

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22689050

研究課題名(和文) 組織幹細胞を用いた歯関連組織の分化メカニズムの解明とその応用

研究課題名(英文) Clarification of the mechanism in dental tissue differentiation by using tissue stem cells.

研究代表者

園山 亘 (Sonoyama, Wataru)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：40325121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円、(間接経費) 5,760,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト幼若歯胚組織を用いて、各組織における組織分化能や歯牙組織形成が可能であることを明らかにするため、歯冠形成期のヒト歯胚上皮組織と歯胚間葉組織を再構築して免疫不全動物へ移植を行った。ヒト歯胚上皮組織と歯胚間葉組織の再構築体からはエナメル質と象牙質が層状に組織形成されていることが認められた。さらに、ヒト歯胚間葉組織と歯小囊組織を再構築して移植したところ、象牙質表層からセメント質や歯根膜といった歯根の組織構造が形成された。以上より、ヒト歯胚構造の適切な再構築を行うことにより、歯胚発生・組織分化が再現される可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the tooth tissue differentiation capacity by using a human immature tooth germ, we have performed tooth tissue reconstruction with tooth epithelial tissues and tooth mesenchymal tissues, which were isolated from the human wisdom tooth germs during tooth developmental stage, and transplanted into the immunodeficient animal. The reconstruction with tooth epithelial tissue and tooth mesenchymal tissue were generated a tooth crown structure including enamel and dentin. In addition, the reconstruction with tooth mesenchymal tissue and dental follicle tissue were generated a tooth root structure including cementum and periodontal ligament on the dentin surface. These results showed that the tooth tissue reconstruction using dental stem cells might be regenerated a correct tooth structure by mimicking the tooth development.

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：幹細胞 前駆細胞 分化メカニズム

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの歯科界では、歯が失われた際の機能回復には固定式ブリッジや可撤性床義歯が応用されてきたが、国民の健康感の変化と基礎的研究の蓄積による信頼性の向上を背景にして、口腔インプラントの需要が急増している。しかしながら、この口腔インプラントも歯根膜を有しない故の生理的感覚の欠如や、成長・老化に伴う歯や顎骨の変化に対応できないなどの欠点を有しており、口腔インプラントの更なる改善が期待されてきた。近年の幹細胞生物学の発展に伴い、この期待は歯の再生へ舵が取られ、歯の再生に関する多くの基礎的な検討がなされるようになった。なかでも、胎生期の組織や歯胚細胞を用いた齧歯類の歯の再生は世界的にたいへんな注目を集めた。しかしながら、これらの研究から“ヒトの歯の再生医療”を実現するためには、①歯関連組織の形成能力を有した細胞の同定、②組織分化メカニズムの解明、③器官のサイズ・形態形成メカニズムの解明、④再生に要する時間の短縮、といった課題が残されており、これらの解明のために発生・再生の原理に基づく基礎研究やトランスレーショナル研究の推進が期待されてきた。

### 2. 研究の目的

①ヒトの各発生段階の歯の組織から上皮細胞と間葉細胞を分離し、共培養系における細胞動態を多面的に解析する。興味ある知見の得られた組合せと、そうでない組合せを比較検討することにより、各種の上皮細胞と間葉細胞の特異的な細胞分化促進（抑制）因子を同定し、分化メカニズム・未分化状態維持メカニズムを解明する。

② In vitro で立体構築した細胞群に上記の知見を応用してその動態を詳細に検討する。これらの上皮と間葉の細胞群を立体的に組み合わせ、実験動物への in vivo 移植モデルで立体構造を持ったエナメル質／象牙質・歯髄複合体／セメント質・歯髄複合体という構造を再生する。

### 3. 研究の方法

①ヒトの歯の分化・未分化維持メカニズムの解明：

#### 1)ヒト抜去歯および幼若歯胚からの組織・細胞の分離

抜去歯は成人の埋伏智歯に限らず、矯正処置予定患者の歯冠形成期の幼若歯胚など様々な年齢層から提供を受ける。これらの提供サンプルから、歯胚上皮・歯胚間葉・歯小囊組織を分離すると共に、歯髄や歯根膜などの歯組織由来幹細胞を取得する。

②ヒトのエナメル質／象牙質複合体、象牙質／セメント質複合体の作製：

#### 1)in vitro における歯関連組織の立体構築

提供された歯および幼若歯胚から分離した組織をコラーゲンゲル内で構築して3次元培養を行う。組み合わせとしては、歯胚上皮組織と歯胚間葉細胞の組合せによるエナメル質／象牙質複合体、歯胚間葉組織と歯小囊組織の組合せによる象牙質／セメント質複合体が考えられる。

#### 2)立体構築した組織塊の in vivo 移植実験

②-1)で立体構築した組織塊・細胞塊を免疫不全マウスの皮下もしくは腎皮膜下へ移植して、その経時的な変化を組織学的に評価する。

(倫理面への配慮)

#### A. ヒト材料研究

研究に使用する抜去歯および幼若永久歯胚を得るにあたり、岡山大学倫理委員会の承認のもと、以下の点を遵守した。

#### (a) 提供者を選ぶ際の方針

岡山大学医学部・歯学部附属病院口腔外科（病態系）、歯周科および矯正歯科、岡山市の提携歯科医院を受診した患者(8～50歳)で、本研究計画の意義・目的や、偶発症・不利益について十分に理解を得た上で、ボランティアとして参加いただける患者を対象とした。具体的には、智歯周囲炎、う蝕、歯周病の診断を受け、抜歯適応となった歯を持つ患者、ならびに歯科矯正治療上の便宜抜歯を行うこととなった患者を対象とした。

#### (b) インフォームド・コンセントの方法及び方法

試料採取を行う施設（岡山大学および提携歯科医院）において「提供者に対する説明文書」を試料提供者に手渡し、これに基づき同意の任意性と撤回の自由、研究計画、利益と不利益、個人情報の保護、研究終了後の試料の取扱い等について、分かりやすく説明する。試料提供者が研究内容等を十分に理解した上で、研究に協力する場合は「同意書」に署名を求めた。

#### (c) 個人情報の保護の方法

匿名化の方法については、下記の方法にて施行した。まず試料を採取する施設において、患者の年齢と性別のみを記録し、新たなID番号を付与した。試料から得た細胞の保存に際しては、ID番号と年齢、性別、レントゲン写真の対応表を作成し、この対応表からは提供者個人が特定できないよう配慮を行った。

## B. 動物実験研究

本研究課題におけるすべての動物実験は、岡山大学動物実験委員会の承認を受けた上で、その規則にしたがって実験を実施した。移植実験に使用した実験用マウスは、米国国立衛生研究所の定める動物実験のガイドラインにしたがって飼育した。実験による動物への負担軽減のため、施術は5 mg/ml ペントバルビタールを腹腔内注射による全身麻酔下で行った。口腔内施術を行ったマウスは粉末飼料 (CE-2、日本クレア、東京) にて飼育した。

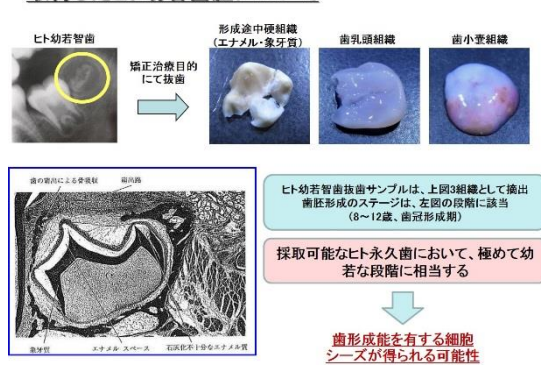
### 4. 研究成果

①ヒトの歯の分化・未分化維持メカニズムの解明：

#### 1)ヒト抜去歯および幼若歯胚からの組織・細胞の分離

8～13歳児の第3大臼歯歯胚から採取される歯乳頭組織、および歯小囊組織から、Out growth 法により細胞を取得し、効果的な細胞培養ならびに継代を行うことが可能となり、これらの培養細胞の組織形成能を明らかにするために、それぞれの細胞を凝集塊にして免疫不全動物に移植することにより、歯乳頭細胞からは象牙質組織が形成され、歯小囊細胞からは歯根膜線維とセメント質が形成されることを明らかにした。このことから、歯の組織再生に利用可能な細胞シーズの取得が可能であることが示された。

#### 取得したヒト幼若歯胚について



②ヒトのエナメル質/象牙質複合体、象牙質/セメント質複合体の作製：

#### 1)in vitro における歯関連組織の立体構築

#### 2)立体構築した組織塊の in vivo 移植実験

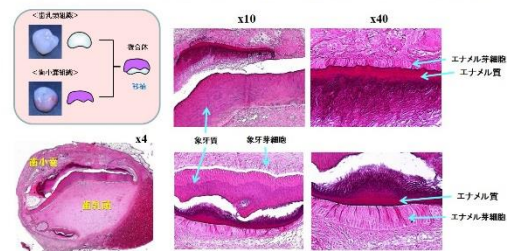
採取された8～13歳児の第3大臼歯歯胚から取得できる歯乳頭組織および歯小囊組織を用いて、免疫不全マウスの皮下ならびに腎臓皮膜下へ移植することにより、歯乳頭組織からは象牙質が形成され、歯小囊組織からは歯根膜線維とセメント質が形成されることを明らかにした。歯乳頭組織においては、組織内において象牙質形成能が異なる領域が存

在しており、歯冠側と辺縁側に位置する細胞群は象牙質軽性能が高く、根尖側の細胞群は象牙質形成能が低いことが示された。これらの結果は、同一の歯乳頭組織内において象牙芽細胞への分化能の違いがあることを示すばかりでなく、歯の発生過程における未分化細胞の局在・細胞極性を示唆するものと考えられる。

さらに、採取したヒト幼若歯胚組織を用いて歯牙形成が可能であるかを明らかにするため、歯冠形成期のヒト歯胚上皮組織と歯胚間葉組織を再構築して免疫不全動物へ移植を行った。移植後4ヶ月において、ヒト歯胚上皮組織と歯胚間葉組織の再構築体からはエナメル質と象牙質が層状に組織形成されていることが認められた。さらに、ヒト歯胚間葉組織と歯小囊組織を再構築して移植したところ、象牙質表層からセメント質や歯根膜といった歯根の組織構造が形成された。以上の結果より、歯冠発生期の歯胚組織には、適切な全ての歯組織構成成分を形成可能な細胞群が存在するばかりでなく、ヒト歯胚構造の適切な再構築を行うことにより、歯胚発生・組織分化が再現されることが示された。

#### ヒト歯乳頭・歯小囊組織組み合わせ移植による形成組織

ヒト歯乳頭組織に歯小囊組織を巻き付けて、SCIDマウス腎臓皮膜下に移植し、16～20週後に形成組織を確認した。



ヒト歯乳頭・歯小囊組織を組み合わせることにより、歯乳頭と歯小囊の境界面 (歯小囊側) から7例中3例 (43%) でエナメル芽細胞、エナメル質形成が認められた。(7例中3例・43%)

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Noda K, Arakawa H, Maekawa K, Hara ES, Yamazaki S, Kimura-Ono A, Sonoyama W, Minakuchi H, Matsuka Y, Kuboki T

Identification of risk factors for fracture of veneering materials and screw loosening of implant supported fixed partial dentures in partially edentulous cases. Journal of Oral Rehabilitation:査読有:40(3): 214-220, 2013  
Doi:10.1111/joor.12029

2. Yamazaki S, Arakawa H, Maekawa K, Hara ES, Noda K, Minakuchi H, Sonoyama W, Matsuka Y, Kuboki T

A retrospective comparative ten-year study of cumulative survival rates of remaining teeth in large edentulism treated with implant-supported fixed partial dentures or removable partial dentures. Journal of Prothodontic Research:査

読有:57(3):156-161、2013、doi: 10.1016/j.jpor.2013.03.003.

3. Yamazaki S, Arakawa H, Maekawa K, Hara ES, Noda K, Minakuchi H, Sonoyama W, Matsuka Y, Kuboki T., Retrospective investigation of the remaining teeth status of patients with implant-supported fixed partial dentures in unilateral free-end edentulism. Journal of Prosthodontic Research: 査読有 : 57(4): 262-267、2013. Doi: 10.1016/j.jpor.2013.08.001.

4. Hara ES, Ono M, Eguchi T, Kubota S, Pham HT, Sonoyama W, Tajima S, Takigawa M, Calderwood SK, Kuboki T. miRNA-720 controls stem cell phenotype, proliferation and differentiation of human dental pulp cells. PloS One: 査読有 :8(12) e83545:1-11、2013., 10.1371/journal.pone.0083545

5. Egusa H, Sonoyama W, Nishumura M, Atsuta I, Akiyama K, Stem cell in dentistry—part I: stem cell sources., Journal of Prosthodontic Research; 査読有 : 56:151-165、2012. 10.1016/j.jpor.2012.06.001

6. Egusa H, Sonoyama W, Nishumura M, Atsuta I, Akiyama K., Stem cell in dentistry—part II: Clinical applications. Journal of Prosthodontic Research; 査読有 :56:229-248、2012、10.1016/j.jpor.2012.10.001

7. 松香芳三、縄稚久美子、木村 彩、完山 学、水口 一、三野卓哉、丸濱功太郎、前川賢治、藤澤拓生、園山 亘、峯 篤史、菊谷 武、窪木拓男、施設に入所している要介護高齢者の問題点を抽出するチュートリアル演習の試み、老年歯科医学: 査読有:26(1):36-45、2011

[学会発表] (計 14 件)

1. Shinkawa S, Uchibe K, Ono M, Sonoyama W, Hara ES, Yoshioka Y, Ueda J, Asahara H, Kuboki T. Expression Pattern of Hox Genes During Mouse Tooth Development.、岡山医療教育研究国際シンポジウム:2013年9月22日～2013年9月23日、岡山、日本

2. Hara ES, Ono M, Sonoyama W, Eguchi T, Pham HT, Calderwood SK, Kuboki T. miRNA-720 controls stem cell phenotype, proliferation and differentiation of human dental pulp cells.、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会:2013年9月20日～2013年9月22日、岡山、日本

3. 大野充昭、前田あずさ、正木明日香、吉岡

裕也、園山 亘、窪木拓男、Young MF、CCN4/WISP-1 の骨形成における役割、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013年9月23日、岡山、日本

4. Shinkawa S, Uchibe K, Ono M, Sonoyama W, Hara ES, Yoshioka Y, Ueda J, Asahara H, Kuboki T, Expression Pattern of Hox Genes During Mouse Tooth Development.、2<sup>nd</sup> Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region:2013年8月21日～2013年8月23日、Bangkok、Thailand

5. 中島 隆、大野充昭、園山 亘、笈田育尚、Emilio S.Hara、前川賢治、窪木拓男、抜歯窩肉芽組織からの新規間葉系幹細胞の同定、平成25年度社団法人日本補綴歯科学会創設80周年記念第122回学術大会:2013年5月18日～2013年5月19日、福岡、日本

6. Sonoyama W, Biological Bone Augmentation/Regeneration around Dental Implants.、Biennial Joint Congress of CPS-JPS-KAP、2013年4月12日～2013年4月17日、Jeju、Korea

7. Pham TH, Ono M, Hara ES, Ueda M, Sonoyama W, Lieu PV, Kuboki T, A comparative analysis of the effect of rhTNF- $\alpha$  treatment on the stem cell phenotype of cells derived from dental pulp, periodontal ligament and bone marrow, The Asean Plus and Tokushima Joint International Conference、2012年12月7日、Yogyakarta、Indonesia

8. Pham TH, Ono M, Hara ES, Ueda M, Sonoyama W, Lieu PV, Kuboki T, Effect of transient TNF- $\alpha$  treatment on the stem cell phenotype of human periodontal ligament cells and bone marrow stromal cells.、第10回日本再生歯科医学会総会・学術大会、2012年9月2日、神戸、兵庫

9. Ueda M, Fujisawa T, Ono M, Masaki A, Miki H, Sonoyama W, Kuboki T. Human Dental Pulp Cells Increase Stem Cell-like Phenotype By TNF- $\alpha$ 、90<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR、2012年6月24日、Iguacu Falls、Brazil

10. 上枝麻友、藤澤拓生、大野充昭、正木明日香、三木春奈、園山 亘、窪木拓男 炎症環境による歯髓細胞の幹細胞化—歯髓細胞分化に与える TNF- $\alpha$  の影響—、平成24年度社団法人日本補綴歯科学会第121回学術大会、2012年5月26日、横浜、日本

11. 上枝麻友、藤澤拓生、大野充昭、正木明

日香、三木春奈、園山 亘、窪木拓男、歯髄細胞のリプログラミングに対する TNF- $\alpha$  の効果、平成 23 年度社団法人日本補綴歯科学会 中国・四国支部学術大会、2011 年 9 月 4 日、岡山、日本

12. 園山 亘、口腔機能の回復を目指した再生歯科医療、九州歯科大学 最新生命科学特別講義、2011 年 12 月 20 日、小倉、日本

13. 中島 隆、大野充昭、園山 亘、笈田育尚、Emilio S.Hara、前川賢治、窪木拓男、抜歯窩肉芽組織からの新規間葉系幹細胞の同定、第 29 回日本骨代謝学会学術大会、2011 年 7 月 28 日、大阪、日本

14. 園山 亘、自己組織幹細胞による歯の機能再生、社団法人日本補綴歯科学会第 120 回記念学術大会、2011 年 5 月 21 日、広島、日本

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕（計 0 件）

〔その他〕 特になし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

園山 亘 (Sonoyama Wataru)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：40325121