

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24792151

研究課題名(和文) 成体由来幹細胞の分離技術・遺伝子導入技術を用いた歯牙・歯周組織再生

研究課題名(英文) Tooth and periodontal tissue regeneration with purified mesenchymal stem cells and gene transfer technique

研究代表者

新部 邦透(Niibe, Kunimichi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50468500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞は自己複製能を有するが、その能力には限界が存在する。また、従来の接着培養では、長期に及ぶ培養において細胞の分化誘導が進み、細胞性質が変化する。本研究は、純化間葉系幹細胞を歯胚再生に必要な数まで増殖する必要があったが、従来の接着培養では結果を得ることができなかった。そこで、間葉系幹細胞の未分化性を維持する新たな培養法の確立が急務となった。

申請者はある環境で間葉系幹細胞の未分化性を維持させ、さらには未分化性を復活できる段階にある。またこの方法は、3次元的な細胞塊を形成しながら維持することができる。計画からは遅れることとなったが、現在この細胞塊を用いた研究を継続して行なっている。

研究成果の概要(英文)：The cultivable mesenchymal stem cell (MSC) has self-renewal competence. However, self-renewal ability of MSC shows a decrease after several passages using adhesion culture system. In addition, differentiation advancing and cell phenotype changing also appear in MSC after long term culture using the conventional adhesion culture. It is necessary to multiply the purified MSC in vitro without losing their stem-ness for their use in tooth germ reproduction. Therefore, establish a new culture method to maintain the stem-ness of the MSC is imperative.

Currently applicant to maintain the undifferentiated MSCs in a particular environment. Further, this culture method could be resurrected undifferentiated stage. This method can maintain the stem-ness of MSC through forming a three-dimensional cell mass. This research is delayed from the plan, but now, it is carried out to continue the research for the realization of the tooth germ and periodontal tissue regeneration using this cell mass.

研究分野：再生歯科

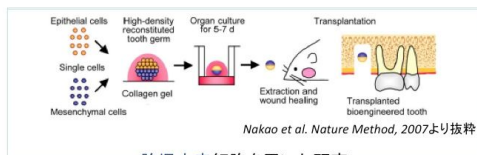
キーワード：間葉系幹細胞 歯胚再生 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

一度失われた歯牙硬組織・歯周組織は、成体の修復機構において再生することは不可能、もしくは不十分であり、人工材料による修復が一般的である。人工材料の開発も進み、コンポジットレジンやセラミックスの物性向上により色調も天然歯に近いものや強度の増したものが利用できるようになった。しかしながら実際の臨床の現場では、レジンの変色やセラミックスの光透過性や屈折率の違いから、隣接する天然歯とは明らかに違うものであると認識されてしまうことが多く見受けられる。また、交通外傷や腫瘍摘出後の歯牙歯周組織欠損においては母骨の量や質、欠損範囲の大きさによりインプラント修復が不可能であったり、顎義歯の安定性が悪くなってしまいうケースが多く存在するため、顎口腔領域における顎骨を含めた歯牙・歯周組織の再生が注目されている。

## 2. 研究の目的

### 成体由来細胞を用いた歯牙・歯周組織再生



胎児由来細胞を用いた研究

間葉系幹細胞(MSCs)の分離技術  
iPS細胞誘導技術

成体由来細胞からの歯牙・歯周組織再生を目指す。

本研究は、成体由来細胞を用いて歯牙及び歯周組織の再生を目的とする。2007年マウス胎児由来の歯胚細胞を摘出しin vitroにおいて培養後の歯胚をマウス体内に戻し、機能を持った歯牙を萌出させることが可能となった (Nakao et al. Nature Method, 2007)。この方法は胎児由来の歯胚細胞を用いているため、再生医療の実現を考慮する際、果たして成体由来の細胞においてこの方法が応用可能か分かっていない。そこで我々は、フローサイトメーターを用いた間葉系幹細胞

細胞(MSCs)の分離技術、iPS細胞及びiPS細胞誘導技術(キャリアによる特定因子導入技術)を応用し、成体由来細胞からの歯牙・歯周組織再生を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 成体由来非歯原性間葉系幹細胞からの歯原性細胞の誘導

これまでの研究から、歯原性上皮のみ、もしくは歯原性間葉のみの培養では、歯牙硬組織への分化は見られず、上皮間葉の相互作用が歯牙の発生には重要であることが分かっている (Nakao et al. Nature Method, 2007)。また、重要な知見として、歯胚形成初期の歯原性上皮細胞は、非歯原性間葉細胞を歯原性の間葉細胞に分化させる能力を有し、発生の進んだ蕾状期歯胚の歯原性上皮はその能力を有さないことが報告されている(Mina et al. Arch Oral Biol, 1987)。我々は最初に、フローサイトメーターにて濃縮したMSCsが歯胚内の歯原性間葉系細胞に分化可能かを検証する。方法は歯胚由来の歯原性間葉系細胞を濃縮した新鮮MSCsに置き換え、歯牙硬組織を形成できるかを検証する極めて簡便な方法である。歯原性上皮は蕾状期歯胚を使用し、MSCs自身が歯原性間葉組織に分化可能かを証明する。

### (2) 成体由来非歯原性上皮からの歯原性上皮細胞の誘導

1年目の研究実施方法により、濃縮MSCsが歯牙硬組織に分化可能と分かれば、次に歯胚上皮由来の細胞誘導を試みる。誘導に関してはMinaらにより、蕾状期にまで発生の進んだ歯原性間葉細胞は、非歯原性の上皮組織を歯原性上皮に分化誘導する能力を有していると報告されている。この事実から成体の皮膚細胞も蕾状期間葉細胞の相互作用を利用し、歯原性上皮に分化できる可能

性を有することが示唆される。よって、今度は歯胚上皮細胞を成体由来皮膚上皮細胞に置き換えて、蕾状期歯胚の歯原性間葉系細胞との共培養により、本当に成体由来皮膚上皮からエナメルマトリックスを産生するエナメル芽細胞が誘導できるかを検証する。この段階にて、成体由来皮膚細胞が歯原性上皮細胞に分化できることが証明されれば、いよいよ濃縮したMSCsと成体皮膚上皮細胞との共培養により、全ての細胞が成体非歯胚細胞由来の歯牙硬組織を誘導する。

### (3) 歯原性細胞の網羅的遺伝子解析と特異的遺伝子の導入による歯原性細胞誘導

2年目までの研究計画により、骨髄由来MSCsがそのままの状態では歯原性間葉組織に分化できるかは分からず、皮膚上皮細胞もそのままの状態では果たしてエナメルマトリックスを産生できるかと言うと、そう簡単に話は進まないと考えられる。また、歯胚組織の上皮・間葉における遺伝子学的発生メカニズムがはっきりしないため、歯牙・歯周組織再生が現在までそれほど進んでいない要因の一つと考えられる。そこで、歯胚を構成する歯原性上皮細胞と歯原性間葉細胞、比較対象として皮膚上皮細胞、骨髄MSCsの遺伝子発現をDNA Microarrayにて網羅的に解析する。歯原性細胞において優位に発現量の異なる遺伝子を選別し、まず最初にiPS細胞と同様の方法によって皮膚線維芽細胞、もしくは未分化状態を維持し当研究室で初期化されやすいことが分かっているMSCs(Niibe et al. PlosONE)に遺伝子導入を行うことにより、遺伝子導入した細胞がそれぞれ歯胚の上皮系もしくは間葉系の歯原性細胞に分化可能かを検証する。

### (4) 誘導歯胚の移植による歯周組織再生及び機能性の検証

Ikedaらの報告では、彼らの方法で培養した歯胚細胞はマウスの口腔内に移植することが可能であり、時間経過とともに歯牙硬組織を形成し、萌出することが分かっている。また、萌出した歯牙は歯根膜組織を介して顎骨とつながり、疼痛への応答性も確認されている。この知見で重要なことは、歯牙のみならず、移植により歯周組織まで再生された点である。我々の方法で成体由来細胞から歯牙硬組織誘導が可能となれば、誘導歯牙をマウス口腔内に移植し、生体内で誘導歯胚が萌出可能かを確認する。萌出後にfunctionalな歯牙が萌出されるかを歯髄及び歯根膜疼痛刺激に対する応答を脊髄後角のc-Fosの発現を解析することにより検証する。

## 4. 研究成果

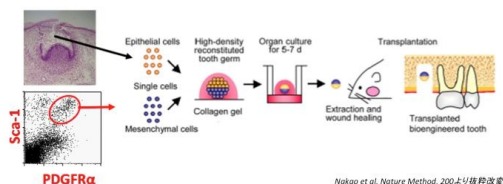
間葉系幹細胞は自己複製能を有するが、その能力には限界が存在する。また、従来の接着培養では、長期に及ぶ培養において細胞の分化誘導が進み、細胞性質が変化する。本研究は、純化間葉系幹細胞を歯胚再生に必要な数まで増殖する必要があったが、従来の接着培養では結果を得ることができなかった。そこで、間葉系幹細胞の未分化性を維持する新たな培養法の確立が急務となった。

申請者はある環境で間葉系幹細胞の未分化性を維持させ、さらには未分化性を復活できる段階にある。またこの方法は、3次元的な細胞塊を形成しながら維持することができる。計画からは遅れることとなったが、現在この細胞塊を用いた研究を継続して行っている。

本研究は、成体由来細胞から歯胚・歯周組織を再生させること目指して行ってきた。我々の研究室は、マウス及びヒトにおける骨髄間葉系幹細胞(MSCs)をフローサイトメーターにて分離することが可

能であり、この純化された MSCs は in vitro において間葉系細胞系統である骨・軟骨・脂肪のみならず神経堤系統である神経・グリア・平滑筋といった細胞にも分化可能であり、その起源は神経堤細胞を含んでいた。一方、頭頸部間葉組織の大部分の発生は神経堤から発生すると考えられている。そこで我々は、再生医療を実現する方法として、純化 MSCs を、歯胚を構成する歯原性間葉の細胞供給源として利用可能ではないかと考えた。

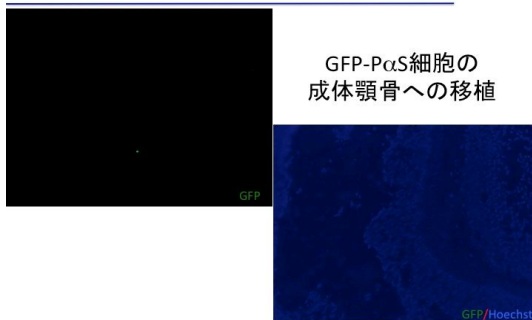
歯原性間葉細胞を非歯原性細胞に置き換える



歯原性間葉細胞を成体由来の濃縮間葉系幹細胞に置き換えられるか検討

まず、歯原性上皮細胞をこれまでに報告された方法で分離し、我々の持つ純化間葉系幹細胞を用いて再現可能か検証を行った。結果としては、Nakao らの報告で用いられた歯原性上皮・間葉の分離が再現することが難しく別の方法からアプローチすることを余儀なくされた。

GFP-P $\alpha$ S細胞移植後の野生型マウス歯胚の顕微鏡像



次に行ったのが胎児へ直接細胞を移植する方法である。この方法では、細胞が目的の歯胚の位置まで到達せず、不可能であった。

面白いことにマウス切歯は生後も歯根部に幹細胞が存在し永続的に歯が伸び続ける。そこで、成体切歯歯胚（歯根部）

への細胞移植を行った。移植自体は成功したが、細胞の生着は確認できなかった。

一方、我々は MSCs を接着培養で増殖させる際、細胞の性質が変わっていくことを発見した。特に MSC マーカーである PDGFR の発現が継代を繰り返すごとに減少していき、それに伴い脂肪への分化能が落ちていくことを見出した。そこで、これまでに用いてきた接着培養は幹細胞としての性質を維持できず、細胞が生着しないのではないかと考えた。我々は現在、ある特定の条件で MSCs の未分化性を維持、そして復活できる培養条件を探し当てた。そして、この方法を用いると、MSCs は 3 次元的な細胞塊を構築し、分化能を維持できることがわかった。Nakao らが用いた歯胚再構成（器官原基法）は上皮系細胞と間葉系細胞を 3 次元構築し、接触させることで上皮間葉相互作用を起こさせる。我々の培養法は少なくとも培養の段階ですでに 3 次元構築されるため、器官原基法への応用がしやすいのではないかと考えている。現在、計画からは遅れることとなったが、この細胞を用いて本研究の目的を最終的な検証まで行う予定である。

## 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 6 件)

Yasui T, Mabuchi Y, Toriumi T, Ebine T, Niibe K, Houlihan D. D., Morikawa S, Onizawa K, Kawana H, Akazawa C, Suzuki N, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y.

Purified human dental pulp stem cells promote osteogenic regeneration

査読有、*J Dent Res*. 95(2): 215-222, 2016.

DOI: 10.1177/0022034515610748

Wang F, Okawa H, Kamano Y, Niibe K,  
Kayashima H, Osathanon T, Pavasant P,  
Saeki M, Yatani H, Egusa H.  
Controlled Osteogenic Differentiation of  
Mouse Mesenchymal Stem Cells by  
Tetracycline-Controlled Transcriptional  
Activation of Amelogenin  
査読有、*PLoS One*. 10(12): e0145777,  
2015.  
DOI:10.1371/journal.pone.0145677  
Niibe K\*, Ouchi T, Iwasaki R, Nakagawa T,  
Horie N.  
Osteonecrosis of the jaw in patients with  
dental prostheses being treated with  
bisphosphonates or denosumab.  
査読有、*J Prosthodont Res*. 59(1), 3-5,  
2015.  
DOI:10.1016/j.jpor.2014.08.001  
Araki D, Kawamura Y, Niibe K, Suzuki S,  
Morikawa S, Mabuchi Y, Nakagawa T,  
Okano H, Matsuzaki Y\*.  
Primary evaluation of induced pluripotent  
stem cells using flow cytometry.  
査読有、*Inflamm Regen*. 33(1): 3-12, 2013.  
Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe  
K, Suzuki S, Renault-Mihara F, Houlihan  
DD, Akazawa C, Okano H, Matsuzaki  
Y\*.  
LNGFR(+)/THY-1(+)/VCAM-1(hi+) Cells  
Reveal Functionally Distinct  
Subpopulations in Mesenchymal Stem  
Cells.  
査読有、*Stem Cell Reports*. 1(2): 152-165,  
2013.  
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.20  
13.06.001  
Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S,  
Niibe K, Araki D, Suzuki S, Okano H,  
Matsuzaki Y\*.  
Isolation of mouse mesenchymal stem

cells on the basis of expression of Sca-1  
and PDGFR- $\alpha$ .  
査読有、*Nat Protoc*. 7(12): 2103-2111,  
2012.  
DOI:10.1038/nprot.2012.125

[学会発表](計8件)

Kunimichi Niibe

Potential of purified mesenchymal stem  
cells for regenerative dentistry

*Chulalongkorn-Tohoku Joint Symposium  
in Dental Science 2015*, 9 Dec 2015, バン  
コク(タイ)

黄地健仁、新部邦透、岩崎良太郎、有馬  
誠亮、西山留美子、鈴木啓介、鈴木潔、  
中川種昭、堀江伸行

義歯床下に薬剤関連顎骨壊死を発症し  
た10症例の欠損歯列の評価

日本補綴歯科学会第124回学術大会、  
2015年5月31日、ソニックシティホール(埼玉)

新部邦透、末廣史雄、大島正充

「再生歯科補綴」の技術確立に向けて -  
補綴歯科治療に求められる歯・歯槽骨の  
再生とは-

第124回日本補綴歯科学会、2015年5  
月30日、ソニックシティホール(埼玉)  
新部邦透、江草宏

間葉系幹細胞純化技術の再生歯科医療  
への応用

第4回補綴若手研究者の会、2015年3  
月21日、ホテルニューアカオ(静岡)  
黄地健仁、森川暁、新部邦透、奥野博庸、  
赤松和土、中川種昭、岡野栄之

ヒトiPS細胞由来神経堤細胞群におけ  
る効率的な純化間葉系幹細胞の回収

第14回日本再生医療学会総会、2015  
年3月21日、パシフィコ横浜(神奈  
川)

黄地健仁、新部邦透、岩崎良太郎、有馬

誠亮、龍留美子、鈴木啓介、鈴木潔、中川種昭、堀江伸行

欠損歯補綴物を有するビスフォスフォネート製剤及びデノスマブ投与者の臨床統計

公益社団法人日本補綴歯科学会東京支部総会第18回学術大会、2014年11月9日、昭和大学（東京）

新部邦透、森川暁、中川種昭

中胚葉系細胞を起源とする間葉系幹細胞の分化能

第67回NPO法人日本口腔科学会学術集会，2013年5月23日、栃木県総合文化センター（栃木）

森川暁、馬淵洋、新部邦透、松崎有未、岡野栄之、河奈裕正、中川種昭

ヒト間葉系幹細胞の予期的分離と機能解析

第67回NPO法人日本口腔科学会学術集会，2013年5月23日、栃木県総合文化センター（栃木）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新部 邦透 (NIIBE, KUNIMICHI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50468500