

平成21年 5月25日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592282

研究課題名 (和文) 脂肪組織から分離した間葉系幹細胞と低結晶性炭酸アパタイトを用いた歯再生医療の開発

研究課題名 (英文) Development of tooth regenerative therapy using the low crystalline carbonate apatite and mesenchymal stem cells derived from adipose tissue.

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：本研究では、ヒト脂肪組織由来幹細胞と低結晶性炭酸アパタイトを用いた歯再生医療の開発を試みた。脂肪組織由来幹細胞は骨、軟骨、脂肪への分化が可能であり、多分化能を有していた。焼結操作なしに作製した低結晶性炭酸アパタイトは生体内で吸収し、骨髄細胞の骨芽細胞への分化を促進した。われわれが樹立したマウスエナメル芽細胞株は生体内でエナメル器様組織、骨様組織を形成し、マウス象牙芽細胞株は NGF により分化が促進され、生体内で石灰化した歯胚様組織を形成した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
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，歯学，歯の再生医療，間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞を用いた再生医療の研究が進み、失われた組織や臓器を取り戻すことも可能になりつつある。歯の再生医療に関する研究も国内外で活発に行われるようになってきたが、これらの研究はブタやマウスの歯胚由来の細胞 (Honda MJ, et al.: Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol*, 2005., Nakao K, et al.: The development of a bioengineered organ germ method. *Nature Methods*, 2007.) や歯髄由来の細胞を用いており (Gronthos S, et al.: Stem cell properties of human dental pulp

stem cells. *J Dent Res*, 2002.), 臨床応用を考えると、ヒトの成体細胞ではないことや、利用できる細胞数に厳しい制限があることが問題となる。そのため、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。

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、生体内吸収性で硬組織伝導性を持った生体材料が不可欠である。

そこで、本研究では、歯再生の細胞源として脂肪組織由来幹細胞を、歯再生用 scaffold として低結晶性炭酸アパタイトを用いて新しい歯の再生医療を開発しようと考えた。

2. 研究の目的

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。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。われわれは、間葉系幹細胞を用いた再生医療を目指し、ヒト骨髄から間葉系幹細胞を分離、培養して研究を行ってきた。しかしながら、骨髄由来間葉系幹細胞は骨髄中に含まれる数が少なく、増殖能も低い。また、継代培養によって分化能は明らかに低下する。最近、脂肪組織内にも多能性幹細胞が存在することが証明され、骨、軟骨、脂肪、筋肉などへ分化誘導できることが示された。この幹細胞は成熟脂肪細胞に接して存在し、さらに脂肪組織内の結合組織にも多数存在する。脂肪組織由来幹細胞は、骨髄由来の間葉系幹細胞に比べて組織に含まれる数が多く、増殖能も高いといわれている。また、脂肪組織は皮膚あるいは粘膜の直下に存在するため、局所麻酔で比較的容易に採取でき、実際に臨床応用する場合には、患者の負担は確実に軽減される。これらを考慮すると、脂肪組織由来幹細胞を再生医療に用いるメリットは大きい。本研究では、脂肪組織から分離、培養した間葉系幹細胞を用いた歯の再生を目指した。

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。この問題を解決するためには、生体内吸収性で骨伝導性を持った生体材料が不可欠である。われわれは、焼結操作なしに低結晶性炭酸アパタイト (CAP) を作製することに成功し、この低結晶性 CAP が生体内で吸収されて骨に置換されること (Application of carbonate apatite to bone reconstruction: fabrication and histological evaluation of low crystalline carbonate apatite. *Arch BioCeramics Research*, 5, 75-78, 2005) を明らかにした。本研究では、低結晶性 CAP 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、生体吸収性の低結晶性 CAP を応用した新しい歯再生用 scaffold の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の特性
ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) の形態と増殖能を、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) と比較検討した。

(2) ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の分化能

ヒト脂肪組織由来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。

① 骨芽細胞への分化誘導

細胞を骨分化誘導培地で 21 日間培養し、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、オステオカルシンなど) の発現を調べた。

② 軟骨細胞への分化誘導

細胞を軟骨分化誘導培地で 10 日間培養し、アルシアンブルー染色により軟骨基質産生能を、RT-PCR 法により軟骨細胞分化マーカー遺伝子 (II 型コラーゲン、X 型コラーゲン、アグリカン、シンデカンなど) の発現を調べた。

③ 脂肪細胞への分化誘導

細胞を脂肪分化誘導培地で 72 時間培養後、脂肪維持培地で 24 時間培養した。このサイクルを 3 回繰り返し、最後に脂肪維持培地で 7 日間培養し、オイルレッド O 染色により脂肪滴形成能を、RT-PCR 法により脂肪細胞分化マーカー遺伝子 (C/EBP α , PPAR γ , aP2 など) の発現を調べた。

(3) 低結晶性 CAP の作製

水酸化カルシウムの粉末をステンレス製のモールド内に入れて、2MPa で加圧し、直径 10 mm、厚さ 2 mm のディスク状の水酸化カルシウムを作製し、この水酸化カルシウムディスクを炭酸ガス中に室温で 3 日間静置して炭酸化して、炭酸カルシウム硬化体を作製した。さらに、この炭酸カルシウム硬化体を 60°C のリン酸水素 2 ナトリウム溶液中に 14 日間、浸漬してリン酸化し、炭酸アパタイト硬化体を作製した。

この高温での焼結過程なしで作製した硬化体の物性を、粉末 X 線回折解析、フーリエ変換赤外分光光度計分析、ダイアメトラル引張強度試験を行って解析した。

(4) 低結晶性炭酸アパタイトのヒト骨髄細胞の分化に与える影響

高温での焼結過程なしに作製した低結晶性炭酸アパタイトが、ヒト骨髄細胞の接着、増殖および骨芽細胞への分化に与える影響について、ハイドロキシアパタイトと比較検討した。細胞の接着および増殖については MTT assay にて評価し、骨芽細胞への分化は RT-PCR 法により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, オステオカルシンなど) の発現を調べた。

(5) マウス象牙芽細胞株 (OLC) の分化

当教室でマウス歯胚から分離した象牙芽細胞株 (OLC) を, Nerve Growth Factor (NGF; 50 ng/ml, 100 ng/ml) で刺激し, アリザリンレッド染色で石灰化能を, RT-PCR 法により象牙芽細胞分化マーカー遺伝子 (デンティンシアロフォスフォプロテイン, デンティンマトリックスプロテイン-1) の発現を調べた。

(6) マウス歯原性細胞株の *in vivo* での異所性歯形成能

当教室で, 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) ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の特性

① 形態: ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) はヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) と似た紡錘形の線維芽細胞様の形態であったが, その大きさは直径が約 30 μm であり, ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) よりもやや大きかった。

② 増殖能: ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) の倍加時間は約 40 時間であり, ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) と同等であった。

(2) ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の分化能

ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) を骨, 軟骨, 脂肪の分化誘導培地で培養すると, 各分化マーカーの発現が増強し, それぞれ石灰化, 軟骨基質の産生, 脂肪滴の形成が確認され, 多分化能を有していることが明らかとなった。

(3) 低結晶性炭酸アパタイトの作製

① 粉末 X 線回折解析では, 作製した硬化体にアパタイトのピークが確認された。ピークの重なりからアパタイトの結晶性が低いことが明らかとなった。

② FT-IR 解析では, 吸収ピークが 1450, 1410, 875 cm^{-1} に観察され, このアパタイトが B 型炭酸アパタイトであることが明らかとなった。

③ 炭酸イオンの含有量は 15.5 wt%, ダイアメトラル引張強度は 5.55 MPa であった。

(4) 低結晶性炭酸アパタイトのヒト骨髄細胞の分化に与える影響

① 細胞接着: 低結晶性炭酸アパタイトに接着した細胞は培養皿より少なかったが, ハイドロキシアパタイトとは差がなかった。

② 細胞増殖: ハイドロキシアパタイトと比べると, 低結晶性炭酸アパタイト上で培養した骨髄細胞は, 培養 7 日目までは増殖能が低かったが, 10 日目では有意差は認められなかった。

③ 骨芽細胞への分化: 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上で培養した細胞では, 培養皿と比べて, オステオポンチン, オステオカルシンの発現が上昇した。I 型コラーゲンとアルカリフォスファターゼの発現には明らかな上昇はなかった。

(5) マウス象牙芽細胞株の分化

当教室でマウス歯胚から分離した象牙芽細胞株 (OLC) は, Nerve Growth Factor 刺激により, 石灰化が亢進し, 象牙芽細胞分化マーカー遺伝子 (デンティンシアロフォスフォプロテイン, デンティンマトリックスプロテイン-1) の発現が上昇した。

(6) マウス歯原性細胞株の *in vivo* での異所性歯形成能の検討

① 当教室で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。移植したエナメル芽細胞は, 6 週後にヌードマウスの皮下で結節を形成した。結節の内部には, エナメル芽細胞のマーカー蛋白であるアメロジェニン染色陽性を示し, エナメル器に類似した細胞塊が観察された。移植後 20 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。移植後 40 週では, 移植片の硬化性と X 線不透過性が亢進した。

② 胎生 14.5 日のマウス歯胚から分離した歯原性上皮と OLC をペレット状にして, 同系マウスの腎被膜下に移植した。移植した象牙芽細胞は, 2 週間後には, 60 匹中 19 匹で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 2 件)

- ① Arany S, Kawagoe M, Sugiyama T. Application of spontaneously immortalized odontoblast cells in tooth regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Mar 27; 381(1): 84-89.
- ② Arany S, Koyota S, Sugiyama T. Nerve growth factor promotes differentiation of odontoblast-like cells. *J Cell Biochem*. 2009 Mar 1; 106(4): 539-545.

〔学会発表〕(計 6件)

- ① 中田 憲, 永井宏和, 伊藤 悠, 高野裕史, 福田雅幸, 宮本洋二. 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石灰化. 第53回日本口腔外科学会総会・学術大会 2008年10月20日(徳島)
- ② Nakata A., Nagai H., Iwanami Y., Takano H., Fukuda M., Miyamoto Y. Development of regeneration therapy for the tooth using cell lines derived from tooth germ: transplantation of ameloblast-lineage cells into subcutaneous tissue of the nude mouse. 89th American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Annual Meeting, Scientific Sessions and Exhibition in conjunction with the Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons and the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. October 11-13, 2007 (Honolulu)
- ③ 中田 憲, 永井宏和, 岩波洋一, 高野裕史, 福田雅幸, 宮本洋二. 歯由来細胞株を用いた歯の再生医療の開発:ヌードマウス皮下へのエナメル芽細胞の移植. 第52回日本口腔外科学会総会・学術大会 2007年9月29日(名古屋)
- ④ 宮本洋二, 館原誠晃, 湯浅哲也, 桃田幸弘, 藤澤健司, 中田 憲, 高野裕史, 永井宏和, 福田雅幸. 低結晶性炭酸アパタイトの骨補填材への応用に関する研究. 第9回日本口腔顎顔面外傷学会総会・学術大会 2007年7月28日(名古屋)
- ⑤ 中田 憲, 永井宏和, 岩波洋一, 高野裕史, 福田雅幸, 宮本洋二. 歯由来細胞株を用いた歯の再生医療の開発 第2報:象牙芽細胞株の樹立とハイドロキシアパタイトのスキヤホールドとしての有用性. 第61回日本口腔科学会総会・学術集会 2007年4月19日(神戸)
- ⑥ 福田雅幸, 宮本洋二, 岩波洋一, 中田 憲, 高野裕史, 永井宏和, 桃田幸弘, 武知正晃. 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:生体内での吸収機転の解明. 第61回日本口腔科学会総会・学術集会 2007年4月20日(神戸)

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: 50400510

石川 邦夫 (ISHIKAWA KUNIO)
九州大学・大学院歯学研究部・教授
研究者番号: 90202952

福田 雅幸 (FUKUDA MASAYUKI)
秋田大学・医学部・准教授
研究者番号: 20272049

高野 裕史 (TAKANO HIROSHI)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号: 30282172

岩波 洋一 (IWANAMI YOUICHI)
秋田大学・医学部・医員
研究者番号: 90400514

(3) 連携研究者

杉山 俊博 (SUGIYAMA TOSHIHIRO)
秋田大学・医学部・教授
研究者番号: 50400510

石川 邦夫 (ISHIKAWA KUNIO)
九州大学・大学院歯学研究部・教授
研究者番号: 90202952

福田 雅幸 (FUKUDA MASAYUKI)
秋田大学・医学部・准教授
研究者番号: 20272049

高野 裕史 (TAKANO HIROSHI)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号: 30282172