

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11110

研究課題名(和文) 自家ラット臼歯歯髄幹細胞を用いた歯髄組織再生法の確立

研究課題名(英文) Establishment of dental pulp tissue engineering by using autologous dental pulp stem cells in rat molars

研究代表者

金子 友厚 (KANEKO, Tomoatsu)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70345297

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)：本研究はラット臼歯歯冠歯髄再生モデルを用いて、効率よく歯髄組織の再生を誘導できるシステムを構築することを目指した。ラット下顎臼歯あるいは切歯より、歯髄幹細胞および血管内皮細胞を単離した。共培養にて、細胞増殖に関する検索を行いVEGFがこれらの細胞増殖に重要な因子の一つであることが示唆された。そこで、この歯髄幹細胞を、冠部歯髄のみを除去したラット上顎臼歯へ移植し、歯髄の再生が誘導可能かどうかを、1～2週間の動物埋植実験により検証したところ、幹細胞と血管内皮細胞を混合し、さらにVEGFを添加して移植後、およそ1週間という短期間でdentin bridge様硬組織を有する歯髄様組織が再生できた。

研究成果の概要(英文)：In present analysis was performed by using in vivo protocol for pulp tissue engineering in pulpotomized rat teeth using implantation of stem cells. This model showed complete regeneration/healing with dentin bridge like formation within 2 weeks. First, dental pulp stem cells and endothelial cells from rat molars or incisors were collected and cultured. Second, in vitro co-culture was performed and we found VEGF is one of key factors of cell growth of stem cell and/or endothelial cells. Finally, the implantation of stem cells and endothelial cells treated with VEGF into rat molars was performed. This model showed dental pulp tissue regeneration/healing within 1 week.

研究分野：歯内療法学

キーワード：歯髄再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

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。

申請者らも上述の点に着目して検索を重ねており、米国ミシガン大学との共同研究において、ヒト乳歯由来幹細胞およびヒト血管内皮細胞を poly-L-lactic acid(PLLA)スキャホールドとともにヒト抜去歯スライスの歯髄腔内に移植、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する歯髄様組織を再生させることに成功している。

また申請者は、ラット間葉系幹細胞と上述の PLLA スキャホールドを、生活歯髄切断法で歯冠部歯髄の組織を除去したラット臼歯へ移植すると、正常歯髄組織に類似する歯髄組織を再生すること(幹細胞口腔内直接移植法)に成功している。

さらに申請者は、血管新生関連バイオマーカーが歯髄再生に対して果たす役割を検索し、繊維芽細胞増殖因子や血管内皮細胞増殖因子が速やかに歯髄組織再生を促すために重要な因子であり、そのため幹細胞と血管内皮細胞を混合移植すると、幹細胞単独の場合よりも、組織再生が促進されることを確認している。また、幹細胞から分化したマクロファージが、成熟した再生歯髄組織中では、組織修復マクロファージ(M2マクロファージ)として存在し、常在性マクロファージとして組織の恒常性の維持に関与することを報告している。しかし、上述の間葉系幹細胞を用いた口腔内直接法による歯髄組織再生法では、他科細胞移植による免疫拒絶反応を抑制するために、免疫抑制剤などの使用が常時必須となる。すなわち、歯髄組織再生においては、免疫拒絶反応を最小に抑えられる自家幹細胞を用いた口腔内直接法による歯髄組織再生法の開発は重要である。しかし、自家細胞を用いる移植法は、細胞を採取後、組織再生に必要な細胞数を得るために長期間培養する必要がある。そこで、速やかな自家細胞培養増殖法の開発も必要となる。

2. 研究の目的

これまでの自家幹細胞を用いた再生療法の研究においては、細胞を患者より採取後、生体外で長期間培養し、増殖させた後、生体内へ移植し、組織を再生させることを念頭に立案・実施されてきている。しかし、歯髄炎を生じ

た歯への実施が想定される歯髄組織の再生療法において、上述の手法を用いることは、細胞の培養・増殖に長時間費やすため、病態の悪化が懸念される。そこで本研究においては、ラットを実験動物として用い、免疫組織化学および分子生物学的手法を用いた *in vivo*(動物実験)を主とした実験系による検索を行い、採取した少量の自家臼歯歯髄幹細胞から、効率よく安全に臼歯歯髄組織を再生させる手法を、考案することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は以下のプロジェクトにより遂行された。

- ラット下顎臼歯の歯髄細胞を CD146 抗体、あるいは MAP1B 抗体と反応させダイナビーズを用いた磁気分離法によるラット歯髄幹細胞と血管内皮細胞を単離する短期培養系を確立した。
- 3次元スキャホールドと短期培養したラット下顎臼歯歯髄幹細胞を、根部歯髄を残し冠部歯髄のみを除去したラット上顎臼歯へ移植し、免疫抑制剤を用いず歯髄再生が誘導可能かどうかを、検証した。
- ラット歯髄幹細胞とラット血管内皮細胞を上記(b)と同様の手法を用いて移植し、さらに速やかな歯髄の再生が生じるかどうかを検証した。
- 炎症下顎臼歯歯髄の幹細胞を、炎症上顎臼歯へ移植し歯髄の再生が生じるかどうかを検証した。

4. 研究成果

本研究はラット臼歯歯冠歯髄再生モデルを用いて、効率よく歯髄組織の再生を誘導できるシステムを構築することを目指した。ラット下顎臼歯あるいは切歯より、歯髄幹細胞および血管内皮細胞を単離した。共培養にて、細胞増殖に関する検索を行い VEGF がこれらの細胞増殖に重要な因子の一つであることが示唆された。そこで、この歯髄幹細胞を、冠部歯髄のみを除去したラット上顎臼歯へ移植し、歯髄の再生が誘導可能かどうかを、1~2週間の動物埋植実験により検証したところ、幹細胞と血管内皮細胞を混合し、さらに VEGF を添加して移植後、およそ1週間という短期間で dentin bridge 様硬組織を有する歯髄様組織が再生できた。

また、再生歯髄組織および歯髄組織における、組織中に存在する M1 および M2 マクロファージの動態を検索し、移植初期では M1 マクロファージが、再生が進行するとともに M2 マクロファージが有意に存在することがわかった(論文投稿中)。

また、ラット歯髄幹細胞について検索し、MAP1B/STRO1 陽性細胞を同定した。
(Stem cells rev, 印刷中)

また、以下の賞を受賞した。

2017年06月日本歯科保存学会ジーシー
ー優秀ポスター賞。

2015年09月 The winner of the FDI
AWDC 2015 poster competition, within
the category “Dental Treatment &
Restorative Dentistry”, FDI Education
Committee and Dental Association of
Thailand.

2015年10月日本歯科保存学会ジーシー
ー優秀ポスター賞。

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6件)

Tomoatsu Kaneko, Bin Gu, Phyo Pyai
Sone, 他4名、Dental Pulp Tissue
Engineering Using Mesenchymal Stem
Cells: A Review with a Protocol, Stem
Cells Reviews and Reports、査読有、
2018年、印刷中、
DOI:10.1007/s12015-018-9826-9

Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T,
Effect of lipopolysaccharide stimulation
on stem cell-associated
marker-expressing cells, Int Endod J、査
読有、2018年;51 Suppl 2:e107-e114、
DOI: 10.1111/iej.12740.

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、査読有、2017年.10; 105
(4): 392-397. DOI:
10.1007/s10266-016-0283-0.

金子友厚, 末山有希子, 伊藤崇史, 興
地隆史, TOPIC ~さらなる歯髄再生療
法の発展へ~組織再生動物実験モデ
ルの確立、歯界展望、査読無、2017
年.08; 130 (2): 205-208.

https://www.ishiyaku.co.jp/search/details_1.aspx?cid=1&bookcode=021302

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、査読有 2017年.06; 43
(6): 943-948. doi:

10.1016/j.joen.2017.01.035.

金子友厚, 根管側枝を原因とする根尖
病変を有する歯の再根管治療、日本歯
科評論、査読無、2017.02; 177 (2):
14-17.

[https://www.hyoron.co.jp/book/b27968
2.html](https://www.hyoron.co.jp/book/b279682.html)

(学会発表)(計42件)

Gu B, Kaneko T, Sueyama Y, Su Yee
Myo Zaw, Phyo Pyai Sone, Murano H,
Okiji T. M1/M2 macrophage
recruitment during coronal
tissue-engineering in rat molars. 第
65回 JADR 総会・学術大会
2017.11.18 東京

Phyo Pyai Sone, Kaneko T, Su Yee
Myo Zaw, Sueyama Y, Gu B, Murano
H, Okiji T. Nerve Fibers in
Regenerative Process of Coronal
Pulp Tissue Engineering. 第65回
JADR 総会学術大会 2017.11.18 東
京

Phyo Pyai Sone, 金子友厚, Su Yee
Myo Zaw, 末山有希子, 顧彬, 村野
浩気, 興地隆史. ラット歯髄再生過
程における神経線維の再生につい
て. 日本歯科保存学会 2017年度秋
季学術大会(第147回) 2017.10.26
盛岡

Su Yee Myo Zaw, 金子友厚, 末山有希子, 顧彬, 興地隆史. 幹細胞と血管内皮細胞の共培養モデルにおける VEGF 発現について. 日本歯科保存学会平成 29 年度秋季学術大会 (第 147 回) 2017.10.26 盛岡

Su Yee Myo Zaw, Kaneko T, Sueyama Y, Gu B, Phyo Pyai Sone, Okiji T. The fate of stem cells implanted in rat dental pulp. FDI World Dental Congress 2017.08.29 Madlid, Spain

Su Yee Myo Zaw, 金子友厚, 顧彬, 末山有希子, Phyo Pyai Sone, 興地隆史. ラット再生歯髄における LacZ 発現幹細胞の局在. 第 38 回日本歯内療法学会学術大会 2017.07.22 東京

末山有希子, 金子友厚, 顧彬, Su Yee Myo Zaw, Phyo Pyai Sone, 興地隆史. ラット歯髄組織の再生に用いるハイドロゲルの検討: アポトーシス抑制効果の解析. 第 38 回日本歯内療法学会学術大会 2017.07.22 東京

Su Yee Myo Zaw, 金子友厚, 顧彬, 末山有希子, Phyo Pyai Son, 興地隆史. ラット再生歯髄における LacZ 発現幹細胞の局在. 第 38 回日本歯内療法学会学術大会 2017.07.22 東京

顧彬, 金子友厚, 末山有希子, Phyo Pyai Sone, Su Yee Myo Zaw, 興地隆史. ラット歯髄再生過程における M2 マクロファージの動態について. 日本歯科保存学会 2017 年度春季学術大会 (第 146 回) 2017.06.08 青森

金子友厚, 末山有希子, 顧彬, 興地隆史. ラット歯冠歯髄腔に移植した幹細胞の分化について. 第 73 回

日本顕微鏡学会学術講演会
2017.05.31 札幌

顧彬, 金子友厚, 末山有希子, Phyo Pyai Sone, Su Yee Myo Zaw, 興地隆史. ラット歯髄再生過程における M1 マクロファージの動態について. 第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会 2017.05.31 札幌

Sueyama Y, Kaneko T, Okiji T. Double Immunoperoxidase Labeling Analysis of Stem Cells in Lipopolysaccharide-Stimulated Rat Dental Pulp. 第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会 2017.05.30 札幌

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 Tokyo

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 年度秋期学術大会 (第 145 回) 2016.10.27 松本

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 年度秋期学術大会 (第 145 回) 2016.10.27 松本

Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. Implantation of stem cells with endothelial cells accelerates tissue

regeneration. Japanese Association for Dental Research Hatton Award Competition 2016.09.02 東京
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髓の再生を促進する. 第 37 回日本歯内療法学会学術大会

2016.07.24 名古屋

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髓に出現する 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

2016.07.24 名古屋

金子友厚, 庭野和明, 野杵由一郎, 前田健康, 興地隆史. Ni-Ti ローターファイルの歯内療法基礎実習への導入: R 相 Ni-Ti ローターファイルによる根管形成. 第 35 回日本歯科医学教育学会総会および学術大会

2016.07.02 大阪

Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, Okiji T. Lipopolysaccharide induces proliferation and CD146-upregulation of dental pulp stem cell. 94rd General Session and Exhibition of the IADR 2016.06.22 Seoul, Korea

(図書) (計 3 件)

興地隆史 (著 , 編集), 金子友厚 (著), 他. YEARBOOK 2017 最新エンドのグローバルスタンダード (別冊ザ・クインテッセンス). クインテッセンス出版, 2017.01 (ISBN : 4781205364)

Kaneko T, Sueyama Y, Okiji T, Nör JE. Understand Cancer - Research and Treatment. iConcept Press, 2016.03
Laser capture microdissection in tumor

angiogenesis research related to Bcl-2 expression in endothelial cells -A review-. (ISBN : 978-1-922227-386)
金子 友厚, 伊藤 崇史 , 山本 信一 . エンドのための重要 20 キーワード ベスト 240 論文 (トムソン・ロイターシリーズ). クインテッセンス出版, 2015.11 (ISBN : 4781204643)

(産業財産権)

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

(その他)

ホームページ等
http://reins.tmd.ac.jp/html/100023048_ja.html
https://www.researchgate.net/profile/Tomoatsu_Kaneko

6. 研究組織
(1) 研究代表者

金子 友厚 (KANEKO Tomoatsu)
東京医科歯科大学・
大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 70345297

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号:

(4)研究協力者

Jacques E. Nör (Jacques E. Nör)

米国ミシガン大学・歯学部う蝕学・歯内治療学・教授

Qiming Jin (Qiming Jin)

米国ミシガン大学・歯学部歯周病学・講師