文化ホール, 長野県松本市.
4. Okiji T. Vital pulp therapy: biological basis and current concepts. The 18th Joint Scientific Meeting of Korean Academy of Conservative Dentistry - Japanese Society of Conservative Dentistry. 2016. 10. 23. Seoul, Korea.
5. 吉羽邦彦, 枝並直樹, 日向 剛, 韓 臨麟, 竹内亮祐, 遠間愛子, 大倉直人, 武井絵梨花, 重谷佳見, 吉羽永子, 興地隆史. 各種ケイ酸カルシウム系セメントの生体機能性と直接覆髄後の歯髄反応. 第 23 回日本歯科医学会総会. 2016. 10. 21. 福岡国際会議場, 福岡県福岡市.
6. 興地隆史. 歯髄保存を考えるーバイオロジーと臨床の連携ー. 第 37 回日本歯内療法学会学術大会. 2016. 7.24. ウィンク愛知, 愛知県名古屋市.
7. 末山有希子, 金子友厚, 伊藤崇史, 興地隆史. 間葉系幹細胞と血管内皮細胞の混合移植はラット臼歯冠部歯髄の再生を促進する. 第 37 回日本歯内療法学会学術大会. 2016. 7.24. ウィンク愛知, 愛知県名古屋市.
8. 金子友厚, 伊藤崇史, 末山有希子, 興地隆史. 間葉系幹細胞移植後の再生歯髄に出現する マクロファージ様細胞の免疫組織化学的解析. 第 37 回日本歯内療法学会学術大会. 2016. 7.24. ウィンク愛知, 愛知県名古屋市.
9. Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. Lipopolysaccharide induces proliferation and CD146-upregulation of dental pulp stem cell. 94th General Session and Exhibition of the IADR 2016. 6.22. Seoul, Korea.
10. 末山有希子, 金子友厚, 伊藤崇史, 興地隆史. 歯髄幹細胞に対する lipopolysaccharide 刺激の影響. 第 49

- 回新潟歯学会総会. 2016.04.23. 新潟大学歯学部, 新潟県新潟市.
11. Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. Effects of lipopolysaccharide for three kinds of dental pulp related stem cells. Universitas Indonesia-Niigata University collaborative symposium. 2016.1. 9. Lombok, Indonesia.
  12. 伊藤崇史, 金子友厚, 末山有希子, 興地隆史. ラット冠部歯髓の再生歯髓様組織におけるDSPPとIL-6の遺伝子発現について. 日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会(第143回). 2015.11.12. 文京シビックセンター, 東京都文京区.
  13. 伊藤崇史, 金子友厚, 末山有希子, 興地隆史. 幹細胞混合三次元スキャホールド移植後の再生歯髓組織の解析. 平成27 年度新潟歯学会第2 回例会. 2015.11. 7. 新潟大学歯学部, 新潟県新潟市.
  14. Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. Lipopolysaccharide-stimulated dental pulp stem cells show increases of CD146 mRNA expression and cell proliferation. 第63 回 JADR 学術大会 2015.10.30. 福岡国際会議場, 福岡県福岡市.
  15. Ito T, Kaneko T, Sueyama Y, Okiji T. Dental pulp tissue engineering of pulpotomized rat molars. 第63 回 JADR 学術大会. 2015.10.30. 福岡国際会議場, 福岡県福岡市.
  16. Kaneko T, Sueyama Y, Ito T, Okiji T. Macrophage-like cells are differentiated from stem cells in engineered pulp tissues. 第63 回 JADR 学術大会. 2015.10.30. 福岡国際会議場, 福岡県福岡市.
  17. Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. Lipopolysaccharide-stimulation causes proliferation of stem cells of the dental pulp: Double immunoperoxidase labeling analysis. 第56 回日本組織細胞化学会 2015.10.03. 関西医科大学, 大阪府枚方市.
  18. Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. Effects of lipopolysaccharide-stimulation on CD146 and MAP1B mRNA expression in dental pulp stem cells. FDI 2015 Annual World Dental Congress. 2015.9.22. Bangkok, Thailand.
  19. Ito T, Kaneko T, Sueyama Y, Okiji T. Dental pulp tissue-engineering with stem cells in rat molars. FDI 2015 Annual World Dental Congress 2015.9.22. Bangkok, Thailand.
  20. 末山有希子, 金子友厚, 伊藤崇史, 興地隆史. Lipopolysaccharide 刺激後のヒト脱落乳歯歯髓幹細胞の CD146 mRNA 発現と細胞増殖に関する経時的検索. 第13 回日本再生歯科医学会学術大会. 2015.08.29. 日本歯科大学新潟生命歯学部, 新潟県新潟市.
  21. 伊藤崇史, 金子友厚, 末山有希子, 興地隆史. ラット再生歯髓組織内の幹細胞について. 第13 回日本再生歯科医学会学術大会. 2015.08.29. 日本歯科大学新潟生命歯学部, 新潟県新潟市.
  22. Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. Influence of lipopolysaccharide-stimulation on CD146 mRNA expression in dental pulp stem cells. 24th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus. 2015.8.17. Vienna, Austria.
  23. 末山有希子, 金子友厚, 伊藤崇史, 興地隆史. ヒト脱落乳歯歯髓幹細胞における CD146、MAP1B mRNA 発現に対する lipopolysaccharide 刺激の影響. 第36 回日本歯内療法学会学術大会. 2015.7.11. 鶴見大学, 神奈川県横浜市.
  24. 金子友厚, 伊藤崇史, 末山有希子, 興地隆史. ラット間葉系幹細胞を用いたラット臼歯冠部歯髓の再生について. 第36 回日本歯内療法学会学術大会. 2015.7.11. 鶴見大学, 神奈川県横浜市.
  25. 伊藤崇史, 金子友厚, 末山有希子, 興地隆史. Lipopolysaccharide 刺激されたラット間葉系幹細胞の細胞増殖と CD146mRNA 発現. 第36 回日本歯内療法学会学術大会. 2015.7.11. 鶴見大学, 神奈川県横浜市.
  26. 末山有希子, 金子友厚, 伊藤崇史, 興地隆史. 歯髓幹細胞における CD146 mRNA 発現に対する lipopolysaccharide 刺激の影響. 日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会(第142 回). 2015. 6.25. 北九州国際会議場, 福岡県北九州市.
  27. 伊藤崇史, 金子友厚, 山中裕介, 末山有希子, 吉羽邦彦, 興地隆史. ラット臼歯における幹細胞混合三次元スキャホールドを用いた歯髓再生. 日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会(第142 回). 2015. 6.25. 北九州国際会議場, 福岡県北九州市.
  28. Ohkura N, Ohkura M, Yoshida N, Yoshida K, Ida-Yonemochi H, Ohshima H, Okiji T. Immunolocalization and gene-expression of multidrug

- resistance-associated protein-4 in human pulp. 93rd General Session and Exhibition, of the IADR. 2015. 3. 13. Boston, USA.
29. Kaneko T, Yamanaka Y, Ito T, Okiji T. Immue-LCM analysis of M1/M2 macrophages in engineered dental pulp tissues, IMC-2014, 18th International Microscopy Congress. 2014.09.07. Prague, Czech.
30. 金子友厚, 伊藤崇史, 末山有希子, 山中裕介, 吉羽邦彦, 興地隆史. 再生歯髄組織におけるマクロファージの活性化と成熟-血管内皮細胞混合移植の影響 - 第35回日本歯内療法学会学術大会. 2014.7.13. 朱鷺メッセ, 新潟県新潟市.

〔図書〕(計1件)

Kaneko T, Sueyama Y, Okiji T, Nör JE. Understand Cancer - Research and Treatment. iConcept Press, 2016. Laser capture microdissection in tumor angiogenesis research related to Bcl-2 expression in endothelial cells: A review. (ISBN: 978-1-922227-386)

6. 研究組織

(1)研究代表者

興地 隆史 (OKIJI, Takashi)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80204098

(2)研究分担者

吉羽 邦彦 (YOSHIBA, Kunihiro)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30220718

吉羽 永子 (YOSHIBA, Nagako)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：10323974

大島 勇人 (OHSHIMA, Hayato)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：70251824

金子 友厚 (KANEKO, Tomoatsu)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科

・助教

研究者番号：70345297