

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25293386

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞分離法の確立とシグナルネットワーク制御による硬組織再生の新規パラダイム

研究課題名(英文) Establishment of dental pulp stem cell-isolation method and clinical approach of dental pulp tissue regeneration using dental pulp stem cells by signaling network control

研究代表者

川島 伸之 (KAWASHIMA, Nobuyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：60272605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：コロニーアイソレーション法にてヒト歯髄組織より分離した歯髄幹細胞は、間葉系幹細胞マーカーを高く発現しているとともに多分化能も具備していることから、再生療法への応用が可能な品質が担保されていた。また、分離した歯髄幹細胞をスフェロイド三次元培養した結果、インテグリンシグナルが活性化し、硬組織形成細胞への分化が誘導された。一方、コラーゲン内にて三次元培養した結果、硬組織形成細胞への分化が抑制された。インテグリンをはじめとするシグナルを制御するとともに、スキャフォールドとしてコラーゲンを使用することで、歯髄組織全体の再生を誘導できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The dental pulp stem cells (DPSCs) isolated from human dental pulp tissue using colony isolation method expressed typical mesenchymal stem cell markers, and they possessed potential to differentiate into various tissues/cells, indicating that DPSCs isolated by colony isolation method may be a good source for regenerative medicine. 3-D spheroid culture of isolated DPSCs stimulated the integrin signaling, which further induced differentiation to hard tissue forming cells. On the other hand, 3-D collagen culture prohibited their differentiation to hard tissue forming cells. Control of the cellular signaling network including integrin signaling and application of appropriate scaffold may pave the way for a new approach of whole pulp tissue regeneration.

研究分野：歯内療法学

キーワード：dental pulp stem cells stem cell isolation 3-D culture spheroid integrin signaling differentiation collagen scaffold dental pulp regeneration

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えるにあたって、“健康に嘸める”ことの重要性は近年ますます高まっている。補綴技術の進歩とインプラントの隆盛には目を見張るものがあるが、自分の歯で咀嚼できることが最も望ましいのは明らかである。現在、歯の喪失の大きな要因となっているのは、歯周疾患、う蝕そして歯の破折である。う蝕に対して歯髄は痛みという警鐘を鳴らすとともに修復象牙質を形成して細菌侵襲にたいするバリアを築く。しかし、歯髄が失活してしまう、あるいは歯髄を失った無髄歯においては、そのシステムが働かないため、う蝕はどこまでも進行し、歯の喪失をもたらす。また歯の破折は、外傷により惹起されるものを除いて失活歯に多く認められる。失活歯の物性の劣化および支台の築造が主な原因である。すなわち、歯髄を失うことは、歯の喪失の大きな要因であり、歯髄をいかに再生させるかは今後の歯科医療において大きな課題であるといえよう。

歯髄組織に存在する幹細胞の存在は 10 年ほど前に報告され、その後多数の研究者により検証されている (Kawashima N., Arch Oral Biol. 2012;57(11):1439-58)。未分化間葉系幹細胞である歯髄幹細胞は、神経、血管、脂肪といった組織・細胞に分化する能力を有しているが、特に硬組織形成細胞に分化する能力が高い。硬組織分化能が高いという特性を利用して、歯髄における象牙質 (デンティンブリッジ) 再生あるいは骨欠損部における骨組織再生が最も臨床的展開として期待されている。しかし歯髄幹細胞の象牙芽細胞あるいは骨芽細胞への分化メカニズムの詳細は不明であり、今後の研究が待たれている。ところで、歯髄幹細胞のソースであるが、不要との理由で抜去される智歯から歯髄組織を採取することにより、歯髄幹細胞を分離することは容易である。ただ、歯髄幹細胞採取方法は研究者によりまちまちであり、そのためそれぞれの研究者の歯髄幹細胞は異なった集団であると考えられる。すなわち、歯髄幹細胞分離のスタンダードを確立し、分離した歯髄幹細胞からの、象牙芽細胞および骨芽細胞分化のメカニズムを明らかにすることで、歯髄幹細胞を使用した象牙質再生、骨再生の臨床的な展開が大きく図られるものと期待される。

歯髄組織は硬組織に囲まれた組織であり、硬組織の殻があってこそその歯髄組織としての integrity が保持される。そのためにこそ、歯髄組織再生においてその表層における象牙質形成が重要である。一方、根尖病変の存在する歯の根尖部、歯周疾患に罹患した歯根周囲をはじめとして病変により骨欠損が生じている症例を臨床において多く認める。このようなケースにおいて、骨形成を誘導するシステムの構築は臨床化の夢である。さらに、インプラント前処置をはじめとして、骨量を増大させたい症例も多く存在する。歯髄幹細胞

は幹細胞としての特性を有しているが、その根本において硬組織形成細胞への分化する特性を有している。すなわち、歯髄幹細胞を臨床応用する場合、象牙質、骨組織といった硬組織誘導への適用が最も適していると推察される。

2. 研究の目的

未分化間葉組織である歯髄組織中に存在する歯髄幹細胞は、神経、脂肪、骨、軟骨といった多様な細胞に分化する能力を有しているが、ES 細胞あるいは iPS 細胞と異なり、体性幹細胞としてのオリジナルの特性をも維持している。すなわち、歯髄幹細胞は歯髄組織内においては象牙芽細胞のソースとして機能しており、硬組織形成細胞への分化能を有している。しかし抜去歯より分離された歯髄幹細胞は、通常の平面培養を経るうちに一般的な線維芽細胞へと変化していく。一方、三次元培養においては、より生体環境に近い状態で細胞を培養することができるため、よりオリジナルの特性を維持あるいは誘導することが可能であると推察される。今回、ヒト抜去歯より分離した歯髄幹細胞を三次元 (スフェロイド) で培養し、その象牙芽細胞・骨芽細胞マーカー発現について検討した。

3. 研究の方法

抜去歯の歯髄組織より歯髄幹細胞を採取し実験を行うことについて、患者に十分に説明し了解を得たうえで抜去歯を研究に供した (東京医科歯科大学歯学部倫理審査承認番号 第 442 番)。歯髄幹細胞の分離は、間葉系幹細胞分離法に準じて行った。すなわち、抜去歯より摘出した歯髄組織をメスにて細切後、コラゲナーゼ I (2mg/ml) 処理 (37 度、振とう、1h) を行い、セルストレーナー 40 μ m (BD Falcon 352340) フィルターにて濾過することで単細胞に分離し、 1×10^5 cells/cm² で細胞培養ディッシュに播種した。間葉系幹細胞マーカー発現は FACS にて検討した。パッセージ 3-4 の細胞を、 4×10^4 cells/well の濃度にて 96 穴 PrimeSurface (住友ベークライト) あるいは 6 穴マルチプレート (グライナー) に播種し、3-7 日間培養を行った。その後、サンプルより RNA を抽出し、象牙芽細胞・骨芽細胞特異的マーカーの mRNA 発現をリアルタイム PCR にて検討した。またアスコルビン酸および β グリセロリン酸を添加して石灰化誘導を行い、石化化物をアリザリン染色にて検討した。

4. 研究成果

(1) 分離した歯髄幹細胞における間葉系幹細胞マーカー発現: ヒト歯髄組織よりコロニーアッセイ法で分離した後、継代をする前の歯髄幹細胞における間葉系幹細胞マーカーの発現を FACS にて検討した。その結果、間葉系幹細胞マーカーである、CD44、90、73、105、166 の陽性率は 80-100% と高

く、CD146も60%以上の細胞で発現していた(図1)。一方、間葉系幹細胞マーカーの一つであるSTRO-1陽性細胞は5%程度に限られていた(図1)。造血幹細胞マーカーであるCD34、45、117陽性の細胞はほとんど認められなかった(図1)。以上の結果は、コロニーアイソレーション法にて、歯髄組織より間葉系幹細胞マーカーを強く発現する細胞を比較的大量に分離することが可能であるが、それらは異なるコロニー由来の細胞の集団であることからヘテロな状況であると推察される。

分離された歯髄幹細胞を、骨芽細胞分化誘導培地(アスコルビン酸+βグリセロリン酸+デキサメタゾン)、軟骨細胞分化誘導培地(アスコルビン酸+プロリン+デキサメタゾン+TGFβ3+insulin transferrin selenium (ITS) supplement)、神経細胞分化誘導培地(B27 サプリメント)、脂肪細胞分化培地(インシュリン+イソブチルメチルキサンチン+デキサメタゾン)にて培養したところ、各細胞への分化誘導が確認された。以上の結果は、本手法により分離した歯髄幹細胞は、間葉系幹細胞としての特性を具備しているものと推察された。

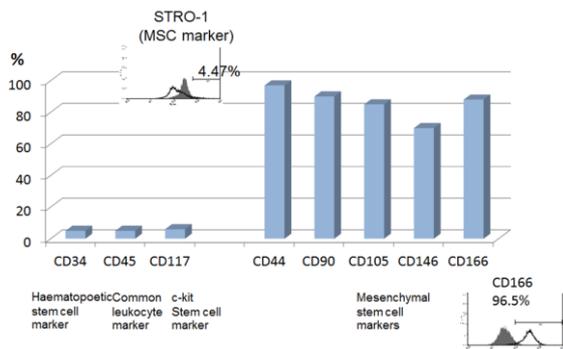
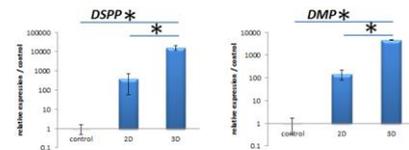


図1：コロニーアイソレーション法にて分離した歯髄幹細胞に発現している表面抗原をFACSにて検討した結果、間葉系幹細胞マーカーを強く発現していることが明らかになった。

(2) 歯髄幹細胞の三次元スフェロイド培養：三次元(スフェロイド)培養した歯髄幹細胞は、平面培養したものと比較し、有意に象牙芽細胞・骨芽細胞分化マーカーの発現の亢進が認められた(図2)。これは平面培養においては、細胞は隣在する細胞とのみ接触するが、三次元培養することにより細胞はより多くの細胞と立体的に接触し、その緊密な接触により誘導されたシグナル(インテグリンシグナル)が、歯髄細胞としての特性を特に強く誘発したと推察される。また石灰化誘導培地での培養により、三次元培養した歯髄幹細胞において、平面培養したものと比較してアリザリン陽性の石灰化物の沈着がより早期に認められた(図3)。三次元培養により象牙芽細胞・骨芽細胞分化能が維持および増強された結果として、石灰化が誘導されたと推察される。歯髄組織の再生を誘導する上で、

三次元スフェロイド培養した歯髄幹細胞を歯髄腔にアプライすることにより、硬組織を誘導することが可能となると推察される。しかし、歯髄組織内部の非石灰化領域を維持するためには、スフェロイド培養した歯髄幹細胞ではなく、硬組織分化誘導を阻害するようなスキャフォールド(コラーゲン等)の使用を検討する必要があると思われる。

象牙芽細胞分化マーカーの発現



骨芽細胞分化マーカーの発現

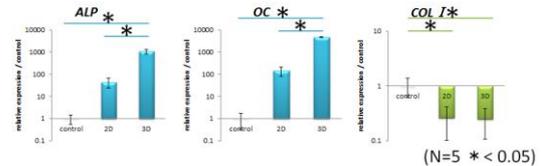


図2：二次元あるいは三次元スフェロイド培養した歯髄幹細胞における象牙芽・骨芽細胞マーカー発現を検討したところ、三次元スフェロイド培養することで、象牙芽・骨芽細胞マーカー発現が強く誘導されることが明らかになった。

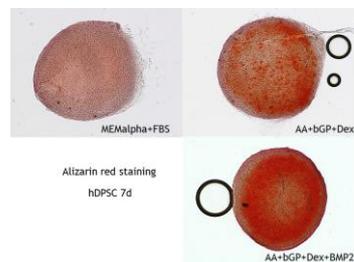


図3：三次元スフェロイド培養した歯髄幹細胞における石灰化誘導能を検討する目的で、アスコルビン酸+βグリセロリン酸+デキサメタゾン存在下で歯髄幹細胞を三次元スフェロイド培養した結果、スフェロイド内に強い石灰化が誘導されることが明らかになった(アリザリンレッドS染色)。二次元培養条件における歯髄幹細胞は石灰化誘導培地にて培養を行っても、ほとんど石灰化結節を誘導することはできなかった。

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11件)

- ① Bakhit A, Kawashima N, Hashimoto K, Noda S, Nara K, Kuramoto M, Tazawa K, and Okiji T, Strontium ranelate promotes odonto-/osteogenic differentiation/mineralization of dental papillae cells in vitro and mineralized

tissue formation of the dental pulp in vivo, *Sci Rep*, 2018 in press, doi: 10.1038/s41598-018-27461-7. 査読あり

- ② Hashimoto K, Kawashima N, Ichinose S, Nara K, Noda S, Okiji T., EDTA Treatment for Sodium Hypochlorite-treated Dentin Recovers Disturbed Attachment and Induces Differentiation of Mouse Dental Papilla Cells., *J Endod.* 2018 Feb;44(2):256-262. doi: 10.1016/j.joen.2017.11.003. 査読あり
- ③ Kawashima N, Noda S, Yamamoto M, Okiji T, Properties of dental pulp-derived mesenchymal stem cells and the effects of culture conditions, *J Endod.* 2017 Sep;43(9S):S31-S34. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.004. 査読あり
- ④ Tazawa K, Ikeda H, Kawashima N, Okiji T., Transient receptor potential melastatin (TRPM) 8 is expressed in freshly isolated native human odontoblasts., *Arch Oral Biol.* 2017; 75:55-61. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.12.007. 査読あり
- ⑤ Zhou M, Kawashima N, Suzuki N, Yamamoto M, Ohnishi O, Katsube K, Tanabe H, Kudo A, Saito M, Suda H, Periostin is a negative regulator of mineralization in the dental pulp tissue, *Odontology*: 103, 152-159. doi: 10.1007/s10266-014-0152-7. 査読あり
- ⑥ Suzuki N., Takimoto K, Kawashima N., Cathepsin K Inhibitor Regulates Inflammation and Bone Destruction in Experimentally-induced Rat Periapical Lesions, *J Endod.* 2015 Sep;41(9):1474-9 doi: 10.1016/j.joen.2015.04.013 査読あり
- ⑦ K Takimoto, N Kawashima, N Suzuki, Y Koizumi, M Yamamoto, M Nakashima, H Suda, Down-regulation of Inflammatory Mediator Synthesis and Infiltration of Inflammatory Cells by MMP-3 in Experimentally-induced Rat Pulpitis, *J Endod.* 2014 Sep;40(9):1404-9 doi: 10.1016/j.joen.2014.04.001 査読あり

り

- ⑧ M Yamamoto, N Kawashima, N Takashino, Y Koizumi, K Takimoto, N Suzuki, M Saito, and H Suda, Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation of dental pulp cells, *Arch Oral Biol* 59; 310-317, 2014. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.12.006 査読あり
- ⑨ Y. Koizumi, N. Kawashima, M. Yamamoto, K. Takimoto, M. Zhou, N. Suzuki, M. Saito, H. Harada, H. Suda, Wnt11 expression in rat dental pulp and promotional effects of Wnt signaling on odontoblast differentiation, *Cong Anom (Kyoto)* 2013; 53, 101-108. doi: 10.1111/cga.12011. 査読あり

〔学会発表〕(計 34 件)

- ① Kawashima N, Noda S, 他 3 名, Meis2 Induces Odonto-/Osteoblastic Differentiation and Mineralization, IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition, San Francisco, Calif., USA - March 22-25, 2017
- ② Noda S, Kawashima N, 他 3 名, Dense Culture Condition Promotes Human Dental Pulp Stem Cell Differentiation, IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition, San Francisco, Calif., USA - March 22-25, 2017
- ③ 橋本健太郎、川島伸之、他 4 名, NaOCl 処理象牙質に対する EDTA 処理はマウス歯乳頭由来細胞の接着を回復し細胞の分化を誘導する、第 82 回口腔病学会学術大会、平成 29 年 11 月 19 日 20 日、東京医科歯科大学
- ④ 藤井真由子、川島伸之、興地隆史、ヒト歯髓細胞における炎症性メディエーター産生制御における HIF1a の役割、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年 9 月 16~18 日、松本歯科大学キャンパス
- ⑤ 野田園子、川島伸之、他 5 名、培養密度が歯髓幹細胞の幹細胞特性に与える影響、第 146 回日本歯科保存学会 2017 年春季学術大会、2017 年 6 月 8 日、9 日、リンクステーションホール青森、青森
- ⑥ 倉本将司、川島伸之、他 7 名、Mineral trioxide aggregate は LPS 刺激マクロファージの機能を calcium-sensing receptor を介して調節する、第 146 回日

本歯科保存学会 2017 年春季学術大会、
2017 年 6 月 8 日、9 日、リンクステーションホール青森、青森

- ⑦ Bakhit A, Kawashima N, 他 4 名, Strontium ranelate evoked proliferation and mineralization of mouse dental papillae cells is mediated via calcium sensing receptor 第 147 回日本歯科保存学会 2017 年秋季学術大会、2017 年 10 月 26 日、27 日、マリオス盛岡、盛岡
- ⑧ K. Tazawa, H. Ikeda, N. Kawashima, M. Ozawa, H. Suda, T. Okiji, Expression of TRPM8 in Freshly Isolated Human Odontoblasts, 94th General session & exhibition of the IADR, June 22-25, 2016, Seoul, South Korea
- ⑨ Aramaki O, Kawashima N, Shimada Y, Okiji T, Tagami J, Three-dimensional analysis of Iba1+ macrophages in human dental pulp using whole mount immunostaining, 94th General session & exhibition of the IADR, June 22-25, 2016, Seoul, South Korea
- ⑩ Kawashima N, Noda S, 他 3 名, Properties of dental pulp derived-mesenchymal stem cells and effects of culture conditions, IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, June 26-28, 2016, Nagoya Congress Center, Nagoya.
- ⑪ Nara K, Kawashima N, 他 4 名, Increase of miR21 expression in dental pulp cells and tissues in response to LPS stimulation, IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, June 26-28, 2016, Nagoya Congress Center, Nagoya.
- ⑫ Noda S, Kawashima N, 他 4 名, Effects of confluent culture condition on dental pulp stem cell surface markers, proliferation, gene expression, IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, June 26-28, 2016, Nagoya Congress Center, Nagoya.
- ⑬ K. Hashimoto, N. Kawashima, K. 他 4 名, Recovery effects of EDTA treatment on attachment and differentiation of mouse dental pulp cultured on NaOCl-treated dentin, IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, June 26-28, 2016, Nagoya Congress Center, Nagoya.
- ⑭ Bakhit A., Kawashima N., 他 5 名, Action of Strontium Ranelate on the Dental-Pulp Complex, IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, June 26-28, 2016, Nagoya Congress Center, Nagoya.
- ⑮ 川島伸之、齋藤正寛、興地隆史、マウス歯髄細胞/組織および骨芽細胞/組織における Meis2 発現、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、平成 28 年 8 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター
- ⑯ 藤井真由子、川島伸之、興地隆史、ヒト歯髄細胞における lipopolysaccharide による HIF1a 発現の誘導、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、平成 28 年 8 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター
- ⑰ 川島伸之、他 4 名、歯髄幹細胞の三次元培養における幹細胞マーカーの発現動態、第 23 回日本歯科医学会総会、平成 28 年 10 月 21 日から 23 日、福岡国際会議場
- ⑱ 倉本将司、川島伸之、他 6 名、Lipopolysaccharide 存在下におけるマウス歯乳頭細胞の mineral trioxide aggregate に対する反応性、第 145 回日本歯科保存学会 2016 年秋季学術大会、2016 年 10 月 27 日 28 日、キッセイ文化ホール、松本
- ⑲ 若林安見子、川島伸之、他 5 名、S-PRG フィラー含有試作根管充填用シーラーの細胞毒性および骨芽細胞分化誘導能の検討、第 145 回日本歯科保存学会 2016 年秋季学術大会、2016 年 10 月 27 日 28 日、キッセイ文化ホール、松本
- ⑳ Nara K, Kawashima N, 他 3 名, microRNA21 down-regulates the expression of inflammatory mediators in LPS-stimulated human dental pulp cells via an NF- κ B dependent mechanism, Oct. 21-23, 2016, 2016 Autumn Scientific Meeting (the 146th) and Joint Scientific Meeting of KACD-JACD (the 18th), The K Hotel Convention Center, Seoul, Korea,
- ㉑ Kawashima N, Hashimoto K, Okiji T, Rescue of mouse dental papillae cell-attachment to sodium hypochlorite-treated dentin disks by EDTA treatment, The 49th Scientific meeting of Korean Academy of Endodontics & The 14th JAE-KAE Joint Scientific Meeting, November 19th and 20th 2016, Nuridream Square, Seoul

- ②② K. Hashimoto, N. Kawashima, 他 6 名
ALPase Activity of Pulp Cells on EDTA
and NaClO-treated Dentin, 2015
IADR/AADR/CADR General Session in
Boston, Mass., USA, March 11-14, 2015.
Hynes Convention Center, Boston, MA
- ②③ N. Kawashima, 他 7 名, Mineralizing
Properties of Gingiva-derived
Mesenchymal Stem Cells Cultured in
3D-condition, 2015
IADR/AADR/CADR General Session in
Boston, Mass., USA, March 11-14,
2015.
- ②④ Kawashima N., Intracanal medicament,
Asian Pacific Endodontic
Confederention, April 8-10, 2015, Le
Royal Hotel Amman, Jordan.
- ②⑤ 川島伸之、他 6 名、三次元培養による歯
髓・歯肉幹細胞の生物学的特性、第 14
回 日本再生医療学会総会、
2015/3/19-21、パシフィコ横浜、横浜
- ②⑥ 川島伸之、興地隆史、歯髓・歯肉由来の
間葉系幹細胞の特性と硬組織再生、日本
歯科基礎医学会サテライトシンポジウ
ム シンポジウム、2015 年 9 月 11 日、
朱鷺メッセ、新潟
- ②⑦ Kawashima N and Suzuki N, Bone
Tissue Regeneration Using the Spheroid
Cultured Dental Pulp Stem Cells, AAE
Annual Session 2014, Washington DC,
April 30-May 3, 2014.
- ②⑧ 川島伸之、歯内療法から考える歯根の発
生とその異常、第 56 回歯科基礎医学会
学術大会 サテライトシンポジウム、福
岡国際会議場、福岡、2014 年 9 月 25 日
- ②⑨ Kawashima N, 他 8 名, Promoting
effects of Wnt signaling on odontoblast
differentiation, Asian Pacific
Endodontic Conference, Seoul, Korea,
March 23-24, 2013.
- ③⑩ 川島伸之、歯髓幹細胞を用いた再生医療
の現状、日本歯科保存学会 2013 年春季
学術大会(第 138 回)2013 年 6 月 27 日、
28 日 福岡市 福岡国際会議場
- ③⑪ スフェロイド培養による歯髓細胞の特
性変化の検討、山本弥生子、川島伸之、
他 5 名、日本歯科保存学会 2013 年春季
学術大会(第 138 回)2013 年 6 月 27 日、
28 日 福岡市 福岡国際会議場
- ③⑫ 川島伸之、他 5 名、ヒト歯髓幹細胞の三
次元培養による象牙芽細胞・骨芽細胞マ
ーカーの変動、日本歯科保存学会 2013
年春季学術大会(第 138 回) 2013 年 6
月 27 日、28 日 福岡市 福岡国際会議
場
- ③⑬ Yamamoto M, Kawashima N, 他 8 名,
Spheroid culture induces
odonto-/osteoblastic differentiation of
dental pulp cells through integrin
signaling, 16th ESE Biennial Congress,
Lisbon, Portugal, 12-14 September 2013
- ③⑭ 川島伸之、歯髓幹細胞による歯髓・骨再
生の現状と課題、第 11 回口腔医科学フ
ロンティア学術集会、平成 25 年 3 月 2
日 宮崎・青島パームビーチホテル

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 伸之 (KAWASHIMA, Nobuyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・講師

研究者番号：66172605

(2) 研究分担者

関矢 一郎 (SEKIYA, Ichiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授

研究者番号：10345291

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし