

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390528

研究課題名（和文） 生後の歯胚細胞による歯周組織を備えた歯（歯根）の再生法

研究課題名（英文） Tissue engineering of tooth root with periodontium generated from cells in adult teeth.

研究代表者

本田 雅規（HONDA MASAKI）

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：70361623

研究成果の概要（和文）：3年間の研究期間において、以下の事を明らかとした。初年度においては、ブタ/ヒト歯小嚢細胞、ヒト歯根膜間葉系幹細胞、ヒト歯髄間葉系幹細胞の単離と効率的な培養方法の開発。次年度においては、歯髄細胞から象牙質塊を作製するための適した担体の模索。最終年度はブタの歯胚から採取したエナメル上皮細胞、歯髄細胞および培養歯小嚢細胞による疑似歯胚を作製し、人工的に作製した疑似歯槽陥凹モデルに疑似歯胚を移植することで歯周組織様構造を持つ歯根の再生技術の確立を試みた。

研究成果の概要（英文）：We performed a series of experiment for a development of method to generate a tooth-root with periodontium in the limited three years. In the first years, we developed the method to isolate and culture the dental follicle-derived cells, human periodontal ligament-derived, and human pulp-derived mesenchymal cells. In the second year, the suitable scaffolds to generate dentin tissues were examined using dental pulp-derived mesenchymal cells. In the last year, we create the bone trunk and implanted the mimic tooth germ including enamel organ-derived, dental pulp-derived, and dental follicle-derived cells in the bone trunk. After implantation, periodontal ligament-like tissue on the surface of cementum-like tissues was observed in the bone trunk.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

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：再生歯学

1. 研究開始当初の背景

第一の背景として、胎生期の歯胚細胞を用いると歯は容易に再生することは、他の施設より報告されているが、胎生期の歯胚を臨床に応用することは、歯胚の入手が困難であることから難し

いと考えられる。

第二の背景として、胎生期の歯胚を獲得することは困難なので、我々は以前から、生後のブタ歯胚細胞を用いた歯の再生法の確立を目指し

ていた。しかし、歯冠の形態を再現できるような、完全な歯の再生は困難であることが分かってきた。その点について、具体的に説明したい。

2002年に報告した生後の歯胚細胞による歯の再生法では(Young et al. J Dent Res. 2002)、1つの担体の中に、異常な形態をもつ歯の組織が何個も再生する頻度が高いという問題が残されていた。(Honda et al. Arch. Histo Cyto 2005, Sumita et al. Biomaterials 2006)。その後、研究代表者は、歯胚細胞の担体にコラーゲンスポンジが有効であること(Sumita et al. Biomaterials, 2006)などを明らかにしたが、歯冠の形態は制御できなかった。すなわち、多くの場合正常な歯冠形態を再生できないということである。

しかし、2002年から10年間の研究の中で、歯胚から採取した歯胚上皮細胞と歯髄細胞を個々に播種すると、担体中に一つの象牙質塊ができることを発見し(Honda et al. Biomaterials 2007)、この象牙質塊の周囲に歯周組織を再生することで、天然歯と類似する歯根が再生できるという発想が生まれ、今回の研究の申請に至った。

2. 研究の目的

今回申請する研究の最終的な目標は、臨床に一日でも早く応用できるような歯の再生技術を確立することであった。背景でも述べたように、歯周組織を備えた歯根再生法は、完全な歯の再生法を開発するよりも早期に臨床応用が可能になると考えられる。この治療法を我々は“細胞製歯根による咬合回復”と呼び、新規歯の再生療法を開発に着手した。

3. 研究の方法

(1) 歯周組織再生に必要な細胞源の確保(ブタ組織)

① 歯小囊細胞の効率的な培養法の確立

歯冠形成期歯小囊前駆細胞の効率的な培養方法を模索するために、タイプIコラーゲン、タイプIVコラーゲン、フィブロネクチンおよびラミニン

をコートした培養皿で培養し、アルカリフォスファターゼ活性や硬組織関連遺伝子群の発現を確認することで、最適な培養条件を見出す。次に、担体に播種して移植することで硬組織形成能を持つことを確認する。

② ヒト歯根膜間葉系幹細胞の単離

一方で、萌出した歯のどこから、細胞を確保するかを考えた場合、歯根膜組織が歯周組織再生に必要な細胞源となる。そこで、歯小囊同様に、FACSを用いて歯根膜幹細胞のマーカーを用いて前駆細胞を採取する。この実験では、ヒトの歯を解析した。その理由はヒトから入ることが可能となったからである。矯正治療にて、抜歯が必要となった患者より、同意を得た後に、小白歯の歯根部に付着する歯根膜組織を採取する。幹細胞マーカーによって単離後に多分化能を評価することで、間葉系幹細胞であることを確認する。

(2) 歯根再生の基となる象牙質塊の作製

① 象牙質再生に必要な象牙芽細胞を得るために歯髄前駆細胞の採取

ブタ組織一歯冠形成期の歯髄から酵素処理にて、細胞を単離、コロニー形成能がある細胞を分離、培養することで、前駆細胞を獲得する。

ヒト組織一ヒト歯髄間葉系幹細胞のマーカーとFACSにて、間葉系幹細胞を単離・培養し、前駆細胞を獲得する。

② 象牙質塊作製の最適な担体の選択

ある一定の大きさを持つ組織の再生に担体を応用する。担体は硬組織に有利と考えられるハイドロキシアパタイトの含有の有無と孔径の違いによって4種類作製した。評価方法は、(1)にて獲得した歯髄の前駆細胞を播種して、免疫不全マウスの背部皮下に移植することで、担体に新生する硬組織量と質をマイクロCTにて測定する。

硬組織形成の評価時期は、移植後16週として、試料を取り出した。

(3) 歯周組織再生法の確立

① 疑似歯胚の作製

エッペンドルフチューブ内にて、培養歯小囊細胞、歯髓前駆細胞、エナメル上皮前駆細胞によって、疑似歯胚を作製する。

初めに、培養歯小囊細胞のペレットを絵ペンドルフチューブの最下部に作り、その上部に、歯髓前駆細胞のペレットを乗せて、その上に、歯冠形成期の歯胚から採取したエナメル上皮前駆細胞(採取方法は Honda MJ. Arch Oral Biolo 2006にて確立)のペレットを乗せる。最後に、もう一度、培養歯小囊細胞のペレットにて覆い疑似歯胚を完成させる。

② 疑似歯胚を移植する歯槽窩の作製

今回作製した疑似歯胚はブタ歯胚から採取したものであることから、移植用歯槽窩はブタに作製することになる。そこで、下顎から骨を切り出し、その内部を切り抜くことで、移植用歯槽窩とし、その歯槽窩をヌードラットの大網に移植して、25週経過後に組織形成能を評価した。

4. 研究成果

歯小囊幹細胞の効率的な培養法を確立した。ブタの歯冠形成期歯胚から歯小囊組織を容易に獲得することができ、かつ、この培養した歯小囊細胞を頭蓋骨に移植すると骨形成を促進することがわかった(Tsuchiya, Honda, Connective Tissue Res 2010)。一方で、臨床応用を視野に入れるとヒトの歯小囊細胞の解析も必要であると考え、ヒト抜去歯より、歯小囊組織から歯小囊細胞を培養・増殖させて、ヒト歯小囊組織には培養下において、形態の異なる3種類の細胞が存在することを発見した。そして、3種類の細胞はすべて骨形成能を持つことを明らかにした(Honda, Triple O 2011)。

ブタの歯髓組織の部位による特異性を発見し

た。歯髓には歯冠部と歯根部があり、その特異性が違うことが予想されるも、今までに明らかにした報告はなかった。我々の結果から、歯根の再生に有利な歯髓組織は歯冠側に存在していることがわかった(Sumita, Honda Eur J.Oral Sci, 2009)。また、今までに、歯髓組織中には、間葉系幹細胞が存在することが明らかとなり、硬組織形成能についても報告があったが、今回我々は、ミニブタを用いて、ミニブタから採取した歯髓組織から間葉系細胞を単離・増殖させて、生活歯髓切断法を行った後に、切断部位の歯髓組織上に、ブタ歯髓組織由来の培養細胞を移植すると、象牙質橋が形成されることがわかった(Ando, Honda. Nagoya J.Med Sci 2009)。

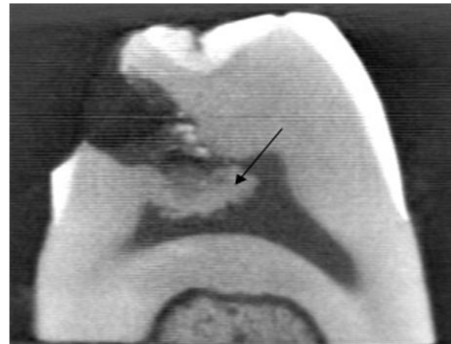


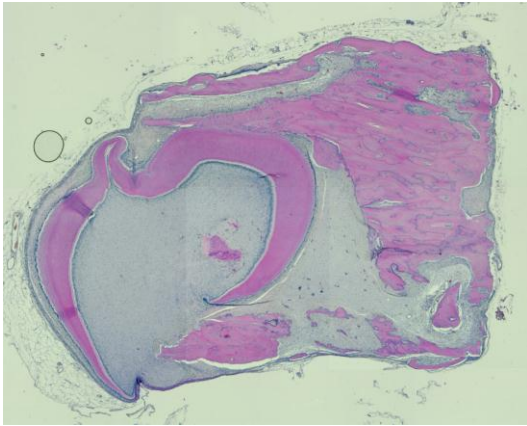
図 1. 移植した細胞から象牙質橋(矢印)が新生された。

我々が採取したヒト歯髓組織から培養した間葉系細胞を表面抗原と FACS を用いて単離・培養した細胞が骨芽細胞および脂肪細胞に分化することが確認できた。したがって、間葉系幹細胞が含まれていると考えた。これらの歯髓間葉系細胞の分化に有効な因子の探索をしていると、バクテリアの凍結破砕画分が硬組織形成細胞に分化させることを発見した(Abe, Honda. Triple O, 2010)。また、間葉系幹細胞のマーカーとして新しく発見された CD271 が未分化を維持する機能を持つことを発見することもできた(Mikami, Honda. Stem Cells&Devep, 2012)。

エナメル上皮前駆細胞については、これまで

の科研費による研究成果で培養条件は確立しているため、培養歯小嚢細胞と歯髄間葉系細胞とエナメル上皮前駆細胞による疑似歯胚を作製した。

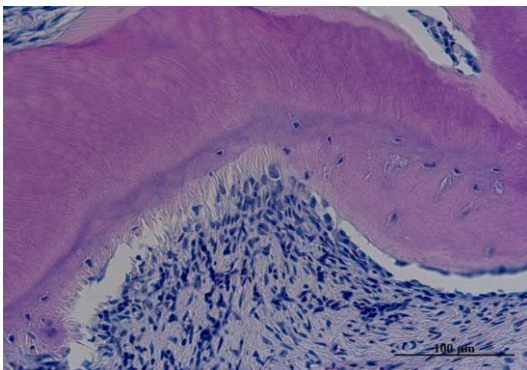
その疑似歯胚を人工的に作製した歯槽窩に移植後 25 週にて試料を採取し、組織学的に観察すると容易に象牙質とその内部に歯髓用組織が観察された。周囲の歯槽骨との間には結合



組織が観察された。

図 2. 新生された象牙質内には歯髓様組織, その周囲の歯槽窩の骨との間に結合組織が観察される。

高倍にて、観察すると、象牙質には象牙細管が認められた。歯髓用組織内には血管が観察された。象牙質周囲には、細胞性セメント質用組織が観察された。その細胞性セメント質には、歯槽骨との間に新生された結合組織の線維が取り



込まれている組織像が観察された。

図 3. 象牙質外周囲には細胞を含む硬組織(細胞性セメント質様組織, そして、結合組織からセメント質様組織に線維が取り込まれている像が確認できる。

しかし、この取り込まれた線維が歯根膜の主線維なのかは、明らかにすることができなかった。今後の研究課題として残された。これらの実験から、培養エナメル上皮細胞、培養歯小嚢細胞そして、歯髄間葉系細胞から疑似歯胚を作製し、歯槽窩に移植すると歯周組織を備える象牙質が形成されることが明らかとなった。しかし、今回歯髄間葉系細胞を培養すると、硬組織形成が認められないことなど、課題も残された。

さらに、ヒトの細胞から歯根再生を考えると、ヒトからエナメル上皮組織を採取することは困難であると思われる。その理由として、萌出した歯にはエナメル上皮組織が存在しないからである。そこで、人工材料によって、歯髄間葉系細胞を象牙芽細胞に分化させる必要があると考え、分化に適する担体をこの研究課題の中で模索した。

この課題の中では、骨格をポリ乳酸-グリコール酸の共重合体で作ったブロックとそのブロックに分化誘導が優位となると考えられるハイドロキシアパタイトを添加したブロックを作製した。ハイドロキシアパタイトを添加しないと硬組織の形成は認めず、硬組織の誘導には、ハイドロキシアパタイトが必要であることが明らかとなった。しかし、ブロック内で新生された硬組織には、象牙細管が認められず、象牙質に分化誘導に有意な担体の開発がさらに必要であることも分かった。

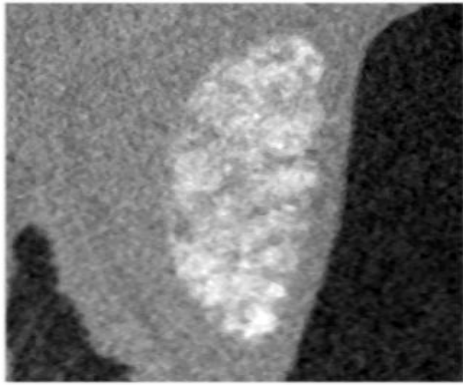


図4. 移植 16 週後にマイクロCTにて、試料を作製すると担体内部に硬組織が観察された。

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 23 件)

① Honda MJ, Imaizumi Y, Suzuki H, Ohshima S, Tsuchiya S. Stem Cells isolated from human dental follicles have osteogenic potential. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 査読有 111, 700-708, 2011

② Mikami Y, Watanabe N, Honda MJ et al. CD271/p75NTR inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. Stem Cells & Development. 査読有 20, 901-913, 2011

③ Tsuchiya S, Ohshima S, Yamakoshi Y, James SP, Honda MJ. Osteogenic differentiation capacity of porcine dental follicle progenitor cells. Connective Tissue Research 査読有 51, 197-207, 2010

④ Abe S, Imaizumi M, Mikami Y, Wada Y, Satomura K, Ishihara K, Honda MJ. Oral bacterial extracts facilitate early osteogenic/dentinogenic differentiation in human dental pulp-derived cells. 査読有 Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 109, 149-154, 2010

⑤ Ando Y, Honda M, Ohshima H et al. The Induction of Dentin Bridge-like Structures By Constructs Of Subcultured Dental Pulp-Derived Cells And Porous HA/TCP In Porcine Teeth. Nagoya Journal Medical Science 査読有 71, 51-62, 2009

⑥ Honda M, Shinmura Y. et al. Enamel Tissue Engineering Using Subcultured Enamel Organ Epithelial Cells in Combination with Dental Pulp Cells. Cells Tissues Organs 査読有 189, 261-267, 2009

[学会発表] (計 20 件)

① 本田 雅規, CD271 (NGFR)は歯の間葉系幹細胞のマーカー、第53回歯科基礎医学会 (招待講演) 2011年9月30日、長良川国際会議場 (岐阜県)

② 本田 雅規, 歯根膜組織由来および歯肉組織由来の間葉系幹細胞、第53回歯科基礎医学会 (招待講演) 2011年9月30日、長良川国際会議場 (岐阜県)

③ Honda M, Characterization of Deciduous Dental Pulp Stem Cells. International Academy for Dental Research. 2010年7月16日バルセロナ, スペイン

④ Honda M, Abe S, Satomura K, Oka K, Isokawa K, Ishihara K. Bi-directional effects of the oral bacteria on dental pulp-derived fibroblasts. The 87th International Association for Dental Research. 2009. 04. 03. Miami Beach Convention Center (Miami, USA)

[図書] (計 5 件)

① 本田雅規, エナメル質 形成、構造、遺伝、再生、起源と進化. わかば出版株式会社 247-261, 2009 (分担)

② Honda M, The Osteoperiosteal Flap: A Simplified Approach to Alveolar Bone Reconstruction. Quintessence Publishing Co, Inc. 283-294, 2010 (分担)

③ Honda MJ & Ohshima H, Nova Science Publishers, Inc. Stem Cell, Regenerative Medicine and Cancer. 185-206, 2010 (分担)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 幹細胞の未分化状態を維持する新規方法

発明者: 本田雅規, 三上剛和

権利者: 日本大学

種類: 特願

番号: 2009-148337)

出願年月日: 平成 21 年 6 月 23 日

国内外の別: 国内

[その他]ホームページ等
<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/76/0007566/theses.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

本田 雅規 (HONDA MASAKI)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号:70361623

(2)研究分担者

磯川 桂太郎 (ISOKAWA KEITARO)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号:50168283

湯口 眞紀 (YUGUCHI MAKI)
日本大学・歯学部・助手
研究者番号:00256885

三上 剛和 (MIKAMI YOSHIKAZU)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号:80434075

(3)連携研究者

渡辺 信和 (WATANABE NOBUKAZU)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号:100334278