

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17223

研究課題名(和文) 抜去歯由来細胞を用いたヒトに応用可能な歯・歯周組織ユニットの再生

研究課題名(英文) Regeneration of the human tooth and periodontal tissue unit using extracted tooth-derived cells.

研究代表者

豊村 順子 (toyomura, junko)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：80645630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：臨床で入手可能な抜去歯由来の細胞を用いて歯・歯周組織ユニットの効率よい再生を目指した。

歯冠形成に用いる最適なマラッセ上皮遺残細胞と歯髄細胞の選定を行った。歯髄細胞の象牙芽細胞への誘導は確認できなかったが、マラッセ上皮遺残細胞のエナメル芽細胞への誘導はグリセロフォスフェートとデキサメタゾンの添加培地で確認できた。歯髄細胞とマラッセ上皮遺残細胞を3次元で共培養したところ、鐘状期の初期のエナメル器にみられる細胞の配列がみられた。しかし、基質形成期エナメル芽細胞様の円柱状の細胞やマラッセ上皮遺残細胞と歯髄細胞の境に象牙芽細胞様の突起の長い細胞は観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床で入手可能な細胞を用いた歯・歯周組織様ユニットの形成はすでに確認しているが、再現性を良くするため細胞の条件検討を行いマラッセ上皮遺残細胞がエナメル質を形成する条件を確認した。この細胞と歯髄細胞を共培養し、歯の発生時にみられる上皮間葉相互作用が確認できれば歯冠形成に使える可能性が高く、生体内で歯冠もしくはさらに歯周組織ユニットを再現性良く形成できた後にはヒトへの応用を目指し培養下での歯・歯周組織ユニットの形成も可能になると考えられる。また、培養下にて歯・歯周組織ユニットの形成が可能になれば、臨床応用が可能になり歯を失った人のQOLを著しく高めることができる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to efficiently regenerate tooth and periodontal tissue unit using clinically available extracted tooth derived cells. We selected the most suitable epithelial cell rests of Malassez (ERM) and dental pulp cell (DPC) to be used for crown formation. The induction of DPC to odontoblasts could not be confirmed, however the induction of ERM to ameloblasts could be confirmed by culture medium supplemented with -glycerophosphate and dexamethasone. Three-dimensional co-culture of DPC and ERM observed an arrangement of cells found in the enamel organs in the early bell stage. However, ameloblast-like columnar cells in the matrix formation stage and with odontoblast-like cells with protrusions were not observed at the boundary between ERM and DPC.

研究分野：再生医療

キーワード：歯の再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

永久歯は一度失うと二度と再生されず、治療方法としては入れ歯やブリッジ、インプラントがある。現在の入れ歯やブリッジは元の歯のようにどんな食べ物でも噛めるわけではなく、また、支える他の歯への負担も大きい。インプラントは、歯根膜がないためクッション作用がなく、また圧力などを感じるセンサーの役割もない。さらに歯周組織への栄養補給もないことや骨に接する粘膜との結合が強くないため天然の歯に比較すると感染に弱いことなどが挙げられている。また、経年的な骨吸収の問題もある。さらに歯槽骨が十分に存在しない場合、そもそもインプラント治療は不可能である。よって、元の歯と同じ機能を取り戻すのは難しいのが現状である。すでに、マウスでは胎生期の歯胚原基を取り出し、上皮細胞と間葉系細胞の2種類の細胞に分けてコラーゲンゲル内に入れ、再生歯胚として体外で再構築し、再生歯胚をマウスの腎皮膜下に移植して再生歯ユニット(歯と支持組織の歯根膜、歯槽骨が一体となっているもの)が作製されている。この再生歯ユニットをマウスの顎骨の中に移植したところ、歯槽骨の再生を伴った再生歯の生着が確認されている。更に機能的な解析では、歯の強度が天然の歯とほぼ同等であることや歯槽骨における骨のリモデリング、再生歯の歯髄・歯根膜に神経線維・血管が侵入し、咀嚼や侵害刺激を中枢へ伝達する能力を有することが確認されている¹⁾。しかし、この歯の再生法を臨床応用するには大きな問題が2つある。1つは、臨床では入手不可能な歯胚原基の細胞を使うこと、もう1つは免疫や感染のリスクを伴う動物への移植を行わなければ、歯の再生を誘導できないという点である。生体内での再生は、血流が酸素・栄養や生理活性物質を補給するため歯の再生に有利な環境である点では優れているが、ホスト動物の細胞が再生歯に混入する可能性を否定できず、免疫や感染のリスクを伴うので、ヒトでこの手法を使うことは難しい。また、ブタマラッセ上皮残遺細胞を歯髄細胞とともに免疫不全動物に移植し、エナメルを形成させたという報告がある²⁾。これはマラッセ上皮残遺細胞がエナメルを形成する能力を維持している証拠であり、歯冠形成にマラッセ上皮残遺細胞と歯髄細胞が有用な細胞源であると考えられる。しかし、この方法では、エナメルと歯髄の位置が逆転して形成されており、正常の歯とは言えない。そこで、生体と一致した構造を得るために、歯髄細胞を入れたアテロコラーゲンビーズにマラッセ上皮残遺細胞を付着させたもの(細胞ビーズ)をスキッドマウスの腹腔内に移植したところ生体に類似した構造の歯冠様構造が形成された。さらに、この細胞ビーズを歯根膜細胞シートでくるみ³⁾同様に移植したところ歯・歯周組織様ユニットも形成された。よって、生体内で、臨床で入手可能な細胞を使い、正常構造の歯周組織を含む歯のユニットの形成を可能にした。しかし、成功率が低いという問題点がある。

2. 研究の目的

臨床的に再生医療の応用に可能な細胞を用い、再現性良く、歯・歯周組織ユニットを作製し、ヒトに臨床応用できる方法を開発する。

臨床で入手可能な細胞は歯髄細胞、マラッセ上皮遺残細胞や歯根膜細胞であることや、この組み合わせで歯・歯周組織様ユニットが形成されることはすでに確認できており、さらに再現性を良くするため、どのような細胞が必要かを検討する。そのため、歯冠形成に用いる歯髄細胞やマラッセ上皮遺残細胞の選定を行う。歯髄細胞は象牙芽細胞に、マラッセ上皮遺残細胞はエナメル芽細胞に分化しやすく、歯髄細胞とマラッセ上皮遺残細胞の相互作用がスムーズに行われるような細胞を選定する。

その細胞を用いて、歯の再生に有用な環境である動物体内で、細胞ビーズを使って歯冠、また、細胞ビーズに歯根膜細胞シートをまき、歯・歯周組織ユニットを再現性良く形成する。更に、ヒトでの応用を目指し、培養下での形成を行う。

3. 研究の方法

(1)細胞の分離

歯髄細胞と歯根膜細胞は、ヒトの抜去歯から採取する。マラッセ上皮遺残細胞は、マラッセ上皮遺残細胞が多く存在し分離しやすいブタの臼歯の歯根膜細胞より分離する。抜去歯の歯根中央部から歯根膜を尖刀でシャーレ内の培養液中に削ぎ落とし静置培養すると、線維芽細胞シートの中にマラッセ上皮遺残細胞コロニーが散在する。ここからマラッセ上皮遺残細胞を濾紙法または筒法を用いてコロニアルクローニングし分離する。

(2)細胞の選定

歯髄細胞が象牙芽細胞に分化しやすい能力をもつ細胞の選定は、骨に分化誘導する培養液(MEMにデキサメタゾンとアスコルビン酸とグリセロフォスフェート)での誘導、または、3次元のほうが2次元より分化に有利な場合がありスフェロイドにすることで誘導されるという報告もある⁴⁾ためスフェロイドで誘導を行う。象牙芽細胞の同定は、象牙芽細胞分化マーカーであるDSPPやDMP-1の発現で評価する。

マラッセ上皮遺残細胞がエナメル芽細胞に分化しやすい能力をもつ細胞の選定は、硬組織形成に必要なグリセロフォスフェートとデキサメタゾンで誘導する。アリザリンレッドS法にてカルシウムの沈着を確認し、エナメル芽細胞の同定は、Ameloblastin・Amelogenin・KLK4・MMP20・enamelinの発現で評価する。

上記の条件で誘導がかからない場合、歯髄細胞とマラッセ上皮遺残細胞を3次元で接着させ共培養し相互作用を確認する。アテロコラーゲン溶液と歯髄細胞を混和した溶液をゲル化してア

テロコラーゲンビーズを作る。このビーズをマラッセ上皮遺残細胞と巡回培養し、ビーズの周囲に細胞を付着させ(細胞ビーズ)共培養する。また、コラーゲンと歯髄細胞を混合しクローニングシリンダー内に入れて固めその上にマラッセ上皮遺残細胞をのせ共培養を行う⁵⁾。細胞の形態変化の確認は、HE染色で評価する。

(3) 生体と一致した構造の歯冠の形成と歯周組織を含む歯のユニットの形成

歯冠形成は、アテロコラーゲン溶液と歯髄細胞を混和した溶液をゲル化しアテロコラーゲンビーズを作り、マラッセ上皮遺残細胞と巡回培養し、ビーズの周囲に細胞を付着させ細胞ビーズを作る。細胞ビーズに使用する細胞は(2)で選んだ細胞を使用する。歯周組織を含む歯のユニットの形成は、歯冠形成時の細胞ビーズを歯根膜細胞シートでまいたものを作る。それぞれをスキッドマウス(免疫不全)の皮下に移植し、28日間飼育した後、摘出する。摘出した組織の細胞分化・形態変化・組織形成を確認するため、 μ CT撮影やHE染色、Cytokeratin・Cytokeratin14・DSP・Ameloblastin・Amelogenin・Enamelinなどの免疫染色で評価する。

また、形成が確認された細胞の組み合わせを用いて還流培養下で培養し、生体外での形成も行う。

4. 研究成果

(1) マラッセ上皮遺残細胞の分離

ブタの抜去歯の歯根中央部から歯根膜を尖刀でシャーレ内の培養液中に削ぎ落とし静置培養したところ、線維芽細胞シートの中に上皮細胞の大小のコロニーが散在した。この上皮細胞を濾紙法にてコロニアルクローニングし分離した(図1)。これをマラッセ上皮遺残細胞として使用した。

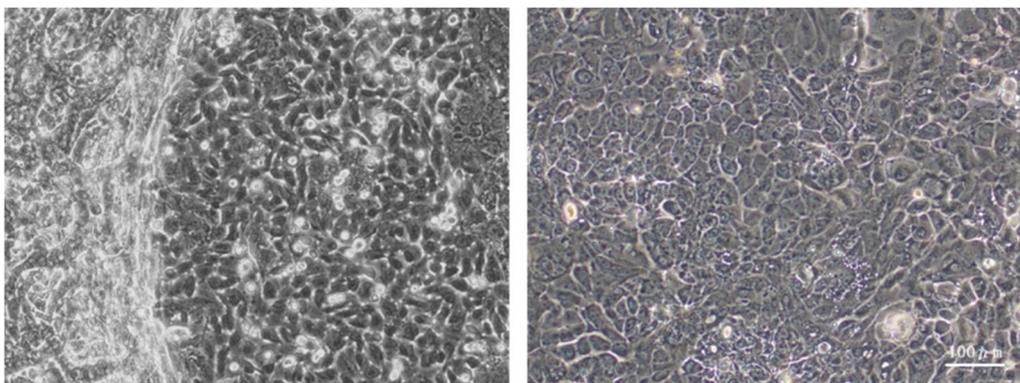


図1. 上皮細胞のコロニー(左)と分離したブタマラッセ上皮遺残細胞(右)

(2) 細胞の選定

歯髄細胞は骨分化誘導培地で石灰化が確認され、アリザリン染色でカルシウムの沈着を確認した(図2)。しかし、象牙芽細胞マーカーであるDSPPやDMP-1の発現に差は見られなかった。

マラッセ上皮遺残細胞は硬組織形成に必要なグリセロフォスフェートとデキサメタゾンで誘導したところ、細胞質内にエナメル小柱様のドットが現れ、更に誘導を続けると培養液中に石灰化物と思われる茶色の塊の浮遊が観察され、中にはシート状のものもあった(図3)。この状態の細胞をアリザリンで染色したところ、カルシウムの沈着を確認した(図4)。誘導でみられた石灰化物が骨分化誘導の時と異なり培養液中に浮いてくるのは、エナメル質がエナメル芽細胞によって細胞外で作られるためだと考えられる。



図2. 歯髄細胞のアリザリン染色

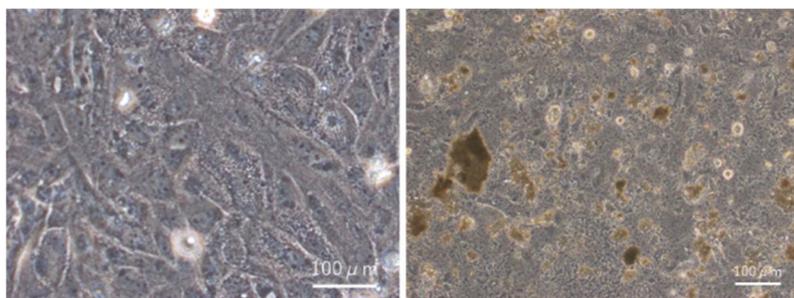


図3. 誘導中のマラッセ上皮遺残細胞

誘導中のマラッセ上皮遺残細胞の中にエナメル小柱様のドット(左)と石灰化物様の塊(右)を確認した。

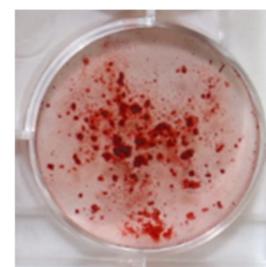


図4. マラッセ上皮遺残細胞のアリザリン染色

さらに、エナメルタンパク (Ameloblastin・Amelogenin・Enamelin) とこれらの分解酵素である MMP20・KLK4 の発現を確認した。Ameloblastin は誘導が進むと減少し、MMP20 と KLK4 は誘導が進むにつれて上昇していた (図 5,6)。これはエナメル質形成がすすむにつれ、エナメルタンパクが KLK4 や MMP20 に分解されることを反映していると考えられる。

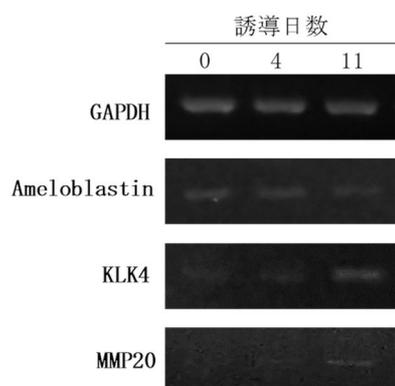


図 5. 誘導したマラッセ上皮遺残細胞の PCR

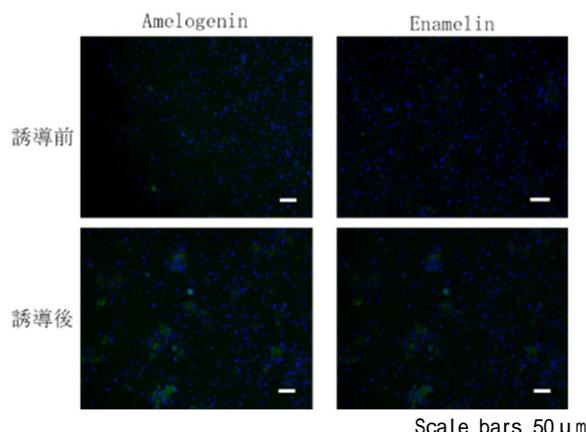


図 6. 誘導したマラッセ上皮遺残細胞の免疫染色

歯髄細胞が象牙芽細胞に分化しやすい能力をもつ細胞の選定ができなかったため、歯髄細胞とマラッセ上皮遺残細胞を 3 次元で共培養し相互作用の確認を行った。細胞ビーズまたはシリンドラ内で作製した 3 次元の構造物を静置または還流培養を行ったところ、マラッセ上皮遺残細胞は立方体にきちんと配列し、その配列した細胞の上に数層の扁平細胞や細胞間隙の多い多形細胞が観察された (図 7)。

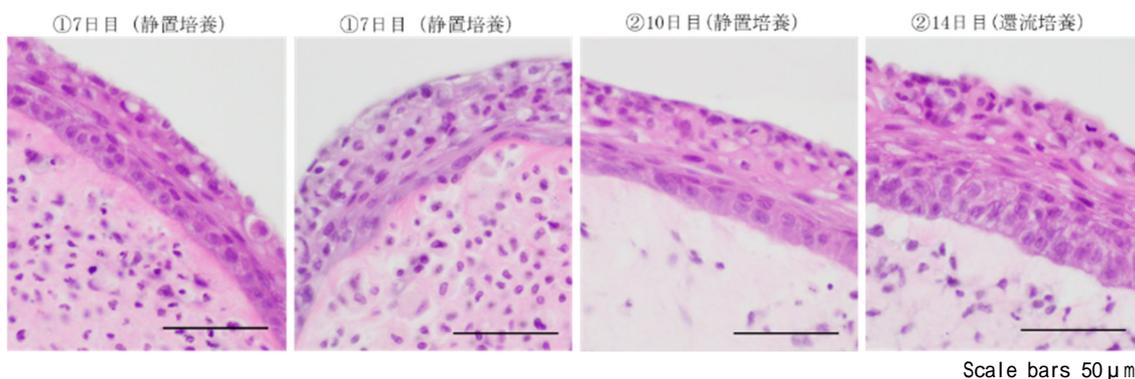


図 7. 細胞ビーズ () またはシリンドラ内 () で作製した 3 次元構造物の HE 染色

しかし、発生時の歯冠形成初期にみられるマラッセ上皮遺残細胞では分泌前期エナメル芽細胞様の円柱状の細胞やマラッセ上皮遺残細胞と歯髄細胞の境に象牙芽細胞様の突起の長い細胞は観察されなかった。今回観察された構造物は、鐘状期の初期のエナメル器にみられる細胞 (整列した細胞 = 内エナメル上皮・扁平な細胞 = 中間層・細胞間隙が広い部分 = 星状網) に類似していた。鐘状期の初期の内エナメル上皮に隣接する部分の歯乳頭細胞は一層に並んで象牙芽細胞となるが、歯髄細胞にその様子は観察されなかった。

今回、歯髄細胞が象牙芽細胞に分化しやすい能力をもつ細胞の選定はできなかったが、マラッセ上皮遺残細胞と歯髄細胞を共培養することで、内エナメル上皮に隣接する部分に歯髄細胞が一層に並んで、さらに象牙芽細胞様な長い突起の細胞やエナメル芽細胞様の円柱状の細胞が見られれば、相互作用が起きているのはあきらかであり、その細胞は歯冠形成に使える細胞である可能性が高い。相互作用がおきるものとそうでない細胞をトランスクリプトーム解析等でのような細胞が探索できれば、象牙芽細胞になりやすい細胞がどのような細胞が分かるかもしれない。さらに上記の相互作用を確認できた細胞の組み合わせを歯の再生に有用な環境である動物体内で歯冠もしくは歯根膜細胞も用いて歯周組織ユニットを再現性良く形成できれば、ヒトへの応用を目指し培養下での歯・歯周組織ユニットの形成も可能になると考えられる。

<引用文献>

- 1) Oshima M et al. PLOS ONE. Volume6. Issue7. e21531.2011
- 2) Shinmura Y et al. J. Cell Physiol. 217: 728-738,2008
- 3) 中原 貴 et al.日本歯科評論. Vol.72(4). 9-11.2012
- 4) Yamamoto M et al. Arch Oral Biol. 2014 Mar;59(3):310-7
- 5) Notani T et al. Arch Histol Cytol. 2009;72(3):187-98

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----