

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390447

研究課題名(和文)臨床応用を目指したヒト成体細胞からの歯の再生技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of tooth regeneration based on human adult cells for clinical application

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：象牙質塊の作製に関する研究：ヒト歯髄細胞幹細胞の採取について、ヒトの過剰歯10本から歯髄を採取後、歯髄細胞を単したところ、10本すべてに幹細胞が存在することが分かった。次に、その細胞をPLGAを主体とした担体に播種して免疫不全マウスの背部皮下に移植したところ、象牙質の硬さに類似した硬組織が再生した。

歯周組織の再生に関する研究：ラット脂肪組織の成熟脂肪細胞から分離した脱分化脂肪細胞は間葉系幹細胞の特性を持ち、歯周組織欠損部に移植すると歯周組織再生能を示した。また、ヒト頬脂肪体から単離した成熟脂肪細胞から得られた脱分化脂肪細胞も間葉系幹細胞の特性を示し、歯周組織再生能を持つことが予測できる。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells were able to obtain from dental pulp from supernumerary teeth. We examined 10 dental pulp and observed that all dental pulp cells showed the characteristics of dental pulp stem cells. Next, dental pulp cells were seeded into the PLGA scaffold combined with HA. Dentin-like tissue were observed in the scaffold at 16 weeks after implantation.

Dedifferentiated fat (DFAT) cells are known to show the characteristics of mesenchymal stem cells. DFAT cells were implanted into the periodontal defect and exhibited the potential of periodontal tissue engineering. Then, we examined that buccal fat pad is useful for the cell source for DFAT cells. Buccal fat pad-derived DFAT cells showed the similar characteristics of DFAT cells from white adipose tissue from skin. Buccal fat pad is a cell source for DFAT cells and DFAT cells is useful for the periodontal tissue engineering in the future.

研究分野：再生医学

キーワード：間葉系幹細胞 歯髄細胞 象牙質再生 歯周組織再生 成熟脂肪細胞 脱分化脂肪細胞 担体 頬脂肪体

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らが、生後の歯胚細胞から歯の再生に成功(Young et al. J Dent Res. 2002)してから、10年が経過し、一つの結論が導かれた。それは、胎生期の歯胚細胞を用いると歯は容易に再生するが、生後の歯胚細胞を用いると歯の組織は再生するものの、再生する歯の形態は、正常構造を示さないことである。したがって、成体の細胞を使った歯全体の再生は不可能であり、唯一残された方法が歯根再生と考え、本研究課題に至った(Honda et al. Arch. Histo. Cyto 2005, Sumita et al. Biomaterials 2006)。

一方で、ここまでの研究成果において、歯根の再生であれば可能となるいくつかの根拠があった。第一に、歯胚から採取した歯胚上皮細胞と歯髄細胞を個々に担体に播種すると、担体中に一つの象牙質塊ができることである(Honda et al. Biomaterials 2007)。第二に、歯小嚢細胞をTCPと混合させて移植するとセメント質が再生することである(Tsuchiya et al. Cell Tissue Res 2007)。これらの動物実験の成果から、ヒトの細胞にて象牙質塊を作製後、その周囲に歯周組織を再生させることで、天然歯と類似する歯根が再生できることが予測できた。これは、インプラントに変わる技術になる。

2. 研究の目的

この課題における最終目標は、臨床に応用可能な歯根再生技術を確立することであった。背景で述べたように、歯周組織を備える歯根再生法は、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) 歯根再生の基となる象牙質塊の作製

歯髄幹細胞の採取

日本大学歯学部附属病院小児歯科の協力のもと、この研究期間中に10本の過剰歯と2本の乳歯から歯髄組織を採取し、歯髄細胞を単離・培養し、幹細胞としての特性を評価する。

象牙質塊作製の最適な担体の選択

GC社製の市販の担体(PLGA担体およびハイドロキシアパタイト含有PLGA担体)を購入し使用する。さらに、市販の担体とは、異なる気孔径の担体の作製、配合するハイドロキシアパタイトの改良した担体の作製を依頼し、硬組織再生能を評価した。

(2) 歯周組織再生法の確立

ヒト歯根膜・歯肉・頬脂肪体からの幹細胞の採取

ヒト歯根膜と歯肉の採取は、日本大学歯学部附属病院矯正科および頬脂肪体は同歯学部口腔外科の協力のもとに、歯根膜10例、歯肉5例、頬脂肪体10例から歯根膜細胞、歯肉間葉系細胞および成熟脂肪細胞を通常に従い単離・培養した。

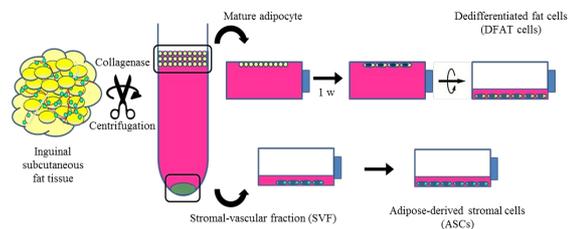


図1. 天井培養による脱分化脂肪細胞の採取

脂肪組織の大半を占める成熟脂肪細胞を下图に示すような天井培養を行うと、脱分化脂肪細胞が非対称分裂によって現れることが報告され、この脱分化脂肪細胞には間葉系幹細胞と類似する特性を持つことが明らかとなった。そこで、本研究課題において、脱分化脂肪細胞の歯周組織形成能を評価するために、ラット皮下組織の成熟脂肪細胞から分裂した脱分化脂肪細胞と通常によって得られる間質組織由来の間葉系幹細胞を採取し、幹細胞の特性を比較検討した。

歯周組織形成能の評価

ラット脂肪組織から間質由来の間葉系幹細胞と成熟脂肪細胞から天井培養にて現れる脱分化脂肪細胞をPLGAの担体に播種後に、下顎骨の



歯周組織欠損部に移植して、組織形成能を評価した。評価方法は、マイクロCT、組織学的解析、DiIラベルした細胞移植による局在の解析を行った。

図2．歯周組織欠損を作製後の組織像

4．研究成果

(1) 歯根再生の基となる象牙質塊の作製

歯髄幹細胞の採取

抜歯した過剰歯の歯髄細胞と乳歯の歯髄細胞の種々の幹細胞の特性を検討すると、どちらの細胞にも幹細胞の特性を示す細胞が存在することが明らかとなった。特に過剰歯 10 例すべての歯髄細胞中に幹細胞が存在することが分かった(Sato et al. Oral Diseases 2015)。これらの結果から、過剰歯は間葉系幹細胞の細胞入手先として有効であることが示された。

象牙質塊作製における担体の改良

ヒト歯髄細胞を市販のハイドロキシアパタイト含有 PLGA 担体に播種して、ヌードマウスに移植すると、硬組織が再生することが明らかとなった。一方で、PLGA のみの担体では硬組織は再生しなかった(投稿準備中)。一方で、歯髄細胞から再生した象牙質は、その硬組織の硬さがヒトの歯の象牙質より、低い値を示した。そこで、ヒト象牙質と同等の硬さに再生できる担体の開発を行うこととした。その方法としては、気孔径の変更と PLGA に含有させるハイドロキシアパタイトの改良である。これらの改良によって、以前の市販の担体の使用時と比較して、ヒト象牙質の硬さに類似する硬さを持つ硬組織が再生することに成功した(投稿準備中)。

(2) 歯周組織再生法の確立

ヒト歯根膜・歯肉・頬脂肪体からの幹細胞の採取

歯根膜細胞と歯肉間葉系細胞の骨芽細胞へ

の分化能を比較すると歯肉間葉系細胞が高いことが明らかとなったので、現在、その理由について検討している。

ラット脂肪組織から分離できる間質組織由来の間葉系幹細胞と脱分化脂肪細胞の骨芽細胞への分化能を比較すると、脱分化脂肪細胞が高いことが明らかとなった。

歯周組織形成能の評価

皮下脂肪の成熟脂肪細胞から非対称分裂した脱分化脂肪細胞を、ラット下顎骨の歯周組織欠損部に移植した。移植後5週にてマイクロCTにて観察すると、間質由来の間葉系幹細胞を移植した時と比較して、再生した硬組織量が多いことが分かった。次に、組織学的評価においても、歯槽骨の形成量、セメント質の形成量が脱分化脂肪細胞を移植したときの方が多く、歯根膜組織の再生程度は、欠損を作製する前とほぼ同等の回復程度であった。これらの結果から、脱分化脂肪細胞には、間質由来の間葉系幹細胞と同等の歯周組織再生能を持つことが示された(Akita et al. Biomed Res 2014)。

次に、頬脂肪体から単離した成熟脂肪細胞から分離した脱分化脂肪細胞の歯周組織形成を検討するために、抜去した歯根の象牙質上に脱分化脂肪細胞を播種して培養を継続したところ、石灰化物の沈着を認めた。現在、ヌードラットに歯周組織欠損を作製し、日と脱分化脂肪細胞を移植して、歯周組織再生能について評価中である(投稿準備中)。

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14件)

Toriumi T, Takayama N, Yuguchi M, Yamazaki Y, Shirakawa T, Isokawa K, Honda MJ. Characterization of mesenchymal progenitor cells in crown and root pulp of primary teeth. Biomedical Research. 2015; 36(1)31-45. doi: 10.2220/ biomedres. 36.31.(査読有)

Ishijima M, Hirota M, Honda MJ, Isokawa K, Ogawa T. Osteogenic cell sheets reinforced with photofunctionalized

micro-thin titanium. *J Biomater Appl.* 2015. 29(10)1372-84. doi:10.1177/0885328214567693 (査読有)

Sato M, Toriumi T, Isokawa K, Shirakawa T, Honda M. Characterization of mesenchymal progenitor cells in crown and root pulp from human mesiodentes. *Oral Dis.* 2015. 21(1) e86-97. doi: 10.1111/odi.12234 (査読有)

Akita D, Toriumi T, Arai Y, Isokawa K, Ishigami T, Honda MJ. Periodontal tissue regeneration by transplantation of rat adipose-derived stromal cells in combination with PLGA-based solid scaffolds. *Biomedical Research.* 2014.35 (2) 91-103. PMID:25604095 (査読有)

Akiyama Y, Toriumi T, Isokawa K, Shimizu N, Honda MJ. The P75 neurotrophin receptor regulates proliferation of the human MG63 osteoblast cell line. *Differentiation.* 2014. 87(3-4) 111-8. doi: 10.1016/j.diff.2014.01.002 (査読有)

Mikami Y, Matsumoto T, Kano K, Toriumi T, Somei M, Honda MJ, Komiyama K. Current status of drug therapies for osteoporosis and the search for stem cells adapted for bone regenerative medicine. *Anat Sci Int.* 2014. 89(1) 1-10. doi: 10.1007/s12565-013-0208-8 (査読有)

佐藤桃子, 石田千晶, 岩佐聡子, 武井浩樹, 本田雅規, 白川哲夫. 乳歯及び永久歯歯髓組織由来間葉系幹細胞の特性の比較. *小児歯科学雑誌* 2014. 52,417-425. <http://www.jspd.or.jp/contents/gakkai/journal/jjournal.html> (査読有)

Saito Y, Watanabe E, Mayahara K, Watanabe N, Morokuma M, Isokawa K, Shimizu N, Honda MJ. CD146/MCAM surface marker for identifying human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells. *J Hard Tissue Biology.* 2013. 22 (1) 115-128. https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jhtb/22/1/_contents/-char/ja/ (査読有)

Honda MJ, Toriumi T, Isokawa K. Mesenchymal dental stem cells for tissue regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013.28(6) e451-60. doi: 10.11607/jomi.te25 (査読有)

Oka K, Morokuma M, Imanaka-Yoshida K, Sawa Y, Isokawa K, Honda MJ. Cellular turnover in epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament of the mouse molar. *Eur J Oral Sci.* 2012. 120 (6) 484-494. doi: 10.1016/j.diff.2012.07.00 (査読有)

Mikami Y, Suzuki S, Ishii Y, Watanabe N, Takahashi T, Isokawa K, Honda MJ. The p75 neurotrophin receptor regulates MC3T3-E1 osteoblastic differentiation. *Differentiation.* 2012. 84 (5) 392-399. doi: 10.1016/j.diff.2012.07.001 (査読有)

Shinohara Y, Tsuchiya S, Hatae K, Honda MJ. Effect of vitronectin bound to insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 on porcine enamel organ-derived epithelial cells. *Int. J. Dent.* 2012. 10, 386282. doi: 10.1155/2012/386282 (査読有)

Tsuchiya S, Honda M. In vivo transplantation and tooth repair, Odontogenesis, *Methods Mol Biol.* doi: 10.1007/978-1-61779-860-3_12 2012. 9.123-134. (査読有)

Oka K, Honda MJ, Tsuruga E, Hatakeyama Y, Isokawa K, Sawa Y. Roles of collagen and periostin expression by cranial neural crest cells during soft palate development. *J Histochem Cytochem.* 2012. 60 (1) 57-68. doi: 10.1369/0022155411427059 (査読有)

[学会発表](計 27 件)

Toriumi T, Yamanaka K, Otani K, Honda M. Performance of PLGA-based Solid Scaffolds for Dental-Tissue Engineering. 92th International Association for Dental Research. 2014年6月25日 Cape Town, South Africa

Honda M. Mineralization potential of dental follicle stem cells. Symposium: Mineralized state control during odontogenic stem cell differentiation. 92th International Association for Dental Research (招待講演)2014年6月24日 Cape Town, South Africa.

Honda M. Stem cells for dental tissue engineering. Sino-Japan Regenerative Medicine Conference (招待講演), 2014年6月14日 Shandong University, Jinan, China.

本田雅規 口腔組織に由来する細胞の免疫制御機構. 第68回日本口腔科学会学術集会(招待講演)2014年5月8日 京王プラザホテル, (東京都新宿区)

Honda M. Dedifferentiated fat cells for dental tissue engineering. The second international conference of dental and craniofacial stem cells(招待講演)2014年4月12日 Sichuan University, Chengdu, China.

Toriumi T, Takayama N, Yamazaki Y, Yuguchi M, Isokawa K, Honda M. Generation of iPSc from root pulp cells of deciduous tooth. 第43回 American Association for Dental Research 2014年3月21日 Charlotte, NC, USA.

Akita D, Tsurumachi N, Yamanaka K, Honda M. Marute adipocyte-derived cells as a novel tool for periodontal regeneration. 第43回 American Association for Dental Research 2014年3月20日 Charlotte, NC, USA.

Akita D, Arai Y, Isokawa K, Ishigami T, Honda M. Enhanced Periodontal Tissue Regeneration by Adipose-Derived Stromal Cell Transplantation. World Academy of Science, Engineering and Technology 2013年9月5日 London, UK.
Sato M, Watanabe N, Watanabe E, Akita D, Toriumi T, Isokawa K, Honda M. Characterization of the Mesenchymal Stem Cells harvested from Human Supernumerary Teeth. World Academy of Science, Engineering and Technology 2013年9月5日 London, UK.
Sato M, Toriumi T, Isokawa K, Honda M. Dental pulp-derived mesenchymal cells in supernumerary teeth. 11th Tooth Morphogenesis and Differentiation. 2013年5月28日 La Londe Les Maures, France.
Akiyama Y, Isokawa K, Shimizu N, Honda M. Reproducible Bone Healing Process in Calvarial Defect. 11th Tooth Morphogenesis and Differentiation. 2013年5月28日 La Londe, Les Maures, France.
Toriumi T, Takayama N, Isokawa K, Honda M. Generation of iPSc from Dental Pulp-derived Mesenchymal cells, 第91回 International Association for Dental Research. 2013年3月21日 Seattle, USA.
Sato M, Watanabe N, Toriumi T, Isokawa K, Honda M. Dental pulp-derived mesenchymal cells in permanent, deciduous, and supernumerary teeth 第91回 International Association for Dental Research. 2013年3月21日 Seattle, USA.
本田雅規 ヒト歯髓由来間葉系幹細胞から induced pluripotent stem cells の樹立 . 第54回日本歯科基礎医学会(招待講演)2012年9月14日 奥羽大学, (福島県郡山市)

〔図書〕(計 1件)

Honda M, Toriumi T, Oka K, Saito Y, Isokawa K. Stem cell biology and tissue engineering in dental science. Elsevier, 2015 932(347-358)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: 脱分化脂肪細胞の取得方法
発明者: 本田雅規, 鶴町仁奈, 松本太郎, 秋田大輔, 加野浩一郎
権利者: 日本大学
種類: 特許
番号: 特願 2014-149676
出願年月日: 2014年7月23日
国内外の別: 国内

名称: 歯周組織再生用材料
発明者: 本田雅規, 秋田大輔, 松本太郎, 加野浩一郎, 金子正

権利者: 日本大学
種類: 特許
番号: 特願 2013-119441
出願年月日: 2013年6月6日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
無

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: 703616234

(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

鳥海 拓 (TORIUMI, Taku)

日本大学・歯学部・助教
研究者番号: 40610308

(3) 連携研究者

新井 嘉則 (ARAI, Yoshinori)
日本大学・歯学部・特任教授
研究者番号: 20212607

渡辺 信和 (WATANABE, Nobukazu)

東京大学・医科学研究所・特任准教授
研究者番号: 10334278