

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20791490
 研究課題名 (和文)：エナメル芽細胞株と象牙芽細胞株を用いた上皮—間葉相互作用による歯の再生医療の開発
 研究課題名 (英文)：Development of odontogenic regenerative therapy by epithelial - mesenchymal interactions using ameloblast and odontoblast-lineage cell lines.
 研究代表者
 中田 憲 (NAKATA AKIRA)
 秋田大学・医学部・助教
 研究者番号：50400510

研究成果の概要 (和文)：

申請者らが既に樹立したエナメル芽細胞株と象牙芽細胞株および当教室で開発中の歯再生医療に特化した Scaffold を用いて、歯の発生時期でみられる上皮—間葉相互作用を培養系と生体内で再現し、申請者が考案した独自の歯再生医療の開発を試る。

本研究において、マトリゲル内で三次元培養されたエナメル芽細胞はヌードマウス皮下でエナメル器様組織を形成し、硬組織構築能を有することから、本細胞株を用いた歯の再生医療への応用の可能性が示唆される。

研究成果の概要 (英文)：

We try to develop the original tooth regenerative therapy by epithelial-mesenchymal interactions in vitro and in vivo using ameloblast, odontoblast-lineage cell line and scaffold which specialized in the tooth regenerative therapy.

In this study, after sub-cutaneous implantation of ameloblast-lineage cell line that cultured three-dimensional in matrigel to athymic nude mice, we ectopically observed enamel epithelium like structure formation and hard tissue construction. We believed that these cell lines are useful tool for clinical tissue engineering technology to repair the tooth

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：歯の再生医療

1. 研究開始当初の背景

21世紀の歯科医学における戦略的研究課題の一つは歯の再生と考えられる。再生医療では、細胞、Scaffold(細胞の足場)、Signal(分化増殖因子)の3要素が重要であるが、最適なScaffold(細胞の足場)、Signal(分化増殖因子)の検討には均質な細胞が必要となる。当教室では、歯由来細胞株を用いた歯の再生医療の開発を目指した基礎的研究を行っており、申請者は、マウス胎仔の歯胚からエナメル芽細胞および象牙芽細胞を分離・培養して、不死化エナメル芽細胞株と不死化象牙芽細胞株の樹立に成功し、それらの特性を明らかにしてきた(Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, **308**(4), 834-839, 2003. Phenotype properties of a novel spontaneously immortalized odontoblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, **342**(3), 718-724, 2006).

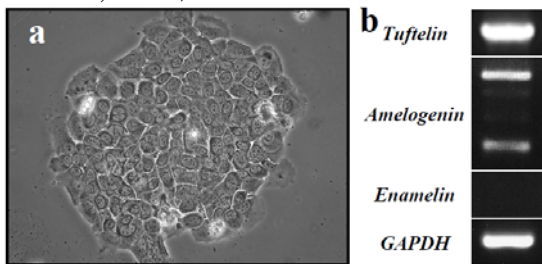


図1 申請者が、マウス歯胚から樹立した不死化エナメル芽細胞株(a)は、エナメル蛋白遺伝子(Tuftelin, Amelogenin)(b)を発現する。

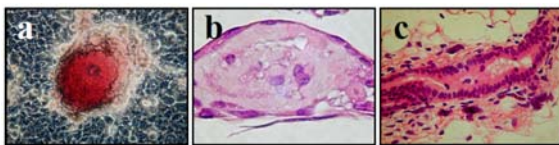


図2 エナメル芽細胞株は、培養系で石灰化した結節を形成する(a)。結節の内部には、エナメル質に類似した石灰化像が観察される(b)。ヌードマウス皮下において、基質形成期エナメル芽細胞に類似した組織が形成される(c)。

申請者が樹立したエナメル芽細胞(図1)は、培養系で石灰化した結節を形成し(図2 a, b)、ラミニンを主体とした基底膜成分の調整品であるマトリゲルを担体としてヌードマウスの皮下に移植すると、自ら基質形成期エナメル芽細胞に分化してエナメル器様組織を形成する(図2 c)。移植用担体として用いたマトリゲルはラミニンを主成分とした基底膜成分であることから、基底膜成分がエナメル芽細胞の分化に関与していると考えられる。

一方、申請者らが樹立した象牙芽細胞は、各種のデンティンマトリックス蛋白産生に

関する遺伝子を発現し(図3)、培養系で石灰化した結節を形成する(図4)。

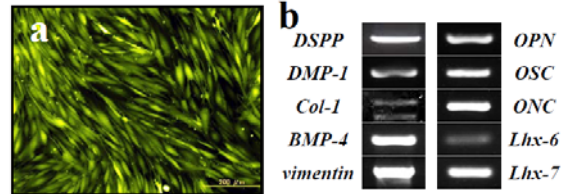


図3 申請者らが、GFPマウス歯胚から樹立した不死化象牙芽細胞株(a)、象牙芽細胞は、デンティン関連遺伝子(b)を発現する。

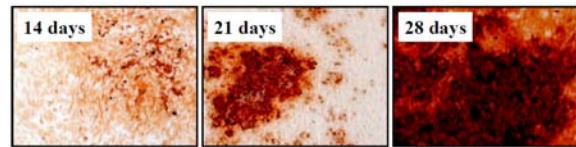


図4 象牙芽細胞株は、培養系で経時的に石灰化する。

エナメル芽細胞は、象牙芽細胞に接するエナメル器組織の内エナメル上皮細胞から分化するが、このエナメル芽細胞の分化には象牙芽細胞との上皮-間葉相互作用が重要であり、象牙芽細胞から分泌されるデンティンマトリックス蛋白や象牙芽細胞との接触を介した何らかのシグナルが関与していると考えられる。申請者らは、樹立したエナメル芽細胞と象牙芽細胞による上皮-間葉相互作用を培養系で再現するために、特殊なバブル処理で通気孔の大きさを変更できるコーゲン膜(細胞を両面に培養して、細胞が互いの細胞突起を介して接触し、シグナル伝達ができる)を開発中である(図5)。

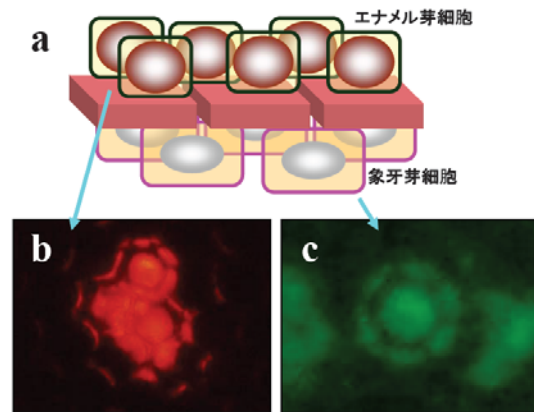


図5 ハニカム構造を有する特殊コーゲン膜を用いた上皮-間葉相互作用の模式図(a)。その膜上で培養したエナメル芽細胞(b)、および象牙芽細胞(c)。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが樹立したエナメル芽細胞株と象牙芽細胞株との上皮-間葉相互作用を応用した生物学的手法により成熟

③ 歯再生用 Scaffold を用いた樹立細胞株の異所性歯形成能の検討 (図 10)

吸収性リン酸カルシウムセラミックスおよび吸収性高分子ポリマー/セラミックス複合体を利用した移植用の chamber を開発中である。実験①b と c の詳細な検討で得られた培養体、および実験②で作製したコラーゲン膜とのエナメル芽細胞/象牙芽細胞・複合体をこの diffusion chamber に入れ、chamber の両端をミリポアフィルターで封鎖した後、chamber を SCID マウスの皮下に移植する。移植後、2 週、4 週、8 週、12 週に chamber を摘出し、組織切片を作製し、*in vivo* におけるエナメル質や部分的な歯の再生について評価する。さらに、歯および石灰化に関連するタンパクを免疫組織化学染色にて検出する。

4. 研究成果

基底膜成分と成長因子によるマウスエナメル芽細胞株の分化誘導条件の検討とマトリゲル内への細胞注入法による歯の形成能の検討を行っている。

a. 基底膜成分の調整品であるマトリゲルをセルカルチャーインサート上でゲル化させた後、エナメル芽細胞をマトリゲル内に注入して3週間三次元培養を行い、組織学的評価を行った。三次元培養したエナメル芽細胞から部分的な歯やエナメル質を形成しないが、細胞塊が形成された。コラーゲンスポンジ内で三次元培養したエナメル芽細胞を対照群とした (図 11, 12)。



図11. コラーゲンスポンジ内におけるエナメル芽細胞の生体内挙動
エナメル芽細胞は、コラーゲンスポンジ内でコロニーを形成した(a)。移植40週後のヌードマウス(b)。移植片の内部では、軽度なカルシウムの沈着が観察された(c)。

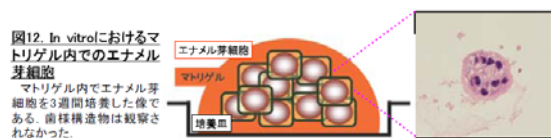


図12. *In vitro*におけるマトリゲル内でのエナメル芽細胞
マトリゲル内でエナメル芽細胞を3週間培養した像である。歯様構造物は観察されなかった。

b. マトリゲル内で細胞塊を形成したエナメル芽細胞との複合体をヌードマウス背部皮下に移植し、免疫組織化学染色を行った。移植6週のエナメル芽細胞は、エナメル芽細胞のマーカーであるアメロジェニンで染色、歯上皮のマーカーであるサイトケラチン14で染色さ

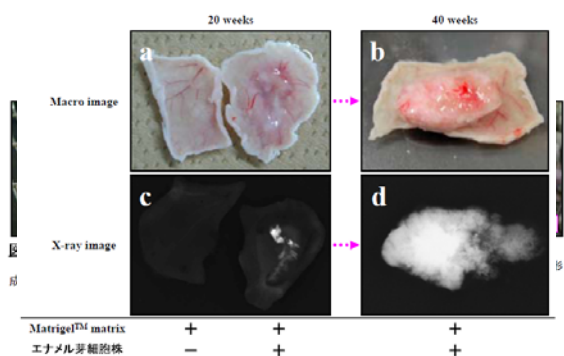


図14. 移植片の組織像と軟X線写真
(a, c) 移植20週、(b, d) 移植40週における移植片の状態と軟X線写真を示す。移植20週では、小さく散在したレントゲン不透過性が観察された。40週では、皮下で大きな組織塊を形成しており、レントゲン不透過性は増大し、不透過性は充満した。

れ、エナメル器様組織を形成した。さらに、移植40週でレントゲン不透過性を示す石灰化組織が誘導された (図 13-17)。

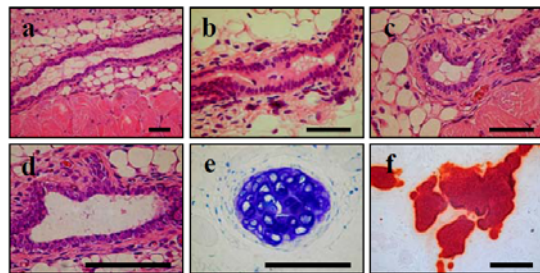


図15. 移植6週切片の組織像
エナメル器に類似した組織を形成した(a, b, c, d)。異所性に軟骨形成(e)やカルシウム沈着(f)が観察された。

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1件)

① 石田貴洋, 高野裕史, 中田 憲, 伊藤 悠, 本間高志, 鈴木正晴, 山下貴史, 大淵真

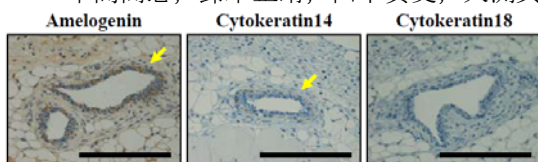


図16. 移植6週切片の免疫染色像
図8で観察されたエナメル器に類似した組織は、抗Amelogenin抗体と抗Cytokeratin14抗体が陽性、抗Cytokeratin18が陰性であった。

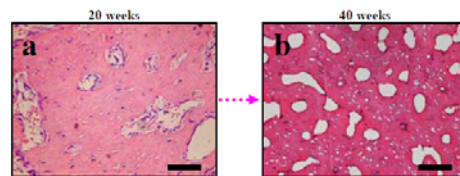


図17. 移植20週と40週切片の組織像
図8で観察されたエナメル器に類似した組織は、消失した。徐々に、無機質が観察された。

彦, 五十嵐秀光, 海老原龍人, 今野泰典, 佐藤裕子, 福田雅幸: 口腔カンジダ症に対するイトラコナゾール内用液の治療効果について. *J Michinoku Dent Soc*, 40(1・2), 47-48, 2009. 査読無。

[学会発表] (計4件)

① 中田 憲, 永井宏和, 遊佐和之, 佐藤扶美子, 伊藤 悠, 高野裕史, 福田雅幸, 宮本洋二: 口腔扁平上皮癌に対する S-1 と TXT 併用療法に関する臨床的検討. 第32回日本頭頸部癌学会 (平成20年6月13日, 東京)

② 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(社)日本口腔外科学会総会 (平成20年10月, 徳島)

③ 中田 憲, 伊藤 悠, 高野裕史, 福田雅

幸：外側咽頭後リンパ節転移を生じた硬
口蓋癌と上歯肉癌の2例。第33回日本
頭頸部癌学会（平成21年6月，札幌）

- ④ 中田 憲，伊藤 悠，高野裕史，福田雅
幸：下顎骨に発生したエナメル上皮癌の
2例。第54回（社）日本口腔外科学会総
会（平成21年10月，札幌）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 憲 (NAKATA AKIRA)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号：50400510

(2) 研究分担者

なし.

(3) 連携研究者

なし.