

令和元年6月11日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11574

研究課題名(和文) 二相性担体での血球系細胞および口腔粘膜細胞の再分化による歯髄・象牙質複合体の再生

研究課題名(英文) Dentine-pulp complex from re-differentiation of blood and oral mucosal cells in bi-phasic scaffold

研究代表者

好川 正孝 (YOSHIKAWA, Masataka)

大阪歯科大学・歯学部・客員准教授

研究者番号：70148451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン様成長因子(IGF-1)またはMizoribine(Miz)を2日毎に2週間皮下投与したラットの粘膜細胞と末梢血細胞を採取した。粘膜細胞の培養ではMizの添加でカルシウム量の増加を認めた。IGF-1はこれらの細胞の増殖・分化を抑制する傾向を示した。粘膜細胞と血液細胞を播種した二相性多孔質担体を同系ラットの背部皮下に埋入した。7週後に、担体内にIGF-1投与ラット由来の粘膜細胞と血液細胞による硬組織形成と血管形成を認めた。

In vitroとin vivoの実験から、粘膜細胞の脱分化と硬組織形成、そして、血液細胞による血管形成の誘導に二相性担体が有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

整形外科では骨の再生に骨髄から幹細胞を採取するが、歯科領域では困難である。採取可能な血液または口腔粘膜の細胞から幹細胞を得て骨を再生する手法の確立が重要である。

インスリン様成長因子-1(IGF-1)またはMizoribine(Miz)を皮下に2日毎に2週間投与したラットから得た粘膜細胞と下顎切歯歯髄細胞をIGF-1またはMizを添加して培養した。その結果、Mizで石灰化物の形成が誘導され、IGF-1を皮下注射したラット背部皮下に埋入した二相性多孔質担体に口腔粘膜細胞による骨形成を認めた。組織液中の生理活性物質が骨形成を誘導し、歯の再生の実現にとって二相性担体を用いる意義が認められた。

研究成果の概要(英文)：Mucosal cells and peripheral blood-derived cells were obtained from rats received the subcutaneous injection of insulin-like growth factor (IGF-1) or Mizoribine (Miz) every 2 days for 2 weeks. Addition of Miz in the culture medium, calcium ion was increased in the medium by the culture of mucosal cells. It seemed that addition of IGF-1 in the culture medium might suppress the proliferation and differentiation of the cells. A biphasic porous scaffolds containing mucosal cells or blood-derived cells by seeding were implanted subcutaneously in the back of syngeneic rats. After 7 weeks, in the scaffolds, hard tissue formation and angiogenesis were observed by mucosal cells and blood cells derived from the IGF-1 injected rats.

The in vitro and in vivo experiments suggested that the biphasic scaffold is an effective for mucosal cell dedifferentiation and hard tissue formation, and for blood vessel induction by blood cells.

研究分野：歯内治療学

キーワード：歯の再生 幹細胞 インスリン様成長因子-1 Mizoribine 担体 粘膜細胞 血中細胞 生理活性物質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

整形外科領域の臨床では骨の再生のために必要な幹細胞は腸骨から骨髄細胞を採取して幹細胞を得ることが多い。しかしながら、歯科領域で歯の再生で幹細胞を得るために腸骨から骨髄細胞を採取することは不可能に近い。すなわち、腸骨からの骨髄細胞の採取には身体への大きな侵襲を伴うために歯の再生に用いるコンセンサスを得ることは困難と思われる。同時に、腸骨からの細胞採取は歯科医師が施術し得る領域ではないという大きな障壁がある。したがって、歯髄・象牙質複合体再生のために必要な幹細胞は、その採取が可能な範囲にあるセルソースを確立する必要がある。

歯の硬組織あるいは歯髄の再生では口腔内由来の硬組織形成性細胞を用いるのが妥当と考えられる。そして、主に乳歯や便宜抜髄された歯髄細胞から幹細胞を得る状況が続いていた。また、これまでに *in vitro* で歯胚から歯に成長させる研究が相次いでいるが、歯胚の摘出は外科的侵襲を幼少期に強いることになる。また、必ずしも将来に歯を欠損するとは限らず、歯胚を摘出して必要なときまで保存する試みは不確定な前提に基づいており、必然性に乏しい。

外胚葉系組織のエナメル質と間葉系組織である象牙質あるいは歯髄の再生では上皮細胞と間葉細胞の混合培養が必要であるが、混合培養は困難とされている。外胚葉系細胞と間葉系細胞のそれぞれを単独で培養した後に組み合わせて歯を再生することも検討されているが、実現されるに至ってはいない。さらに、歯の再生能力を有する歯胚上皮細胞の培養も容易ではない。また、極めて多数の幹細胞が骨や歯の硬組織を再生するために必要で、速やかに必要な多数の幹細胞を入手する培養法を考案する必要がある。歯内治療領域ではセルソースが極めて限定されているために、歯の硬組織再生のために必要な幹細胞を入手し難いことが歯の再生の研究を進展させるうえでの支障になっている。

一方、最近、再生歯髄の臨床応用が検討されており、血球系細胞あるいは血小板で満たした根管に歯髄が再生されたと報告されている。また、iPS細胞による歯の再生への応用も期待されるが、複雑な構造の歯の再生には解決するべき問題が多いと思われる。今後も、臨床に歯の再生を応用するまでにさらに多くの研究の積み重ねを必要とする状況にある。

以上が研究開始当初の背景である。

### 2. 研究の目的

象牙質の再生には一般に象牙芽細胞に分化する幹細胞を用いるが、その幹細胞は言うまでもなく、骨芽細胞を得る幹細胞のセルソースさえ、歯科領域では極めて限定されている。また、骨や歯の再生には多数の幹細胞が必要である。

末梢血あるいは口腔粘膜に由来する細胞を採取し、これらの脱分化を経て増殖させ、そして、幹細胞に再分化させることが歯科領域で幹細胞を得る良い手段であると考えられる。セルソースを口腔内に求めて *in vitro* で再分化して得た幹細胞から速やかに骨芽細胞あるいは象牙芽細胞の増殖を実現させて効果的に歯の硬組織の再生を誘導する。そして、最終的に歯の再生を実現させることが望まれる。歯の再生の研究の進展、ひいては歯の再生の臨床応用を遅らせる原因の一つは幹細胞を得難いことである。歯科保存学領域では最も容易に摘出が可能な口腔粘膜が幹細胞を得るためのセルソースとしての第一の候補と考えられる。口腔粘膜から分離した細胞を脱分化させ、その幹細胞から効率的に硬組織形成系細胞に再分化させ得る方法を確立することをこの研究における目標とした。また、採取が比較的容易な末梢血に由来する幹細胞を得ることも一つの方法であり、血液中の細胞から得られる幹細胞を骨形成性とし、それを迅速に増殖させる手法の確立を目指した。

なお、3次元構造をもつ歯の再生のためには幹細胞を立体培養し、あるいは、担体を用いる必要がある。骨あるいは歯を構成する硬組織を再生するためには担体が重要である。すなわち、幹細胞あるいは芽細胞の立体培養による硬組織形成にはかなりの長期間を要する。しかし、担体内での培養で硬組織形成を誘導すると担体が骨格になって比較的短時間で構造が完成し、しかも担体の硬度によっては形成された構造がより強固になると想像した。担体の利用が効果的に骨あるいは象牙質の形成を導くと確信する。そこで、骨あるいは象牙質を *in vivo* で形成させるためにアルギン酸とハイドロキシアパタイトとを組み合わせたハイブリッド担体を新規に開発し、また、アルギン酸スポンジまたは市販のスポンジとハイドロキシアパタイトを組み合わせたハイブリッド担体を作製してその開発と改良を進めなければならないと考えた。

アルギン酸/多孔質ハイドロキシアパタイトなどから成るハイブリッド担体内でこれらの細胞を骨芽細胞や象牙芽細胞に分化させ、緻密な骨あるいは象牙質形成の確実な誘導を可能にする。その上で、ホルマリン処理ポリビニルアルコールスポンジあるいは生分解性アルギン酸スポンジを多孔質ハイドロキシアパタイト中空部に挿入した新規ハイブリッド担体に粘膜由来細胞を播種する。そして、組織液中の各種生理活性物質の作用に期待して *in vivo* での担体内での粘膜細胞によって骨形成を誘導することをこの研究の目的とした。また、口腔粘膜細胞由来幹細胞の分化・増殖促進作用を有する因子を必須アミノ酸等、あるいは、市販の生理活性物質

を選択した中からスクリーニングで幹細胞増殖を促進する因子を *in vitro* で特定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)ハイブリッド担体の作製

気孔率が55%で直径8mmの内空を持つ直径10mmの円筒形多孔質ハイドロキシアパタイトの作製をメーカーに依頼した。そして、作製した直径8mmの円柱状のアルギン酸スポンジ、あるいは、市販のポリビニルホルマールスポンジを円筒状のハイドロキシアパタイトの中空部に挿入したハイブリッド担体を実験のために準備した。

アルギン酸ゲルの真空凍結乾燥によって円柱状アルギン酸スポンジを作製し、これを円筒形多孔質ハイドロキシアパタイトの中空部に挿入してハイブリッド担体とした。また、市販のシート状ポリビニルホルマールスポンジを円筒形に切り抜いて同様に多孔質ハイドロキシアパタイトの中空部に挿入してハイブリッド担体として実験に供した。

なお、ラット大腿骨骨髓細胞を採取し、初代培養した骨髓細胞をハイブリッド担体に播種して同系ラット背部皮下に埋入しての予備試験を実施し、7週後の担体気孔内骨形成を組織学的検索と免疫化学的オステオカルシン定量によって、作製したハイブリッド担体内での骨形成を確認した。

#### (2)血液由来細胞、口腔粘膜由来細胞および骨髓細胞の採取

雄性 Fischer344 ラット大腿骨から採取した骨髓細胞を対照に使用した。

歯科領域で硬組織形成性の細胞を得るセルソースを確立するためにラット尾静脈から採取した末梢血に含まれる細胞、あるいは、口腔粘膜由来の細胞を初代培養した。これらを脱分化させるための実験に必要な数に達するまでの間、培養を継続した。培養には、アルギン酸ゲル、あるいは、Keratinocyte Culture Medium、Eagle's minimum essential medium (E-MEM)、さらに、メチルセルロース添加 E-MEM を培地として使用して培養した。

多くの幹細胞を得る必要性を考え、口腔粘膜あるいは血中に幹細胞を増加させる作用、あるいは、成熟細胞の幹細胞への脱分化を促進する作用をインスリン様成長因子-1あるいは免疫抑制薬であるミゾリピンが有する可能性に期待して、2週に渡って2日毎に背部に皮下注射したラットから末梢血、あるいは、口腔粘膜に由来する細胞を採取し、実験に供した。

#### (3) *In vitro*での硬組織形成

末梢血、口腔粘膜、あるいは、骨髄から得た細胞を継代培養して分化・増殖を図って多くの幹細胞を得るように努めた。硬組織形成のための培地への添加因子として、デキサメタゾン+ $\beta$ -グリセロフォスフェイト+アスコルビン酸ナトリウム、インスリン様成長因子-1、ミゾリピン、あるいは、トランスフェリンなどのアミノ酸、などを用いてスクリーニングを行った。*In vitro*での石灰化 nodule の形成を顕微鏡下で観察し、培養後の生成物に含まれるカルシウムを生化学的に定量して硬組織形成の有無を評価した。

#### (4) *In vivo*でのハイブリッド担体内における骨形成

インスリン様成長因子-1 およびミゾリピンを皮下注射で投与したラットと非投与ラットとから得た末梢血、口腔粘膜、あるいは、骨髄由来細胞を培養して、アルギン酸スポンジまたはポリビニルホルマールスポンジと多孔質ハイドロキシアパタイトとのハイブリッド担体にそれぞれを播種した。また、スポンジ内には末梢血細胞を播種し、ハイドロキシアパタイトには骨髓細胞を播種したハイブリッド担体での実験を行った。これらの担体を同系ラットの背部皮下に埋入した7週後にスポンジ内での骨形成を検討した。さらに、円筒状担体の中空内に血管あるいは神経組織の再生を図って歯髄・象牙質複合体の形成を試みた。骨形成は組織学的に顕微鏡下で、そして、担体内のオステオカルシンを免疫化学的に定量して評価した。

### 4. 研究成果

#### (1)ハイブリッド担体

直径10mmの円筒状の多孔質ハイドロキシアパタイトの8mmの中空部に挿入する直径8mmの円柱状アルギン酸スポンジは、作製時のアルギン酸ゲルの粘性と濃度によって操作性が異なって、凍結乾燥においても温度変化で形成される気孔の形状に差異を生じる。これらの条件を可及的に一定にして、均一な形状と大きさの気孔を有するアルギン酸スポンジの形成が重要であるが、概ね一定の形状のスポンジ作製が可能になる手法を会得した。

ラット大腿骨から得た骨髓細胞を初代培養してハイブリッド担体に播種し、同系ラット背部皮下に埋入した予備試験で、7週後に担体の気孔内に骨形成が組織学的に認められ、また、免疫化学的オステオカルシン定量で円筒状のハイドロキシアパタイトで得られた $1.10 \pm 0.33 \mu\text{g}/\text{scaffold}$ の値に比べて有意に高い $11.76 \pm 0.62 \mu\text{g}/\text{scaffold}$ の値が得られ、ハイブリッド担体が骨形成試験に有効であることが確認された。

## (2)血液由来細胞、口腔粘膜由来細胞および骨髄細胞の採取

尾静脈から採血して得た血液細胞に付着細胞の存在はなく、セルインサートを使用し、また、アルギン酸ゲル内で培養した。増殖は最も遅かった。口腔粘膜細胞の増殖も遅く、Keratinocyte Culture Mediumでの培養よりE-MEMでの増殖が速い傾向が認められた。骨髄細胞は速やかに増殖した。

## (3) *In vitro*での硬組織形成

ラットの血液由来細胞および口腔粘膜由来細胞を初代培養し、その後、それらを継代培養するにあたって骨誘導因子であるデキサメタゾン+ $\beta$ -グリセロフォスフェイト+アスコルビン酸ナトリウムを培養液中に添加した結果、培養器底にnoduleと思われる固形形成物がわずかに認められた。また、カルシウムの定量によって、血液由来細胞中そして口腔粘膜由来細胞中には硬組織形成に関わる細胞、あるいは、硬組織形成系の細胞に脱分化し得る幹細胞が少数ではあるが存在する可能性を示唆する結果が得られた。それぞれの細胞の継代培養で培養液に添加したインスリン様成長因子-1によるnodule形成は骨髄細胞の培養で顕著に認められた。しかし、粘膜細胞の培養では顕著なnodule形成を認める結果は得られなかった。デキサメタゾン+ $\beta$ -グリセロフォスフェイト+アスコルビン酸ナトリウムの添加による粘膜細胞の培養の結果、カルシウム値が有意に多かったことから培地中に硬組織形成がうかがわれた。しかし、血球系細胞および粘膜細胞から幹細胞への再分化と硬組織形成への誘導を確実にすることは困難であった。なお、培養器内において神経細胞あるいは血管内皮細胞への再分化を示す結果は得られなかった。

## (4) *In vivo*でのハイブリッド担体内における骨形成

インスリン様成長因子-1 およびミゾリピンを皮下注射して得られた血液由来細胞そして口腔粘膜由来細胞を播種したハイブリッド担体で、非投与ラットに由来する血液由来細胞そして口腔粘膜由来細胞を播種した担体の値より有意に多いオステオカルシンの定量結果が得られ、インスリン様成長因子-1 あるいはミゾリピンの効果による担体内での骨形成の促進が推察された。

ヘマトキシリン・エオジンで染色した組織学的検索で二相性担体のスポンジ内に骨形成とともに新生小血管が観察された。しかし、Klüver-Barrera染色で粘膜細胞および血液由来細胞による神経組織の形成は認められなかった。また、インスリン様成長因子-1 あるいはミゾリピンの非投与ラットから得た細胞を播種した担体ではオステオカルシン量は有意に少なかった。組織学的には、担体のスポンジ内に骨形成が認められたが小血管の存在は観察されなかった。鏡検下で観察した所見と染色の結果とが一致しなかったことは、説明できるに至っていない。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

- 1) Hideaki Ikenaga, Masataka Yoshikawa, Ayano Miyamoto, Hitomi Nakama, Ikuo Nishikawa, Satoshi Teramoto, Hiroaki Aso, Nozomi Matsuo, Hiroshi Maeda: Calcified nodule formation *in vitro* using rat mandibular incisor pulp cells. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2018, **11**, 327-337. (査読: 有)  
<http://doi.org/10.4236/jbise.2018.1112027>
- 2) Ayano Miyamoto, Masataka Yoshikawa, Hiroshi Maeda: Hard tissue-forming ability and ultra-micro structure of newly developed sponges as scaffolds made with sodium alginate gel and chondroitin sulfate. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2018, **11**, 289-306. (査読: 有)  
<http://doi.org/10.4236/jbise.2018.1111024>
- 3) Masataka Yoshikawa, Hideyuki Kakigi, Ayano Miyamoto, Sadaomi Sugimoto, Keisuke Nakai, Hideaki Ikenaga, Takeshi Inamoto, Hiroshi Maeda: *In vivo* estimation of osteogenesis by bone marrow cells in a bi-phasic scaffold and in each of its components, *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2016, **9**, 501-514. (査読: 有)  
<http://dx.doi.org/10.4236/jbise.2016.911045>

〔学会発表〕(計 5件)

- 1) 宮本綾乃, 好川正孝, 前田博史: アルギン酸ナトリウムゲルとコンドロイチン硫酸から作製した新規スポンジ担体としての硬組織形成能と超微細構造  
第16回日本再生歯科医学会学術大会・総会 2018年12月1日 名古屋市.
- 2) 宮本綾乃, 好川正孝, 前田博史: コンドロイチン硫酸を含むアルギン酸ナトリウムゲルから作製した新規スポンジの担体としての硬組織形成能の評価.  
日本歯科保存学会 2018年度 秋季学術大会(第149回) 2018年11月2日 京都市.
- 3) 好川正孝, 宮本綾乃, 池永英彰, 寺本賢史, 西川郁夫, 藪内崇督, 前田博史: ラット下顎切歯歯髄由来細胞による石灰化ノデュール形成.

日本歯科保存学会 2018 年度 秋季学術大会 ( 第 149 回 ) 2018 年 11 月 2 日 京都市.

4 ) Yoshikawa M, Kakigi H, Miyamoto A, Yabuuchi T, Maeda H : Osteogenesis by bone marrow cells in a bi-phasic scaffold consisting of cylindrical porous hydroxyapatite and acetalized polyvinyl alcohol sponge.

*International Bone-Tissue-Engineering Conference*, 2017 年 10 月 12 日 Munich, Germany.

5 ) 杉本貞臣, 好川正孝, 宮本綾乃, 藪内崇督, 前田博史 : 多孔質ハイドロキシアパタイトおよびスポンジからなる二相性担体の骨髓細胞による生体内での骨形成.

第 23 回日本歯科医学会総会 2016 年 10 月 22 日 福岡市

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名 : 前田 博史

ローマ字氏名 : ( MAEDA, Hiroshi )

所属研究機関名 : 大阪歯科大学

部局名 : 歯学部

職名 : 教授

研究者番号 ( 8 桁 ) : 00274001

### (2)研究協力者

研究協力者氏名 : 宮本 綾乃

ローマ字氏名 : ( MIYAMOTO, Ayano )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。