

## 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11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791960

研究課題名（和文） ヒト歯髄組織由来細胞を用いた骨再生医療

研究課題名（英文） Bone tissue engineering by human dental pulp cells

研究代表者

濱田 啓一（HAMADA KEIICHI）

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：60570025

研究成果の概要（和文）：歯髄細胞を用いた安全な骨再生医療の開発を目指し、血清および分化誘導因子を用いないで歯髄細胞を培養し、その性質を解析した。ヒト歯髄組織由来細胞は無血清培地を用いても増殖させることができ、無血清培地で培養した場合でも ALP 活性、オステオカルシンの発現は含牛胎児血清培地で培養した場合と同様に認められた。無血清培地で培養したヒト歯髄組織由来細胞は生体内で骨様組織を形成したが、典型的な骨組織とは異なっていた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to develop a new way of bone tissue engineering by human dental pulp cells cultured without serum and osteogenic differentiation induction. Human dental pulp cells could be cultured and expanded in serum-free medium. There were no differences in alkaline phosphatase activity and expression of osteocalcin between human dental pulp cell expanded in serum-free medium and in medium containing fetal bovine serum. Human dental pulp cells expanded in serum free medium formed mineralized tissues in vivo, but it is not typical bone tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1900000	570000	2470000
2011年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

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：骨、再生医療、歯髄、無血清培地

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでにヒト歯髄組織由来細胞を骨再生医療に応用することを目指して研究を進めてきた。従来の骨再生医療研究では骨髄などから採取した幹細胞を BMP (Bone Morphogenetic Protein) やデキサメタゾンなどの分化誘導因子を用いて骨芽細胞に分化誘導していたが、歯髄細胞は分化誘導因子を用いないでも骨芽細胞に分化し、生体内で

骨組織を形成することを発見していた。

## 2. 研究の目的

我々のこれまでの研究においては歯髄細胞を培養する際に牛胎児血清 (FBS) を用いていた。実際の患者での再生医療を考えた場合、FBS は安全性を考えるとその使用は避けるべきと考える。そこで本研究では FBS を用いない無血清培地でのヒト歯髄細胞の培

養を試み、さらに無血清培地で培養したヒト歯髄細胞の性質、骨形成能を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

東京医科歯科大学歯学部附属病院口腔外科外来にて治療目的に抜歯された第3大臼歯を患者の承諾を得て用いた。歯髄組織の培養には以下の培地を用いた。

含血清培地  $\alpha$ -MEM, 10%FBS

無血清培地 StemPro (Gibco)

これまでの我々の研究成果をふまえ全ての実験に置いてBMPやデキサメタゾンなどの分化誘導因子は使用していない。

#### (2) 細胞増殖能

第3継代目の細胞を96 well プレートに500個播き、第1、3、5、7、9日目にCell Counting Kit (DOJINDO)にて生細胞数を測定した。

#### (3) アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

培養した歯髄細胞よりCell-Lytic-M mammalian cell lysis/Extraction reagent (Sigma)にてタンパク質を抽出し、LabAssay ALP (Wako)にて活性を測定した。測定は第3継代後1週目、4週目の細胞よりタンパク質を抽出して行った。

#### (4) RT-PCR

TRIzol Reagent (invitrogen)にてRNAを抽出した。TURBO DNA-free Kit (Ambion)にてDNAを除去した後にReverTraAce- $\alpha$ -(TYOBO)を用いて逆転写反応を行った。得られたcDNAとTakara Ex Taq (Takara)を用いてPCR反応を行った。PCRプライマー以下のとおりである。オステカルシン (OCN)

F: 5'-CATGAGAGCCCTCACA-3'

R: 5'-AGAGCGACACCCTAGAC-3'

GAPDH

F: 5'-GAAGGTGAAGGTCTGGAGTC-3'

R: 5'-GAAGATGGTGTGGGATTTC-3'

#### (5) 細胞移植

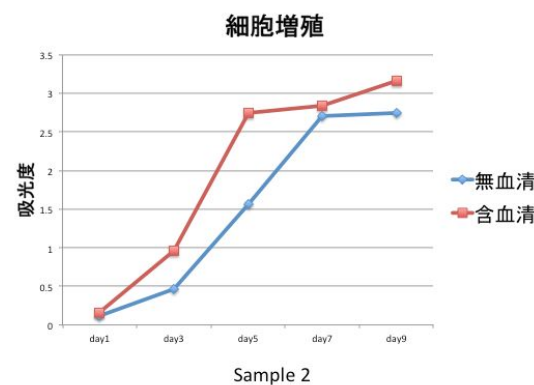
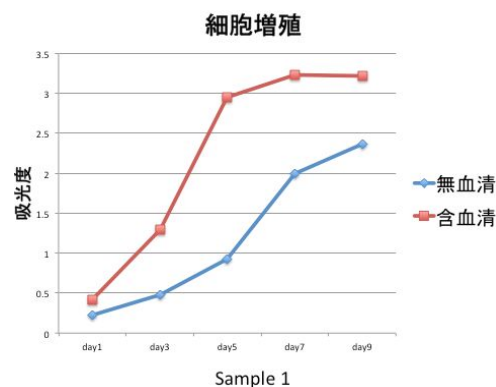
無血清培地にて培養した歯髄細胞を多孔性ハイドロキシアパタイト (HA) に播種し7日間 *in vitro* にて培養した後に、複合体 (担体+細胞) を免疫不全動物の筋肉内に移植した。移植後12週目に複合体 (担体+細胞) を取り出し、組織学的検討にて歯髄細胞の骨形成能を検討した。

## 4. 研究成果

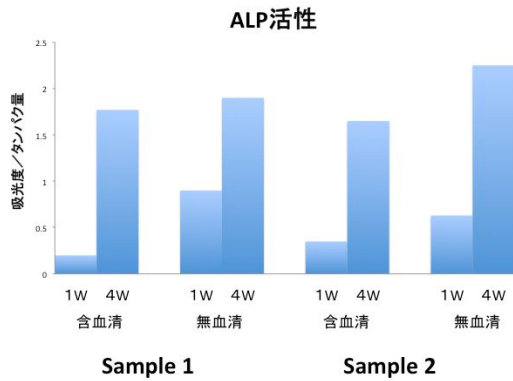
### (1) 細胞培養、増殖

種々の市販されている無血清培地にて歯髄細胞の培養を試みたところ、間葉系幹細胞用培地であるStemPro (Gibco)にて歯髄細胞が良好に増殖したので、その後の実験にはStemPro (Gibco)を使用することとした。

FBSを含む培地 ( $\alpha$ -MEM, 10%FBS) と無血清培地 (StemPro) での歯髄細胞の増殖を比較したところFBSを含む培地で培養した場合のほうが増殖能が高かった (Figure 1)。しかし、無血清培地で培養した場合でも歯髄細胞は良好に増殖し、その後の解析に必要な細胞数は十分に確保できた。

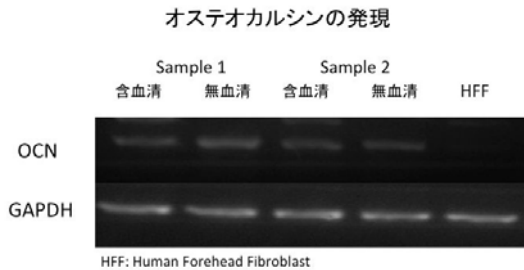


(2) アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性  
骨芽細胞への分化の指標となるALP活性を測定したところ、含血清培地で培養した場合と無血清培地で培養した場合とで明らかな差はなかった (Figure 2)。



### (3) オステオカルシンの発現

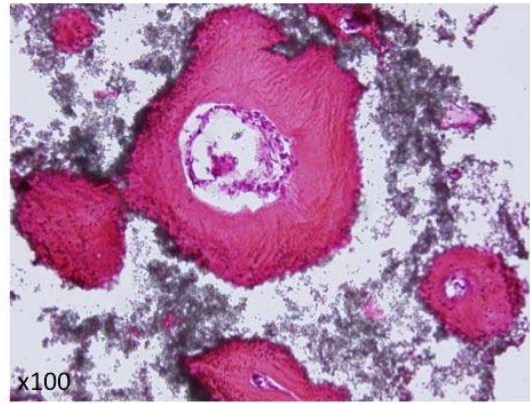
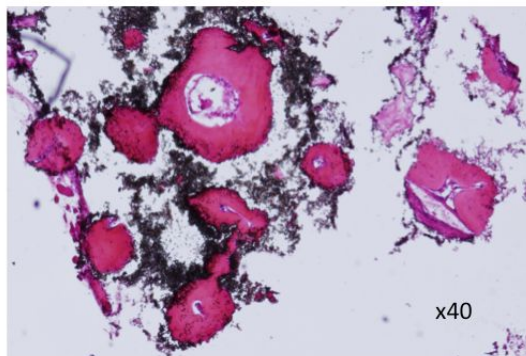
骨芽細胞のマーカであるオステオカルシン(OCN)の発現をRT-PCR法にて調べたところ含血清培地で培養した場合と無血清培地で培養した場合、いずれの場合にもその発現は認められた。



### (4) 生体内での硬組織形成

無血清培地にて培養した歯髄細胞を HA 担体に播種した後に免疫不全マウスに移植し組織形成能を検討した。以前の我々の研究では含血清培地にて培養した歯髄細胞は明らかな骨組織を形成したが、今回、移植した歯髄細胞は HA 担体内に骨様組織を形成したが、典型的な骨組織とは異なった組織を形成した。この形成された硬組織の詳細な解析が今後必要になると思われる。

#### 無血清培地にて培養した歯髄細胞による 生体内での硬組織形成



### (5) まとめ

これまでは歯髄細胞の培養には含牛胎児血清培地を用いていたが、無血清培地を用いても歯髄細胞を増殖させることができ、再生医療に必要な細胞数は確保できることが判明した。また、無血清培地で培養した場合でも ALP 活性、オステオカルシンの発現は含牛胎児血清培地で培養した場合と同様に認められた。

含牛胎児血清培地で培養した歯髄細胞は生体内で典型的な骨組織を形成したが、無血清培地で培養した場合には骨様組織を形成したが、典型的な骨組織とは異なっていた。この硬組織の特徴を明らかにするためには今後の詳細な解析が必要と思われる。

### 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 3 件)

- (1) Abe s., Hamada k., Yamaguchi S., Amagasa T., Miura M.  
Characterization of the radioresponse of human apical-papilla derived cells. Stem Cell Res. Therap. 2:2, 2011 doi:10.1186/scrt43(査読有)
- (2) 山口聰、阿部成宏、濱田啓一、天笠光雄  
ヒト根未完成歯根尖部歯髄組織由来細胞は神経堤幹細胞様の性質を持つ  
日本口腔組織培養学会雑誌  
19(1):37-38, 2010 (査読無)
- (3) 阿部成宏、濱田啓一、山口聰、天笠光雄  
放射線による歯根形成阻害メカニズムの検討  
日本口腔組織培養学会雑誌  
20(1):41-41, 2011 (査読無)

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 阿部成宏、山口聰、濱田啓一、天笠光雄  
放射線による歯根形成阻害メカニズム  
第 46 回日本口腔組織培養学会

研究者番号：

- 2010年11月13日 高知
- (2) 山口聰、阿部成宏、濱田啓一、天笠光雄  
分化誘導因子を必要としないヒト歯髄組  
織由来細胞による骨組織形成  
第8回日本歯科再生医療学会  
2010年10月30日 名古屋
- (3) 阿部成宏、濱田啓一、山口聰、天笠光雄  
山城正司  
ヒト根未完成歯・根尖部歯髄由来細胞の  
放射線生物学的検討  
第56回日本口腔外科学会  
2011年10月21日 大阪

[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

濱田啓一 (HAMADA KEIITI)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研  
究科・非常勤講師  
研究者番号：60570025

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )