

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592315

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞を用いた歯周組織再生の可能性

研究課題名(英文) Possibility of periodontal regeneration using dental pulp stem cells

研究代表者

五味 一博(GOMI KAZUHIRO)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：10178460

研究成果の概要(和文): 本研究の目的は抜歯することなく採取できる歯髄中に含まれる、歯髄幹細胞の歯髄内での局在と、FGF 添加培地での幹細胞の増殖および表面抗原の発現状態を調べる。また、培養した歯髄幹細胞をヌードラットに形成した人工歯周骨欠損内に移植した場合、形成される組織について組織学的に検索することを目的とした。その結果、(1) 歯髄中に存在する細胞増殖活性が高い歯髄幹細胞と思われる細胞は歯冠部歯髄の中央部に存在していた。(2) FGF により増幅培養した細胞の表面抗原は CD34 および CD45 はネガティブであり、CD44 および CD90 はポジティブであることが示された。(3) 歯髄幹細胞を人工歯周骨欠損内に移植したところ実験群では結合組織性の付着が認められたが、歯槽骨の再生は認められなかった。今回の実験ではヒト歯髄幹細胞をラットの移植していることから免疫の問題等が考えられる。しかし、歯髄幹細胞を用いた歯周組織再生の可能性は示されたと考えられた。

研究成果の概要(英文): The purpose of this study was examined the localization of pulp stem cells in the pulp, which is able to obtain without tooth extraction, and evaluated the growth of stem cells and the surface antigen with FGF addition culture. Also, we were evaluated the regenerated tissue using pulp stem cells in artificially created periodontal bone defect. As a result, (1) the pulp stem cells, which have high proliferation rate, were located in the center of coronal pulp chamber. (2) As for the cellular surface antigen, which performed an amplification culture by FGF, CD34 and CD45 were negative, and it was shown that CD44 and CD90 were positive. (3) After implantation of pulp stem cells in artificial periodontal bone defect, connective tissue attachment was found in the experimental group, but the alveolar bone regeneration was not found. In this study, we implanted human pulp stem cells to rat; it was thought that there were some immune problems. However, it was thought that pulp stem cells has a possibility for periodontal regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：歯周治療学

科研費の分科・細目：歯学 歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯髄幹細胞,歯周組織再生,CD-44,CD-90,b-FGF,免疫不全ラット,結合組織性付着

1. 研究開始当初の背景

現在、再生医療に注目が集まり、盛んに研究が行われている。特に幹細胞を用いた研究が盛んであり、骨髄幹細胞を用いた骨再生に関する研究は医科領域においての研究が著しい。軟骨再生においては軟骨細胞を用いた再生療法がすでに人において臨床応用が開始されている。このように幹細胞あるいは機能細胞を用いた組織工学的手法を用いた再生療法が医科においては盛んに研究応用されている。また歯科領域においても歯周病罹患歯に対しては、骨髄幹細胞や歯根膜細胞を用いた研究がなされており、歯周組織再生の可能性が示されている。しかし歯科診療において再生に用いる細胞として骨髄細胞を用いるには、細胞を腸骨などから採取しなくてはならないなど歯科診療内で採取するには敷居が高くまた抵抗がある。また歯根膜細胞にも歯周組織を再生することが示されており、歯根膜シートを用いた歯周組織再生療法が研究されている。しかし、歯根膜細胞を得るためには歯を抜歯しなくてはならないというデメリットがあるばかりでなく、さらに歯周組織の破壊が進んだ患者さんから正常な歯周組織を採取してくることは困難であることは容易に推測ができる。そこで我々は口腔内から採取でき歯根膜細胞あるいは骨髄に代わる歯周組織再生に働く細胞として歯髄細胞に着目した。

これまでに Gronthos S.らのグループおよび Nakashima M.らのグループはヒト歯髄組織を培養し、ラット皮下に移植する実験から歯髄幹細胞を検出している (Gronthos S. et al, J Dent Res 81:531-5, 2002. Nakashima M. et al, Gene Therapy 9:814-8, 2002)。我々もラット歯髄細胞を b-FGF 添加下で培養し、ヌードマウス皮下に移植したところ、骨様組織、骨髄様組織および脂肪組織が形成されることを観察し、歯髄細胞中に種々の組織に分化しうる幹細胞が存在する可能性があることを報告している (森戸亮行, 五味一博 et al. 日本歯科保存学雑誌 48: 859-863)。

さらにヒト歯髄細胞を 50ng/ml 濃度の b-FGF 添加下に培養することで S 期の細胞が増えること、幹細胞のマーカーとなる STRO1 に染まる細胞が増殖していることを示した。

歯髄組織はこれまで幼弱な組織であると言われてきた。それ故に歯髄組織内には比較的多くの幹細胞が存在している可能性がある。そこで歯髄組織のどの部分に幹細胞が多く分布して存在するかを検索する必要が生

じてきた。また、歯髄細胞に含まれる細胞集団を細胞表面抗原を用いてその分布状態を確認し、b-FGF およびその他の幹細胞増殖因子を添加した場合の細胞の増殖状態を調べ、適切な幹細胞増殖因子選定の基準となるかについても検討が必要である。得られた歯髄幹細胞については、まず *in vitro* において石灰化誘導培地中での osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein その他の遺伝子発現について RT-PCR を用いて測定を行い、次いで、歯髄幹細胞をヌードマウス皮下に移植し形成される組織を調べることで歯髄の再生あるいは歯周組織の再生が可能であるかの基礎的なデータを得ることが必要となってきた。

2. 研究の目的

(1) これまでの研究で歯髄から採取した細胞が、個体により種々の特性を持つことが示された。つまりある細胞群は石灰化の指標であるアルカリフォスファターゼ活性が極めて高いが、多くの個体から採取した細胞群ではほとんどアルカリフォスファターゼ活性を示さないことが認められている。安定して歯髄幹細胞を得るためには歯髄幹細胞が歯髄のどの部分に最も多く存在しているかを知ることが必要であり、効率的に歯髄幹細胞を採取する上で重要となる。そこでラット歯髄組織切片を作製し細胞分裂の活動性を示す BrdU 陽性細胞を免疫染色することで歯髄組織のどの部分に最も多く歯髄幹細胞が分布しているか目安をつけ細胞採取時の指標とするための検索を行う。

(2) 50ng/ml 濃度の b-FGF 添加下にヒト歯髄細胞を培養することで STRO1 に染まる幹細胞が増殖することを示されていることから、このようにして培養された細胞集団に含まれる細胞の特徴を細胞表面抗原として CD29(+), CD44(+), CD14(-), CD45(-), CD105(+), CD117(+) 等を用いフローサイトメーターにより細胞の分布状態を確認する。

(3) *in vitro* の系では評価できない組織形成能については、培養した各細胞群をアテロコラーゲンゲル等の適切な担体と共に実験動物 (ヌードラットなど) に移植する。これにより得られた組織を病理組織学的に解析し、形成された組織について形態学的に評価を行う。

3. 研究の方法

(1) 分裂活性に優れた歯髄幹細胞と思われる細胞の歯髄内分布を調べる目的で、以下の実験を行った。マウスにトリチウム(3H)サイミジン 100 μ Ci を 8 時間おきに、10 日間連続注射を行う。10 日後に過量の麻酔薬投与により安楽死させた後、下顎骨を摘出し Karnovsky 溶液にて固定を行う。その後、通常通り、脱灰、パラフィン包埋後、4 μ m の切片を作製し トリイジンブルーにて染色を行い、組織学的に検索を行う。

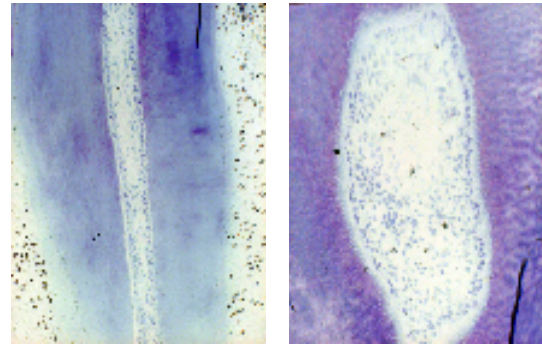
(2) ヒト歯髄から得た歯髄幹細胞の表面抗原性状を調べる目的で、以下の実験を行った。患者の同意を書面にて得た後、矯正学的な要件により抜歯された小臼歯を 10 倍量の抗菌薬を含む α -MEM 中にて 15 分間ずつ 3 回洗浄を行う。その後、滅菌ダイヤモンドディスクで歯に刻みを入れ、歯を切断することで歯髄組織を採取した。メスにより細切後、ディスペーゼとコラゲナーゼ混合液中で細胞を分散する。FGF 添加 α -MEM 培地で培養し 2 ~ 3 系代目の細胞を用い、CD34, 44, 45, 90 について FITC 標識モノクローナル抗体を用いたシングルカラー染色を行い、フローサイトメーター Cytomics FC500M (ベックマン・コールター) を用いて各抗体の発現解析を行う。

(3) 歯髄幹細胞の歯周組織再生能を評価する目的で、以下の実験を行った。培養により得られた歯髄幹細胞をアテロコラーゲンゲル中に懸濁 (2.2×10^7 cell/ml) する。実験的骨欠損モデルとし、免疫不全ヌードラットの上顎第 1 臼歯口蓋側に歯科用ラウンドバーにて注水下で形成した歯周組織欠損部に移植し、歯周組織の再生状態について術後 3 週目に試料を回収し、通法に従い切片を作製し組織学的に観察した。コントロールは細胞を含まないアテロコラーゲンゲルとした。

4. 研究成果

(1) 歯髄幹細胞の歯髄内分布

歯根部歯髄と歯冠部歯髄とを比較したところチミジンの取り込みの多い増殖活性が高いと思われる細胞は歯冠部において多数認められ、歯根部では散見されるに過ぎなかった。また、その細胞の局在は歯髄の中央付近に多く認められ、象牙芽細胞に接した部分あるいは近接した部分には認められなかった。

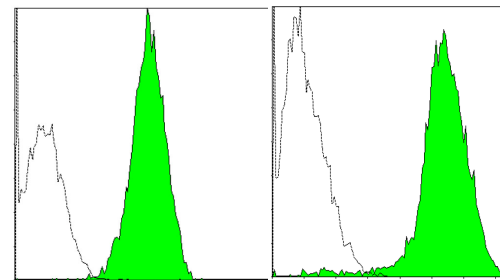


歯根部

歯冠部

(2) 歯髄幹細胞の表面抗原特性

歯髄組織から採取した歯髄幹細胞を FGF 添加 α -MEM 培地にて培養し、2 ~ 3 継代の細胞について造血幹細胞マーカーである CD34、CD45 および間葉系幹細胞マーカーである CD44 と CD90 について発現解析をそれぞれに対する FITC 標識モノクローナル抗体を用いたシングルカラー染色を行い、フローサイトメーター Cytomics FC500M を用いて各抗体の発現解析を行った。その結果、CD34 および CD45 はネガティブであり、CD44 および CD90 はポジティブであることが示された。



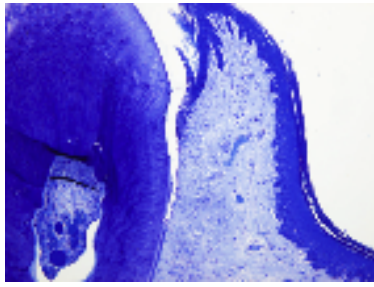
CD44

CD90

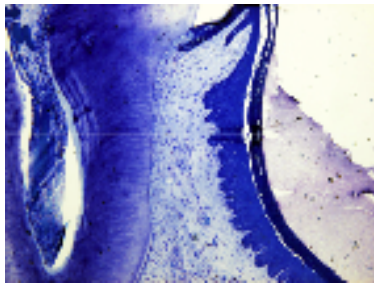
(3) ヒト歯髄幹細胞の歯周骨欠損部への移植

ヒト歯髄幹細胞を FGF を用いて増幅培養しこれをアテロコラーゲンゲル中に懸濁し 2.2×10^7 cell/ml に調整した試料を用いた。実験動物には免疫不全ヌードラットを用い実験的に形成した骨欠損部に注入移植した。その結果、歯髄幹細胞移植群では歯肉上皮のダウングロースが抑制され、ほぼ CEJ 付近に上皮が維持されていたのに対し、アテロコラーゲンのみを移植したコントロール群では上皮の根尖側への移動が認められた。また、実験群では歯肉結合組織と歯根表面に結合組織性の付着が確認されたが、歯根表面に明らかなセメント質の形成は認められず、極めて薄い 1 層のトリイジンブルー濃染の層が認められるのみであった。コントロールでは

歯根と歯肉は付着せず、剥離した状態を示していた。



コントロール群



歯髄幹細胞移植群

考 察

以上の結果より、歯髄幹細胞は歯髄組織中の歯冠部分に多く含まれていることが示された。これは当初、根尖部に多く存在するのではないかと推測とは異なっていた。また分化が象牙芽細胞へと進んでいる、象牙質近くには存在していないことが示された。細胞分散法で採取した歯髄細胞を FGF 添加条件下で培養することにより、幹細胞マーカーである CD44 と CD90 が発現していることが分かった。この細胞を歯周骨欠損部位に移植すると結合組織性の付着が獲得できた。しかしながら、セメント質形成は弱く、骨の再生は移植期間においては認められなかった。これはヒトの歯髄幹細胞を用いたことによることが考えられる。今後の研究には、ヒトに対する免疫不全を有するノグマウス等を用いる必要があるものと考えられた。

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6件)

Gomi K, Makino T, Suzuki S, Hasegawa M, Maeda N, Arai T. Microbicidal and cytotoxic effects of functional water in vitro. *Quintessence Int.* (査読あり)

41: 166-172; 2010.

Kakegawa A, Oida S, Gomi K, Nagano T, Yamakoshi Y, Fukui T, Kanazashi M, Arai T, Fukae M. Cytodifferentiation activity of synthetic human enamel sheath proteinpeptides. *J Periodont Res.* (査読あり) 45: 643-649; 2010.

Morito A, Kida Y, Suzuki K, Inoue K, Kuroda N, Gomi K, Arai T, Sato T. Effects of basic fibroblast growth factor on the development of the stem cell properties of human dental pulp cells. *Arch Histol Cytol.* (査読あり) 72: 51-64; 2009.

T. Nagano, A. Kakegawa, Y. Yamakoshi, S. Tsuchiya, J.C.-C. Hu, K. Gomi, T. Arai, J.D. Bartlett, and J.P. Simmer. Mmp-20 and Klk4 Cleavage Site Preferences for Amelogenin Sequences. *J Dent Res.* (査読あり) 88:823-828,2009

Yashima A, Gomi K, Maeda N, Arai T. One-stage full-mouth versus partial-mouth scaling and root planning during the effective half-life of systemically administered azithromycin. *J Periodontol.* (査読あり) 80: 1406-1413; 2009.

Ujiie Y, Shimada A, Komatsu K, Gomi K, Oida S, Arai T, Fukae M. Degradation of noncollagenous components by neutrophil elastase reduces the mechanical strength of rat periodontal ligament. *J Periodont Res.* (査読あり) 43: 22-31; 2008.

[学会発表](計9件)

Gomi K, Yamaguchi T, Nagano T, Momoi Y, Arai T. Effect of azithromycin to gingival and periodontal ligament fibroblasts. The 96th Annual Meeting of American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, 2010.10.30-11.2, Hawaii Convention Center, Honolulu, HI

新田 浩, 五味一博, 新井 高, 前田伸子, 福田光男, 野口俊英, 野村由一郎, 恵比須繁之, 島田靖子, 吉江弘正. アジスロマイシンを用いた歯周抗菌療法の多施設研究. 第53回日本歯周病学会秋季学術大会, 2010.9.19, サポートホール高松 牧野智彦, 大島朋子, 五味一博, 川崎文嗣, 小川比佐誌, 八島章博, 前田伸子, 新井 高. インプラント周囲炎に対するfull-mouth SRPIによる細菌叢の変化. 第5

2回日本歯周病学会秋季学術大会, 2009.10.11, 宮崎観光ホテル

八島章博, 五味一博, 新井 高. full-mouth SRPと歯周外科処置を併用した侵襲性歯周炎の一症例. 第52回日本歯周病学会秋季学術大会, 2009.10.11, 宮崎観光ホテル

Makino T, Gomi K, Yashima A, Kawasaki F, Oshima T, Maeda N, Arai T. The effects of full mouth SRP conjunction with Azithromycin for peri-implantitis. The 6th Annual Meeting of Asian Pacific Society of Periodontology, 2009.8.29-30, Cariton Hotel, Singapore

Yashima A, Gomi K, Maeda N, Arai T. One-stage full- versus partial-mouth scaling and root planing under validity period of systemically administered azithromycin. EUROPERIO6, 2009.6.4-6, Stockholm International Fairs and Congress Centre, Stockholm, Sweden

八島章博, 五味一博, 牧野智彦, 近内理代, 前田伸子, 新井 高. 抗菌薬併用によるfull-mouth SRPにおける1回法vs.分割法の比較. 第52回日本歯周病学会春季学術大会, 2009.5.15-16, 岡山コンベンショナルセンター

牧野智彦, 小川比佐誌, 川崎文嗣, 大島朋子, 五味一博, 前田伸子, 新井 高.

インプラント周囲炎に対するfull-mouth disinfectionの細菌学的効果. 第51回日本歯周病学会秋季学術大会, 2008.10.19, 四日市市文化会館

五味一博, 新井 高, 前田伸子, 野杵由一郎, 恵比須繁之, 小田 茂, 和泉雄一, 新田 浩, 山本幸司, 吉江弘正, 福田光男, 野口俊英. アジスロマイシンを用いた歯周抗菌療法が多施設研究-中間報告-. 第51回日本歯周病学会秋季学術大会, 2008.10.19, 四日市市文化会館

〔図書〕(計4件)

朝波惣一郎、王 宝禮編集 五味一博. 薬 '10/'11 歯科 疾患名から治療薬と処方例がすぐわかる本. 176-177, 2010. クインテッセンス出版
新井 高, 五味一博, 八島章博, 他. Periodontal Therapy Basic and Clinical Practices 3rd Edition. 永末書店. 2009. 255.

吉江弘正、宮田 隆編 五味一博. 歯周病予防のストラテジー. 137-139, 2009. 医歯薬出版

朝波惣一郎、王 宝禮編集 五味一博. 薬 4-41, 2008. クインテッセンス出版

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五味 一博 (GOMI KAZUHIRO)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号: 10178460

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし