

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（A）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19689038  
 研究課題名（和文） 歯髄幹細胞と歯根膜幹細胞を用いた機能的歯根再生の実現  
 研究課題名（英文） Functional Tooth Root Regeneration with Dental Pulp Stem Cells and Periodontal Ligament Stem Cells  
 研究代表者  
 園山 亘（SONOYAMA WATARU）  
 岡山大学・岡山大学病院・助教  
 研究者番号：40325121

研究成果の概要（和文）：大型実験用動物であるイヌの歯から組織幹細胞である歯髄幹細胞と歯根膜幹細胞を分離し、これらの細胞が免疫不全マウスへの移植実験で、それぞれ硬組織を形成する能力を有していることを確認した。ヒトのエナメル質形成細胞の成熟は、周囲に存在する間葉細胞が制御していることを証明した。高脂血症治療薬であるスタチンは、歯髄幹細胞の増殖や分化を制御することで象牙質の形成を促進し、歯科治療薬として応用しうることを示した。

研究成果の概要（英文）：Dental pulp stem cells and periodontal ligament stem cells were successfully isolated from extracted teeth of experimental beagle dogs. These cells were confirmed to regenerate mineralized tissue when transplanted into immunocompromised mice. It was shown that surrounding mesenchymal cells regulates maturation of human ameloblastic cells. It was proved that simvastatin is possibly used as pulp capping agent that enhances reparative dentinogenesis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
総計	20,500,000	6,150,000	26,650,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯科・補綴系歯学

キーワード：組織再生、組織幹細胞、歯根

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 人工再生歯根について

自己の細胞を用いた歯の機能再生は、歯冠部を構成するエナメル質形成細胞が分離されていないことから、歯全体としての再生はまだまだ現実的なものとはなっていない。

い。そのような中、2006年に象牙質・歯髄を形成する細胞とセメント質・歯根膜を用いて、組織工学的的手法により歯根のみを再生することをブタで行った報告がなされた。本手法は、組織工学的に作成した人工再生歯根上に、既存の歯科補綴学的手法で作製

した歯冠部を装着するもので、その時点で実現可能な歯の機能回復法として注目を集めた。しかしながら、本手法は限られたサンプル数のみの報告であることに加え、歯根膜機能を含む機能回復を長期的には評価できておらず、課題として残されていた。

#### (2) ヒトのエナメル質形成細胞について

歯を構成する成分のうち、象牙質やセメント質を形成する細胞はヒトにおいてもすでに分離・報告されている。しかしながら、歯冠部を構成するエナメル質を形成する細胞はヒトにおいてははまだ分離されていない。そのため、培養レベルでエナメル芽細胞やエナメル芽細胞前駆細胞を分離し、その分化メカニズムを解明することが期待されていた。

#### (3) 象牙質形成促進作用を持つ薬剤について

分化・増殖因子を用いて象牙質を形成する細胞を活性化し、修復象牙質形成を促進しようとする試みはこれまでも数多く行われてきた。BMPに代表されるように、その中には高い象牙質形成促進作用が報告されているものもあるが、その生産コストや生体に適応した際の安全性が問題となり、臨床に応用されるには至っていない。そのため、より安価で安全な象牙質形成促進剤の開発が期待されていた。

## 2. 研究の目的

### (1) 人工再生歯根について

ミニブタにおいて報告された組織工学的な人工再生歯根の作製を、イヌにおいて実施し、長期的な機能評価を行うことを目的とした。また、それに先立って、成犬から象牙質形成細胞と歯根膜形成細胞を分離・培養することを目的とした。

### (2) ヒトのエナメル質形成細胞について

ヒトの組織から、エナメル芽細胞、もしくはその前駆細胞を分離すること、ならびにその分化を制御するメカニズムを検討することを目的とした。

### (3) 象牙質形成促進作用を持つ薬剤について

骨形成に促進的に作用する高脂血症治療薬であるスタチンの象牙質形成細胞に与える影響はいまだ明らかとなっていない。

そこで、象牙質形成能を有することで知られている歯髄幹細胞 (Dental Pulp Stem Cells; DPSCs) をヒトから分離し、代表的なスタチンであるシンバスタチンが本細胞の

細胞動態へ与える影響を *in vitro*、*in vivo* で検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本報告書に記載の実験は、すべて本学倫理委員会ならびに動物実験管理委員会の許可を受けて行った

### (1) 人工再生歯根について

#### ① ビーグル成犬抜去歯からの細胞の分離と組織形成能の評価

用いる動物は基礎生物学分野で汎用されているビーグル犬とした。ビーグル成犬から全身麻酔下で下顎小白歯を抜去し、歯髄組織と歯根膜組織を採取した。採取した歯髄組織と歯根膜組織を細片化の後、酵素処理によって単一細胞化を行い、各種の培地で培養を行い、その後の細胞の出現と増殖を評価した。

分離した細胞の *in vitro* での石灰化能は、デキサメタゾンと  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を含む石灰化誘導培地で長期培養することで評価した。 *in vivo* での硬組織形成能はキャリアと共に免疫不全マウス背部皮下へ移植し、組織学的に評価した。

#### ② 歯根型スキャホードの選択

イヌから分離した細胞を、イヌ顎骨に移植する際のキャリアと歯根型付与のためのスキャホードを兼ねる材料を検索した。歯根型とするための賦形性と、埋入時の強度、生体親和性の観点から市販の各種材料を検討した。

#### ③ 移植モデルの開発と評価

選択したスキャホードを歯根形態に調整し、歯髄から分離した細胞を含む培地中に浸漬のうえ転倒混和することで、スキャホード中に細胞を取り込ませた。さらに、歯根膜細胞を温度感受性培養ディッシュ上で培養した後、細胞シートを作製し、上記の歯髄細胞を取り込んだ歯根型スキャホードを多層に被覆した。

細胞分離のために下顎小白歯抜去を行ったビーグル成犬の抜去後の顎骨の治癒が得られたことを確認し、顎骨に歯科用ドリルで移植窩洞を形成した。それぞれの顎骨の近心部には内部に歯髄細胞を取り込ませた歯根型スキャホードを移植、遠心部には内部に歯髄細胞を取り込ませた歯根型スキャホード表面を歯根膜細胞シートで被覆したものを移植した。

移植体の評価は、移植後、経時的にレントゲン撮影を行うことと、12週後に灌流固定のうえに屠殺し、顎骨ごととサンプリングしたも

のを組織学的に評価した。

なお、本移植実験は免疫学的な拒絶の可能性を排除するため、細胞はイヌの個体別に培養し、細胞を分離した個体と同一の個体に細胞を移植する自家細胞移植とした。

#### (2) ヒトのエナメル質形成細胞について

ヒトの歯の発生学的観点から、歯冠形成期の歯小囊組織には、エナメル芽細胞とエナメル芽細胞前駆細胞が含まれている。そこで、歯冠形成期にあるヒト抜去歯に付随する歯小囊組織から、上皮細胞を分離・培養し、その遺伝子発現プロファイルや増殖特性を検討した。同時に、初期のエナメル芽細胞メーカー遺伝子であるアメロゲニンを指標として、その上皮細胞の分化に与える間葉細胞の影響を検討した。

#### (3) 象牙質形成促進作用を持つ薬剤について

ヒト DPSCs を分離・培養し、以下の項目に対するスタチンの効果を検討した。

- ① *in vitro* 解析 (細胞数解析、細胞周期解析、象牙芽細胞分化関連遺伝子発現)
- ② *in vivo* 解析 (免疫不全マウスへの細胞移植実験)

### 4. 研究成果

#### (1) 人工再生歯根について

##### ① ビーグル成犬抜去歯からの細胞の分離と組織形成能の評価

ビーグル成犬下顎小白歯の歯髄並びに歯根膜からはコロニーを形成する線維芽細胞用形態を示す細胞が分離できた。数種の組成の培地での細胞増殖を評価したところ、15% ウシ胎児血清を含む  $\alpha$  MEMでの培養が適切であった。しかし、歯根膜細胞の培養効率は、歯髄細胞と比較して良くなく、分離手技、培養手法の改良が課題として残されている。

*in vitro*での石灰化誘導を試みたが、ディッシュからの細胞層の剥離が起こり困難であった。コラーゲンコート等で細胞の接着を増強させることでもこの剥離は抑制できず、適切な評価を行うことは困難であった。

そこで、免疫不全マウス背部皮下へキャリアと共に細胞を移植することで、*in vivo*での組織形成能を評価した。キャリアとしては、ハイドロキシアパタイト (HA) と  $\beta$  型第三リン酸カルシウム ( $\beta$  TCP) 顆粒を用いた。移植から8週後に摘出し、パラフィン切片を作成、組織学的に評価したところ、歯髄細胞、歯根膜細胞とともに硬組織形成能を有していることを確認した。また、HAよりも $\beta$ TCP

の方が硬組織形成は量的に良好であった。なお、ヒト抜去歯から分離した歯髄細胞と異なり、形成された硬組織は骨様の層板状構造を呈している部分があった。また、ヒト歯髄細胞の移植では基本的に認められない脂肪髄が確認された。この差異が、動物種によるものか、培養過程によるものか、用いたキャリアの材質によるものか、今後の検討課題である。

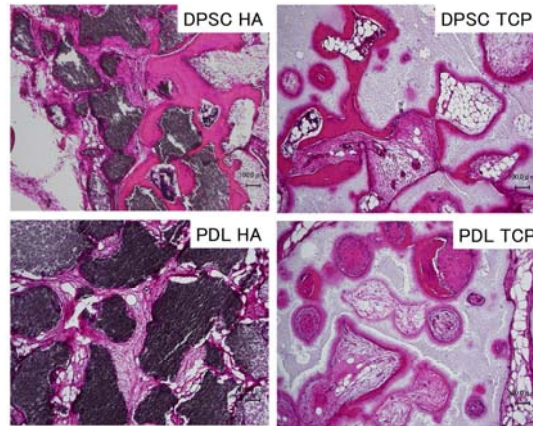


図1: イヌ抜去歯から分離したDPSCsとPDLSCsを免疫不全マウスへ移植8週後の組織像 (カルシウムキャリア周囲の硬組織形成が確認できる。)

#### ② 歯根型スキャホードの選択

スキャフォールドの材料として、賦形性と強度、生体親和性から  $\beta$  TCP (商品名オスフェリオン) とHA (商品名ネオボーン) を使用した。両者ともにトレフィンバーによる事前の調整で、ほぼ統一された規格の円柱状の形態とすることができた。 $\beta$  TCPはHAと比較すると機械的強度が低く、移植窩への挿入時に形態が崩壊する危険性があること、崩壊した場合には早期に吸収が生じることを確認した。

#### ③ 移植モデルの開発と評価

移植部位の解剖学的特徴から用いる歯根型スキャホードは長さ8ミリ、直径4ミリの円柱状とした。選択した  $\beta$  TCPとHAのブロック体をこの形態に調整し、前述の方法でイヌの顎骨に移植した。以下に得られた所見を列記する。

- ・  $\beta$  TCPは機械的強度が低いことから、移植窩洞への挿入時に圧力がかかると崩壊することがある。この場合、レントゲンの8週で  $\beta$  TCPはイヌ顎骨内に確認できなくなり、硬組織形成も確認できなかった。

- ・ 移植窩洞を少し大きめに形成し、挿入時の圧力を減らすことで崩壊を防ぐことができ、この場合の  $\beta$  TCPの早期の吸収はなく、移植後12週までレントゲンの  $\beta$  TCPを確認するこ

とができた。しかし、この場合でも明らかな硬組織形成像は確認できなかった。

- ・HAは強度的に問題なく、移植時のハンドリングは良い。しかし、移植後12週までのレントゲンを用いた経時的な観察では、明らかな硬組織形成像は確認できなかった。

- ・組織学的な評価のため脱灰操作を行ったが、予想以上に期間を要し、3か月以上必要であった。現在は、クエン酸・蟻酸脱灰液を使用しているが、より脱灰効率の良い脱灰液を検索する必要がある。そのため、今後は非脱灰切片を作製することとしている。

- ・イヌ顎骨へ移植した人工再生歯根の経時的な評価にはレントゲン写真が現時点では唯一の方法である。イヌの解剖学的特徴から第一小臼歯部の撮影は困難なことから、第二小臼歯部よりも後方への移植、埋植が適切である。

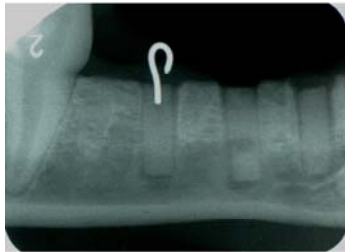


図2：ビーグル成犬下顎骨に移植した歯根型スキャホードのレントゲン像

(2) ヒトのエナメル質形成細胞について

歯小囊組織からは典型的な上皮細胞の形態を持ち、上皮細胞マーカーであるサイトケラチンと、初期のエナメル芽細胞マーカーであるアメロゲニン遺伝子を発現している細胞が得られた。コントロールとして使用した歯肉上皮細胞は、アメロゲニン陰性で、歯小囊上皮細胞と比較しても分裂可能回数が少ないものであった。また、歯小囊上皮細胞におけるアメロゲニン遺伝子の発現は、歯乳頭間葉細胞と混合共培養することで強く促進された。この遺伝子発現促進効果、すなわち分化促進効果は、チャンバーを利用した分離共培養では認めないことから、歯小囊上皮細胞と間葉細胞の直接的な接触を介して行われていると推測された。また、歯小囊上皮細胞と常に接している歯小囊間葉細胞の分化促進効果は、歯乳頭間葉細胞と比較してたいへん低く、本上皮細胞の分化は周囲の間葉細胞によって巧妙に制御されていることが明らかとなった。

今後は、本上皮細胞の分化を制御するメカニズムをさらに詳細に解析するとともに、エナメル質再生への応用可能性を検討する予定である。

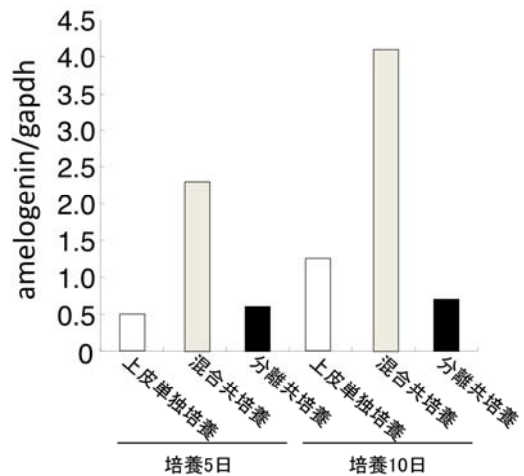


図3：ヒトから得た歯小囊組織から分離した上皮細胞におけるアメロゲニン遺伝子の発現（歯小囊間葉細胞と混合して共培養すると本上皮細胞におけるアメロゲニン遺伝子の発現は促進された。）

(3) 象牙質形成促進作用を持つ薬剤について

スタチンを 1 mM の濃度で作用させると、アポトーシスを誘導することなく、DPSCs の増殖は抑制された。この効果は、スタチンがメバロン酸-Rho 経路を介して、細胞周期を制御することによるものであることを確認した。また同濃度のスタチンは *in vitro* で、dentin sialophosphoprotein (*dspp*) とオステオカルシン (*ocn*) の遺伝子発現を強力に促進した。

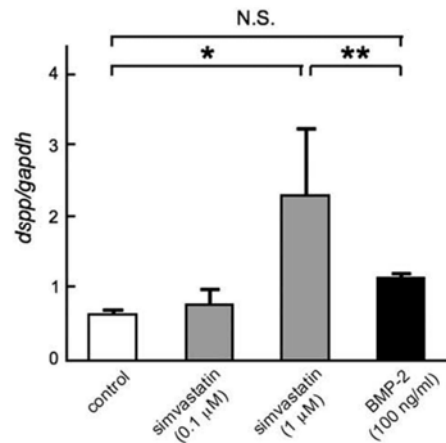


図4：ヒト DPSCs にスタチンを作用させた際の *dspp* 遺伝子の発現（1 μM のスタチンを作用させると発現レベルは有意に促進され、その効果は BMP-2 よりも大変強力なものであった。）

免疫不全マウスへの細胞移植実験では、強い硬組織形成促進能を有していることを確認した。この効果は象牙質形成促進効果

を有していることが知られている BMP-2 と同等か、さらに強力なものであった。安価で安全性の確認されているスタチンが象牙質形成促進効果を有するならば、生物学的に象牙質形成を促進する新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。

## 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 3 件)

- ① Y. Okamoto, W. Sonoyama, M. Ono, K. Akiyama, T. Fujisawa, M. Oshima, Y. Tsuchimoto, Y. Matsuka, T. Yasuda, S. Shi, T. Kuboki. Simvastatin induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Journal of Endodontics*, 35(3), 367-372, 2009 (査読あり)
- ② G. T. J. Huang, W. Sonoyama, Y. Liu, L. He, S. Wang, S. Shi. The Hidden Treasure in Apical Papilla: Potential Role in Pulp/Dentin Regeneration and BioRoot Engineering. *Journal of Endodontics*, 34(6), 645-651, 2008 (査読あり)
- ③ W. Sonoyama, Y. Liu, T. Yamaza, R. S. Tuan, S. Wang, S. Shi, G. T. J. Huang. Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth - A Pilot Study. *Journal of Endodontics*, 34(2), 166-171, 2008 (査読あり)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 園山 亘. 組織再生による口腔機能の再生. 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻主催ミニ・シンポジウム 2009年8月11日(岡山)
- ② 岡本洋介, 園山 亘, 大野充昭, 秋山謙太郎, 藤澤拓生, 大島正充, 土本洋平, 松香芳三, 窪木拓男. シンバスタチンによるヒト歯髄幹細胞の増殖制御と硬組織形成促進. 社団法人日本補綴歯科学会 第 118 回学術大会 2009年6月6日(京都)
- ③ Y. Tsuchimoto, W. Sonoyama, S. Shinkawa, Y. Okamoto, M. Oshima, M. Ueda, Y. Oida, Y. Matsuka, T. Kuboki. Characterization of putative amelogenic cells isolated from human dental follicle. 6th Biennial Congress of Asian Academy of Prosthodontics. 2009年4月25日(Seoul, Korea)

- ④ 園山 亘, 窪木拓男. 組織幹細胞の制御による組織再生 -歯の機能の回復と維持に向けて-. 歯と顔の発生・再生シンポジウム. 2009年3月27日(岡山)
- ⑤ Y. Okamoto, W. Sonoyama, M. Ono, K. Akiyama, T. Fujisawa, M. Oshima, Y. Tsuchimoto, Y. Matsuka, T. Yasuda, S. Shi, T. Kuboki. Simvastatin Enhances Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. 第 56 回 JADR 総会・学術大会. 2008年11月29日(名古屋)
- ⑥ 園山 亘. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. 第 29 回岡山歯学会総会・学術大会. 2008年11月24日(岡山)
- ⑦ 園山 亘, 窪木拓男. 組織幹細胞による組織再生 再生歯科医療はQOL向上に貢献できるか? 口腔からQOL向上を目指す連携研究 再生工学カテゴリー第一回研究集会. 2008年9月10日(広島)
- ⑧ Y. Tsuchimoto, W. Sonoyama, Y. Okamoto, M. Oshima, Y. Matsuka, T. Kuboki. Characterization of putative amelogenic cells isolated from human dental follicle. 86th General Session & Exhibition of the IADR. 2008年7月3日(Toronto, Ontario, Canada)
- ⑨ Y. Okamoto, M. Ono, W. Sonoyama, T. Fujisawa, M. Oshima, Y. Tsuchimoto, T. Yasuda, Y. Matsuka, T. Kuboki. Simvastatin enhances differentiation of human dental pulp stem cells. 6th ISSCR Annual Meeting. 2008年6月12日(Philadelphia, PA, USA)
- ⑩ 岡本洋介, 大野充昭, 藤澤拓生, 大島正充, 土本洋平, 松香芳三, 保田立二, 園山 亘, 窪木拓男. HMG-CoA 還元酵素阻害薬スタチンによるヒト歯髄幹細胞の増殖と分化の制御. 第 7 回日本再生医療学会総会. 2008年3月14日(名古屋)
- ⑪ 園山 亘. 口腔組織の再生医療へ向けた複合的アプローチ. 第 5 回産学連携フォーラム(歯科再生医療産学連携会議). 2008年3月14日(名古屋)
- ⑫ 園山 亘. ヒト抜去歯からの新規の組織幹細胞の同定とその応用による機能的歯根再生. 第 7 回日本再生医療学会総会. 2008年3月14日(名古屋)
- ⑬ 園山 亘, 窪木拓男, Songtao Shi. 根未完成歯における新規間葉系幹細胞の同定とその応用による歯根再生. ニューフロンティア補綴学リサーチカンファレンス 2007. 2007年12月16日(小倉)

⑭ W. Sonoyama, T. Fujisawa, Y. Okamoto, J. Uehara, Y. Matsuka, M. Takigawa, T. Kuboki. Effects of IL-1b and LPS on CCN2/CTGF expression in mouse odontoblastic cells, MDPC-23. 第1回日本CCNファミリー研究会. 2007年10月27日(岡山)

⑮ 大野充昭, 岡本洋介, 藤澤拓生, 園山 亘, 窪木拓男. HMG-CoA還元酵素阻害薬スタチンが歯髄幹細胞に与える影響. 第116回日本補綴歯科学会学術大会. 2007年5月18日(神戸)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

① 発明の名称: 象牙質形成促進剤および象牙質形成覆髄材. 発明者: 窪木拓男, 大野充昭, 園山 亘, 藤澤拓生, 下野賢吾, 大島正充, 岡本洋介. 国際特許出願PCT/JP2008/56008 (2008年3月28日)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

園山 亘 (SONOYAMA WATARU)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号: 40325121