

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 21 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462972

研究課題名(和文) 三次元培養システムによる歯根膜由来幹細胞とMTA界面の歯根膜再生に関する動態解析

研究課題名(英文) Kinetic analysis of periodontium regeneration on MTA using periodontal stem cells derived from human tooth by three dimensional cultivation systems

研究代表者

北島 佳代子 (KITAJIMA, KAYOKO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：00177841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 抜去歯の歯根膜細胞を初代培養し、派生した細胞からholo cloneを採取し、幹細胞マーカーでラベリングした後、FCMでソートした。この細胞を継代し、顕微鏡観察したところ、長い突起を伸ばし、網状の特徴的なコロニーを形成することが確認された。MTAを蒸留水で混和し円柱状に成形した。本細胞を含むコラーゲンゲルで円柱状MTAをコーティングし、O<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>のガス交換可能な培養プレート中に静置し、培養液ならびに分化誘導培地を用いて培養した。経時的に回収し、パラフィン包埋後薄切切片を作製し、染色して検鏡した。MTA周囲に細胞とアリザリンレッド陽性の石灰化物、微小石灰化球、線維状構造物が確認された。

研究成果の概要(英文)： Primary culture of cells derived from periodontal ligament was carried out. Holo clones were selected from outgrowth cells. After labeling with stem cell marker, they were sorted by FCM. After several subcultures, the lengthened projections from cells and the characteristic meshes-like colonies were observed under the microscope. MTA powders were mixed with distilled water and fabricated cylindrical. They were coated with the collagen gel containing these cells and calmly placed into the cultivation plate in which the gas exchange of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> is possible. These cells were cultured using medium solution or culture medium for an induction of differentiation. One of each was collected at interval, fixed into 10% formalin solution. Serial thin sections were prepared after paraffin embedding and stained. The cells surrounding MTA, the calcified substances stained by an alizarin red, the calcified micro spherical bodies, and fiber structures were observed microscopically.

研究分野：歯内療法学

キーワード：歯根膜 再生 MTA 幹細胞 三次元培養 石灰化 alizarin red

## 1. 研究開始当初の背景

Trope M. (2002) は、健康な歯根膜が存在する場合に歯を再植すると歯根膜が再度連結し、健康な状態での歯の復位が期待でき、その後、歯の機能を維持できると報告している。一方、板垣らは、歯の再植において損傷の激しい歯根膜を擦過除去し debridement すると、骨性癒着が生じやすく、置換性の外部吸収が起こることを報告している(1994)。

申請者北島らは、平成 21～23 年度科学研究費助成金により、flow cytometer (FCM) を用いてヒト歯根膜細胞から幹細胞様細胞を分取し、細胞特性について検討した。さらに、歯根膜から得られた線維芽細胞と上皮細胞を用いて三次元再構成培養を行い、上皮組織の形成を確認しており、免疫染色による検討を行っている。さらにヌードマウスの皮下欠損部に三次元再構成培養組織を移植した後、その組織検索を行い、移植片の生着を確認し、皮膚付属機関を含まない上皮組織による治癒形態を観察している。

一方、歯髄歯周組織修復剤として開発された Mineral trioxide aggregate(MTA)にはセメント質誘導能があり、歯根穿孔の封鎖に有効で、ダメージを受けた歯根膜やセメント質の修復に期待が持たれる。人工物に対して歯根膜の再生を行う研究は多くないが、MTA でコーティングしたジルコニアセラミックスをコラーゲンゲル内に包摂し、ヌードマウス皮下の骨窩洞へ埋入する実験系で再生動態を観察することが可能と考えられる。

研究分担者五十嵐らは、平成 24～26 年度科学研究費助成金により、MTA で逆根管充填を施行後、抜歯窩に再植を行った結果、実験期間内では硬組織の添加はみられなかったが、炎症や膿瘍形成例などはなく、抜歯窩への生着と線維性癒着を確認している。また、歯根の象牙質小片を歯槽骨窩洞内に埋入した結果、炎症性細胞浸潤は認めず新生肉芽組織で被包され、線維性癒着を示し、マク

ロファージや破歯細胞の発現はなかったが、セメント質などの硬組織添加や歯根膜様組織の再生もみられなかった。

現在 MTA は、日本においては歯髄覆罩剤としてのみ認可されているが、欧米においては、逆根管充填、歯根穿孔部の閉鎖などに幅広く使用され、良好な結果が期待できることが報告されている。

本研究では、逆根管充填、歯根穿孔部の閉鎖さらには外傷歯の再植、インプラント体埋入等への将来的な応用を見込み、歯根周囲に MTA を応用した場合の歯根、歯根膜、歯槽骨の治癒や組織再生への歯根膜由来幹細胞の関与を考究し、将来的には歯根膜幹細胞の関与による歯根膜再生の可能性や歯根吸収、アンキローシスの防御やコントロールへの可能性を検索する目的でその動態解析を行うこととした。

## 2. 研究の目的

歯を喪失した場合の補綴処置の 1 つであるスクリュー型インプラント治療では、骨とインプラント体の間に歯根膜の形成はなく、osseointegration の治癒形態をとる。また、外傷等で歯根膜細胞のダメージを受け、歯根膜を失った場合にも、歯根と歯槽骨が直接癒着するアンキローシスを起こすことが知られており、生理的な咬合機能を営むためには歯根膜の存在が不可欠である。

一方、歯髄歯周組織修復剤として開発された MTA にはセメント質誘導能があり、歯根穿孔の封鎖に有効で、ダメージを受けた歯根膜やセメント質の修復に期待が持たれる。

本研究は、歯根膜由来幹細胞と MTA との接触面における細胞動態と組織構築動態を観察し、歯根周囲に MTA を応用した場合の歯根、歯根膜、歯槽骨の治癒や組織再生への歯根膜由来幹細胞の関与を考究し、将来的には歯根膜幹細胞の関与による歯根膜再生の可能性や歯根吸収、アンキローシスの防御や

コントロールへの可能性を検討することを目的として、その動態解析を行うこととした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯根膜細胞からの幹細胞特性を有する細胞の分取

ヒト新鮮抜去歯の歯根中央 1/3 の歯根膜から歯根膜細胞を採取した。

採取した歯根膜細胞を FAD を用いて初代培養後、派生した細胞 colony から、holo clone 形態を有する colony を採取し、数代の継代培養を行い細胞数を確保した。

幹細胞・前駆細胞としての能力がより高く、かつ生細胞のみを同定する蛍光発光試薬を用い、ALDH 活性の高い Primitive な生細胞を FCM を用いて同定した。この ALDH<sup>+</sup> の細胞集団には、多能性造血幹細胞マーカー CD34<sup>+</sup> cells、神経幹細胞、上皮幹細胞、癌幹細胞マーカー CD133<sup>+</sup> cells の他、c-Kit<sup>+</sup> cells、Lin<sup>-</sup> cells、colony forming cells、LTC-IC、NOD/SCID、repopulating cells が含まれている。今回はこれに CD31 と CD44 マーカーを組み合わせ、CD31<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> cells ( ) と CD31<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>/CD44<sup>-</sup> cells ( ) の幹細胞特性を有する細胞集団を FCM にて同定、分取した。

#### (2) Single cell cloning

分取した ( ) ( ) の細胞群は数代継代した後、それぞれ 24well plate に Single cell cloning を行い、holo clone 特性の強い colony を選択して実験に供した。

#### (3) 幹細胞特性の観察

幹細胞の継代培養中に経時的に顕微鏡下で細胞増殖過程を観察、写真記録を行った。

#### (4) MTA の調整

MTA は滅菌ガラス練板上で精製水と混和し、MTA ピンセットを通して抽出すること

により、直径 1mm、長さ 3mm の円柱状に成形した。

#### (5) コラーゲンの作製

冷却下で Cell matrix Type I-A : 10 倍濃度の濃縮培養液 : 再構成用緩衝液を 8 : 1 : 1 の割合で準備し、まず前 2 者を気泡を混入させないように静かに混和し、再構成用緩衝液を追加して同様に混和し、冷却下で保存した。

#### (6) 幹細胞含有コラーゲンの作製

冷却保管しておいたコラーゲンの一部を用いて、幹細胞含有コラーゲンを作製した。遠心回収しペレット状にした上記細胞群 ( ) ならびに ( ) を  $1 \times 10^6$  /mL になるよう調整してコラーゲンに混合し、( ) ならびに ( ) の幹細胞含有コラーゲンを各々作製し、冷却下で保管した。

#### (7) 幹細胞含有コラーゲンでの MTA コーティング

上記で調整した ( ) ならびに ( ) の幹細胞含有コラーゲンを半球状小プレートに分注し、MTA を埋入静置して、37 °C で 30 分間インキュベートした。

#### (8) 幹細胞含有コラーゲンでコーティングした MTA のコラーゲングル内埋入

ガス透過性膜により底面からの酸素供給と CO<sub>2</sub> 排出が可能なガス透過性三次元培養 plate に、冷却保管しておいたコラーゲンを分注し、37 °C で 30 分間静置、インキュベートし、ゲル状 plate を作製した。この上に幹細胞含有コラーゲンでコーティングした MTA を静置し、さらに冷却保管しておいたコラーゲンを注入し、37 °C で 30 分間、インキュベートした。すなわち、MTA 周囲には幹細胞含有コラーゲングル、その周囲をコラーゲングルでサンドイッチした状態である。

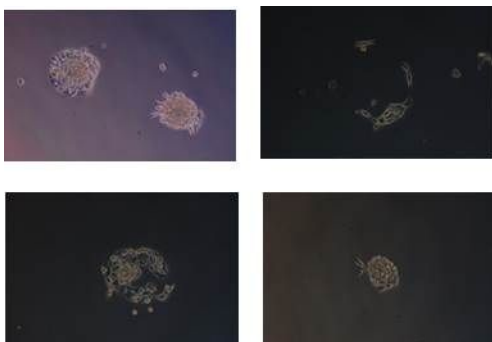
### (9)培養細胞の分化誘導

上記試料は FAD を注入して1週間、三次元培養を行い、1週間後、( ) ( ) の各々半数の plate に、50 $\mu$ g/mL ascorbic acid (AA)、10mM  $\beta$ -glycerophosphate (GP)、100nM Dexametazone を添加し、骨芽細胞様細胞への分化誘導を行った。三次元培養試料の培養液ならびに分化誘導培地は1週間ごとにその半量を condition medium として回収し、同量を追加しながら、1、2、3、4、5週に経時的に資料を回収し、10%中性ホルマリン液で固定後、連続薄切切片を作製し、各種染色を施して顕微鏡観察を行った。

## 4. 研究成果

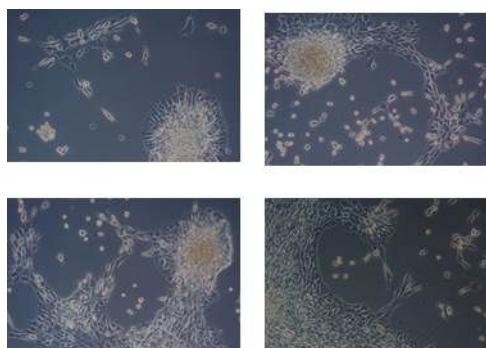
### (1)幹細胞特性の観察

CD31<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>cells ( ) と CD31<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup>/CD44<sup>-</sup>cells ( ) の幹細胞特性を有する細胞集団を FCM にて同定し、培養すると、細胞の密集した外周のスムーズな円形の colony が確認され、幹細胞特性を示すとされる holo clone 形状を示していた。また、colony 周囲に派生した細胞が収束して、固く密集していく過程が観察された。



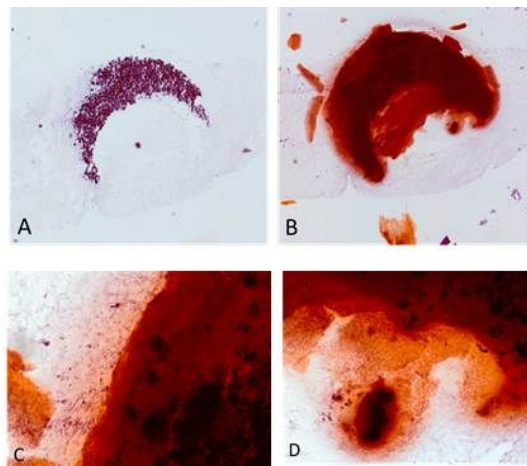
### (2)Single cell cloning 後の幹細胞特性の観察

Single cell cloning 後、細胞同士は互いにコンタクトを取り合うように長い突起を伸長させ、次第に網状に集積していく特徴的な細胞増殖の様子が観察された。

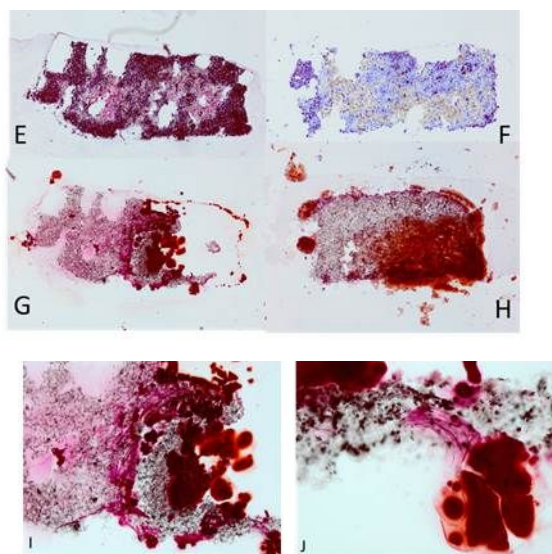


### (3)三次元培養後の薄切切片の染色所見

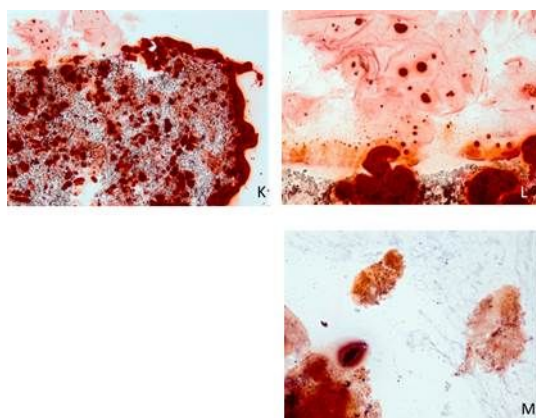
FAD で培養した同一試料の HE 染色(A)とアリザリンレッド染色 + HE 染色(B)の所見を示す(以上 $\times 40$ )。HE 染色では MTA が染色されているのみであるが、(B)の二重染色では、MTA の周囲にアリザリンレッド陽性の領域が広く広がっていることが観察される。拡大像(C)(D) ( $\times 400$ ) では MTA 周囲のコラーゲン中の線維様構造も赤染され、コラーゲン中に塊状のアリザリンレッド陽性構造物が観察された。



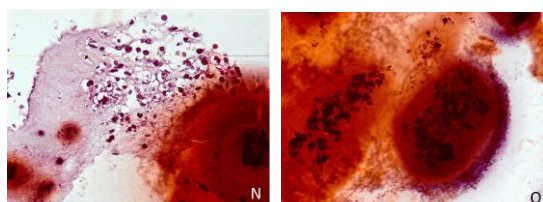
分化誘導培地で培養した試料の HE 染色 (E)、トルイジンプルー染色(F)、アリザリンレッド染色(G)(以上 $\times 40$ ) (I)( $\times 200$ ) (J)( $\times 400$ ) ならびにアリザリンレッド染色 + HE 染色(H)( $\times 40$ ) (K)( $\times 200$ ) (L) (M) (N) (O)(以上 $\times 400$ )の所見を示す。HE 染色では、円柱状に成形した MTA の周囲ならびに内部にまでアリザリンレッド陽性部分が広がり、MTA とアリザリンレッド陽性部分の周囲には石灰化物が確認できた (G)(I)(J)。



アリザリンレッド+HE染色では、MTA周囲と内部に石灰化物が多数形成されており(H)(K)、MTA周囲の細胞付近に多数の微小な石灰化球が観察された(L)。さらにMTA周囲のコラーゲン中に微小顆粒を含むアリザリンレッド陽性構造が確認された(M)。



長期経過例ではコラーゲン中の細胞と石灰化物が近接し、コラーゲン中に塊状のアリザリンレッド陽性石灰化物と線維状構造が確認された(N)。石灰化物の内部には黒染された微小構造を含み、石灰化物周囲にはアリザリンレッド陽性を示す線維状構造が取り囲んでいた(O)。



石灰化誘導因子を作用させた本実験の結果から、歯根膜内に存在する幹細胞は石灰化に参与している可能性が示唆された。また、今回 FCM を用いて分取した細胞の培養中の増殖過程は、特徴的な網状構造を呈し、示唆に富む極めて興味深い構造であった。今後、神経誘導や上皮誘導、血管誘導あるいは破骨細胞、象牙芽細胞、セメント芽細胞、線維芽細胞等の細胞誘導を試みることができれば、MTA 使用による逆根管充填や穿孔部修復のみならず、外傷や再植に関連する歯根吸収やアンキローシスの発症機序の解明、歯根膜再生、歯周組織修復機序の解明等に大きな期待が寄せられる。

#### 参考文献

- Yamada R, Kitajima K, Arai K, Igarashi M, Cytokeratin expression of engrafted three-dimensional culture tissues using epithelial cells derived from porcine periodontal ligaments. *J Oral Pathol Med*, 43(8), 2014. (Thesis)  
doi:10.1111/jop.12183.
- Trope M., Avulsion and replantation, *Refaat Hepeh Vehashinayim*(1993), 19(2), 2002, 6-15.

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

- Kitajima K, Arai K, Yokosuka T, Satoh T, Kitano Y, Asahina T, Sorimachi K, Miyoshi T, Igarashi M: Root-end restoration using MTA against the intractable cases of root canal treatment, IFEA The 9th World Endodontic Congress USB 抄録集: 47, 2013.

北島佳代子, 新井恭子, 飯野華絵, 山田理絵, 北野芳枝, 朝比奈壮郎, 五十嵐 勝: 外傷性脱臼歯再植後に生じた外部吸収

に対する MTA 逆根管充填症例の考察，日  
本歯科保存学会 2013 年秋季学術大会(第  
139 回) プログラム・抄録集：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 佳代子 (KITAJIMA KAYOKO)  
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授  
研究者番号：00177841

(2) 研究分担者

五十嵐 勝 (IGARASHI MASARU)  
日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授  
研究者番号：90168104

新井 恭子 (ARAI KYOKO)  
日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師  
研究者番号：10434143