

機関番号： 11301
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2008 ～ 2010
 課題番号： 20599002
 研究課題名（和文） ヒト歯胚由来のクローン細胞による歯根尖部再生技術の開発
 研究課題名（英文） Development of apical tissue regeneration technology using human tooth germ derived cloning cell

研究代表者 池田 悦子 (IKEDA ETSUKO)
 東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：20509012

研究成果の概要（和文）：矯正治療における歯根吸収や歯根端切除術後の歯根長の短縮を回復させるために歯根尖部再生技術の開発を目指した。第一段階として、器官原基法を用いて人工的な歯胚を再生させ、萌出させた。歯根尖部再生の動物モデルを作製し、再生歯胚の根尖部を移植したが、その生着は認められなかった。つぎに、移植手技の安定化のために、同じ大きさの再生歯根の移植を目指した。現在、腎皮膜移植によって発生させた同じ大きさの再生歯の歯根尖を用いて、動物モデルへ移植する移植実験を推進中である。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop apical tissue regeneration technology to restore root length that was lost due to root resorption or surgical root resection in the orthodontic treatment. As a result, we successfully reconstituted a bioengineered tooth germ for eruption using the organ germ method. We developed an animal model that reproduces root apical tissue regeneration and used this model to transplant the apical tissue from the bioengineered tooth germ, but were unable to observe engraftment of the tissue. Then, for the stabilization of the engraftment, I aimed at the transplant of the bioengineered tooth root of the same size. Currently, our experiments are ongoing to transplant the apical tissue from the bioengineered tooth of the same size, which was developed by transplantation in the sub-renal capsule, into the animal model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	0	1,600,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	5,000,000	102,000	6,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯根吸収、矯正治療、ヒト歯胚、歯根尖部再生技術

1. 研究開始当初の背景

近年、体性幹細胞を応用した組織再生が大きな注目を集めており、白血病に対する骨髄移植など、臨床応用がすでに進んでいる分野も存在する。体性幹細胞は、自らがいた組織と同じ胚葉の細胞にのみ分化するとされてき

たが、本来は分化しないはずの胚葉細胞(例えば肝臓や神経など)へ分化したという結果が報告された。歯科もその例外ではなく、歯髄幹細胞や歯根膜幹細胞の存在が報告されている。申請者は、ヒト第三大臼歯歯胚の歯胚細胞が3胚葉へ

の分化能を有することを報告した。歯科治療時の抜歯処置に伴い破棄されるヒト第三大臼歯歯胚は、歯科組織の再生への細胞ソースとして期待される。

申請者らは、単一化した細胞を高密度に区画化した状態で再配置することにより、細胞同士が凝集した人工的な歯の器官原基を作製し、組織学的に完全な複数の歯を形成することが明らかになった。この研究結果は上皮・間葉細胞をコラーゲンゲル内で高密度に区画化して再構成することで、これまで実現困難とされていた歯を誘導することを可能とする独創的な技術として高く評価されている。しかしながら、申請者らの画期的な報告はマウスの細胞を用いた結果であったため、ヒト細胞による解析をすすめることが大きく期待されている。

本研究課題では、ヒト第三大臼歯歯胚由来のクローン細胞およびヒト第三大臼歯歯胚と分化段階の同等のマウス歯胚細胞を用いた歯根再生技術の開発を目指す。

2. 研究の目的

器官原基法を開発し、細胞操作技術によって人工的な歯胚を再生させることに成功した。これより、歯科再生の実用化に向けた研究を可能とした。しかしながら、この報告はマウスの歯胚細胞を用いた研究結果であったため、実用化に向けてヒト細胞を用いた研究が期待される。そこで、本研究課題では、歯根吸収歯や歯根端切除歯に対する歯根尖部再生技術の開発を目指し、ヒト第三大臼歯胚由来のクローン細胞およびヒト第三大臼歯歯胚と分化段階の同等のマウス歯胚細胞を器官原基法によって再構築し人工的な歯胚を発生させて、その歯根部を歯根尖部再生技術に応用させる研究を推進する。

3. 研究の方法

(1)C57b16J マウスの E14.5 および E18.5 の間葉細胞の培養。E18.5 はヒト第三大臼歯歯胚と同じ分化段階後期

E14.5 の C57b1J 胎仔マウスから歯胚組織を摘出し、コラゲナーゼにて酵素処理し、10%FBS 含有 α MEM 培地にて培養し増殖させて、凍結保存した。さらに E18.5 の C57b1J 胎仔マウスから歯胚組織を摘出し、コラゲナーゼにて酵素処理し、10%FBS 含有 α MEM 培地にて培養し増殖させて、凍結保存した。E18.5 の C57b1J 胎仔マウスの歯胚は抜歯によって摘出されるヒト歯胚組織と同じ分化段階のものである。

(2)C57b16J マウスの歯胚間葉細胞の増殖能の解析

E14.5 の C57b16J の歯胚細胞の増殖能を WST8 によって解析し、増殖していることが示された。

(3)C57b16J マウスの歯胚間葉細胞および上皮細胞による再生歯胚の作製

器官原基法によって、C57b16J マウスの胎児の歯胚に由来する単一化上皮細胞と間葉細胞を高密度に区画化して再構成して、再生歯胚を作製し、器官培養によって、再生歯胚を発生させる。

(4)C57b16J マウスを用いた歯根吸収モデルマウスの作製

C57b16J 胎仔マウスの臼歯を抜歯して、近心根の根尖部をドリルで削除する。その後、削除した根尖部に器官原基法によって作製した再生歯胚の歯根相当部を再植する。

(5)再生歯根移植術の安定化のための再生歯胚作製

C57b16J マウスを用いた歯根吸収モデルマウスの再生歯根の移植を安定化させるために、大きさの均一化した再生歯胚を作製した。C57b16J マウスの胎児の歯胚に由来する単一化上皮細胞と間葉細胞を、ハミルトンシリンジを用いてそれぞれ等量にして、コラーゲンゲル内に高密度に区画化して再構成し、大きさの均一化した再生歯を作製する。

4. 研究成果

(1)C57b16J マウスの歯胚間葉細胞の培養

E14.5 の C57b1J 胎仔マウスから歯胚組織を摘出し、コラゲナーゼにて酵素処理し、10%FBS 含有 α MEM 培地にて培養し、凍結保存した。その後、凍結保存細胞を融解して培養したところ、線維芽細胞様の接着細胞の写真が認められた。



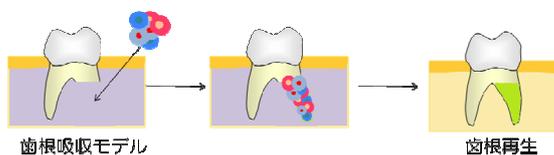
(2)C57b16J マウスの歯胚間葉細胞の増殖能の解析

E14.5 の C57b16J の歯胚細胞の増殖能を WST8 によって解析したところ、増殖が認められた。

(3) 器官原基法によって、C57b16J マウスの胎児の歯胚に由来する単一化上皮細胞と間葉細胞を高密度に区画化して再構成して、器官培養した。再生歯胚の発生が認められた。



(4) C57b16J マウスを用いた歯根吸収モデルマウスの作製を推進した。しかしながら、手技の安定化が困難であり、実験手技の検討が必要となった。



(5) C57b16J マウスの胎児の歯胚に由来する単一化上皮細胞と間葉細胞を、ハミルトンシリンドルを用いてそれぞれ等量にして、コラーゲンゲル内に高密度に区画化して再構成し、大きさの均一化した再生歯の作製が確立された。

(6) これまで、歯根吸収の治療法の確立を目指した再生歯根の移植の開発はなされていない。

本研究では、器官原基法を用いて作製した再生歯胚の歯根相当部を、歯根吸収の動物モデルを作製し、歯根吸収の治療法の確立につながる技術開発を推進した。

E14.5 および E18.5 の歯胚細胞の培養の確立。

E14.5 の再構成歯胚の作製。歯根移植に適した大きさを均一化した再生歯胚の作製の確立。

しかしながら、動物モデルへの移植手技の確立を目指している。さらに、E14.5 および E18.5 の歯胚細胞の培養の確立の結果から、抜歯によって摘出されるヒト歯胚組織と同じ分化段階後期の細胞を用いた技術を確認し、ヒト歯胚細胞を用いた技術へ移行させる予定である。

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 2 件)

1. Etsuko Ikeda, Ritsuko Morita, Kazuhisa Nakao, Kentaro Ishida, Miho Ogawa, Teruko Takano-Yamamoto, Mitsumasa Mizuno, Syohei Kasugai, Takashi Tsuji. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 査読有り 13475-13480 vol106 2009

2. 齋藤正寛、池田悦子、中尾一久、辻 孝 歯の再生医療の最前線「再生歯による歯欠損部の機能的な再生」歯界展望 9-16 115 巻 2010 査読無し

[学会発表] (計 8 件)

1. 池田悦子、中尾一久、森田梨津子、石田研太郎、仲村崇、水野光政、山本照子、辻 孝 再生歯胚の成体口腔内における発生解析と口腔機能解析. 第 63 回日本口腔科学会大会 2009 年 4 月 16-17 日 浜松

2. 池田悦子、中尾一久、森田梨津子、石田研太郎、小川美帆、水野光政、山本照子、春日井昇平、辻 孝 成体顎骨内における再生歯の萌出と口腔機能の解析. 2009 年 6 月 16 日 第 6 回東北大学 バイオサイエンスシンポジウム 仙台

3. 池田悦子、中尾一久、辻 孝 再生歯の成体口腔内における萌出および咬合機能の解析. 第 54 回日本口腔外科学会大会 2009 年 10 月 10 日

札幌

4. 池田悦子、中尾一久、山本照子、辻 孝 再生歯の顎連携機能と侵害刺激応答能の解析. 第 54 回日本口腔外科学会大会 2009 年 10 月 10 日 札幌

5. Etsuko Ikeda Eruption and occlusal function of a bioengineered tooth germ in adult oral environment. Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry 2009 11 8 Hiroshima

6. Ikeda E, Nakao K, Morita R, Ishida K, Nakamura T, Ogawa M, Takano-Yamamoto T, Kasugai S, Tsuji T Eruption and occlusal function of a bioengineered tooth germ in adult oral environment. Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry 2009 11 8 Hiroshima

7. 池田悦子、中尾一久、小川美帆、水野光政、春日井昇平、山本照子、辻 孝 成体口腔内における再生歯の萌出の解析および歯根膜機能の解析. 第 68 回日本矯正歯科学会大会 2009 年 11 月 17 日 福岡

8. 池田悦子、森田梨津子、中尾一久、小川

美帆、水野光政、山本照子、辻 孝 再生歯
における神経線維の侵入とメカニカルスト
レスに対する刺激応答能の解析. 68回日本矯
正歯科学会大会 2009年11月18日 福岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 悦子 (IKEDA ETSUKO)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤
講師

研究者番号: 20509012

(2) 研究分担者

山本 照子 (YAMAMOTO TERUKO)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 00127250

(3) 連携研究者

辻 孝 (TSUJI TAKASHI)

東京理科大学・総合研究機構・教授

研究者番号: 50339131