

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670806

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞と機能性スキャフォールドを用いた新規歯槽骨再生治療の創生

研究課題名(英文) Development of a new strategy for regeneration of alveolar bone by combination of dental stem cells and the functional scaffold

研究代表者

島内 英俊 (Shimauchi, Hidetoshi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70187425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の結果、歯髄細胞や歯小囊細胞などの歯由来幹細胞における硬組織形成細胞への分化誘導機構、特にWntシグナルの古典的および非古典的シグナル伝達経路間のフィードバックによる調節機構が明らかになり、両者を制御することによる増殖と分化の人為的制御の可能性が示された。さらに研究に用いた新規チタンメッシュはこれらの細胞に対してもトポグラフィーによる増殖効果を発揮し、ビーグル犬を用いた動物実験の結果でも、細胞を含むグラフトのみならずキャリア単独の場合でも十分な歯槽骨再生効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：This research project was aimed to develop the new strategy of alveolar bone regeneration by a combination of dental stem cells and guided bone regeneration technique using a newly developed titanium (Ti) mesh membrane. Our in vitro studies revealed the molecular mechanisms of proliferation and differentiation of dental stem cells regulated by Wnt signaling. Dental follicle cells (DFC) are able to differentiate into cement blast and alveolar bone cells. Canonical and non-canonical Wnt signaling performed the complementary role on DFC, that canonical Wnt3a signaling induced the osteoblastogenesis of DFC and non-canonical Wnt5a signaling negative developed these processes.

Our newly developed Ti-mesh exhibited the proliferative effects on DFCs by a topographical effect. Furthermore, our animal studies indicated that a combination of graft and Ti-mesh induced the superior bone regeneration on standardized bone defect model made in beagle dogs.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：歯槽骨再生 幹細胞 新規スキャフォールド

### 1. 研究開始当初の背景

組織工学を応用した再生治療における3大要素はいうまでもなく細胞、シグナル分子(サイトカイン)、スキャフォールドである。歯科、特に歯周治療においてはバリア・メンブレン法とEMDOGAINを用いたバイオ・リジェネレーション法が1990年代始めより実用化されている。特に前者は歯の欠損した顎堤の増大にも Guided bone regeneration (GBR)法として用いられているが、粘膜からのテンションのかかるGBRではチタンメッシュがスペースメイキングに応用されてきた。この方法では、自家骨、凍結乾燥骨やハイドロキシアパタイト(HA)などの人工骨誘導材料を併用して骨再生が目指される。チタンメッシュには細胞フィルター機能がなく、人工骨材料は生体内骨置換が十分でない、自家骨は採取量・高侵襲性などの種々の問題点を持ち、再生治療としてのGBRには発展をこれ以上期待できず、ブレイクスルーが求められる。

われわれはこれまで機能性スキャフォールドに関する研究を展開しており、従来品の1/20の厚さ(50 $\mu$ m)のチタン薄膜に孔径20 $\mu$ m貫通孔を高密度形成加工した新規チタン製バリアフィルターを開発し、この構造が細胞増殖誘導効果を発揮するという知見を得ている(特許出願中)。またナノサイズのHA(nano-HA)にも着目し、これがナノ粒子効果により組織幹細胞を含むヒト歯根膜(PDL)細胞からサイトカイン産生を誘導するという基礎データを得た。

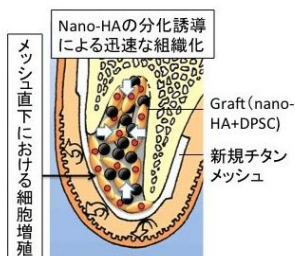


図1 本研究で目指すコンビネーション療法による再生効果

本研究は、これらの成果を応用して細胞ソースとして歯根膜と同じく未分化な細胞を含む歯髄や歯小囊などの歯由来幹細胞を用いて、細胞にインタラクティブな人工生体材料併用による大規模歯槽骨造成法(図1)の確立を試みようというものである。

### 2. 研究の目的

研究背景で述べたように、歯科領域における新規再生治療法として本研究では3つの新規概念によるコンビネーション治療を提案する。すなわち、(1)新規開発によるセルインタラクティブなバリアフィルター、(2)nano粒子効果を期待した骨誘導性子キャフォールドの使用、そして(3)幹細胞ソースとしての歯髄などの歯由来幹細胞骨再生への応用である。これらの提案をトランスレーショナルリサーチへと発展させるために、具体的な研究目的は以下の通りであった。すなわち本研究は、申請者らの機能的スキャフォールドに関する研究成果を基に着想したものであり、細胞ソースとして歯根膜と同じく未分化な組織幹細胞を含む歯髄幹細胞(DPSC)や歯小囊細胞などの歯由来幹細胞を用いて、細胞にインタラクティブな人工生体材料併用による大規模歯槽骨造成法を確立しようというものである。研究期間内においては以下の目標を達成することを目指した。

- DPSCあるいは他の歯由来幹細胞に対する新規チタン製バリアフィルターの biomimetics による作用の解析
- nano-HAによるDPSCの増殖分化誘導作用の解明
- ビーグル犬規格骨欠損モデルを用いた nano-HA+DPSC グラフトとバリアフィルター併用による歯槽骨再生効果の検討

### 3. 研究の方法

(1) 新規チタン製高密度メッシュがDPSCなどの歯由来幹細胞の増殖・分化に及ぼす作用の*in vitro*での検討

DPSC を含むヒト歯髄細胞並びにヒト歯根膜 (PDL) 細胞を、インフォームドコンセントの上抜去されたう蝕のない智歯等から摘出した歯髄から分離培養し、継代培養したものを実験に供試する。また歯小囊細胞については、矯正治療のため便宜抜歯された歯根未完歯から同様に分離培養したものをを用いる。それ以外にマウス由来の不死化された細胞などを供試して、チタン製メッシュ上で培養することにより、同構造が細胞の増殖・分化に及ぼす作用を明らかにする。

#### (2) 新規チタン製高密度メッシュの最適化の検討

メッシュ孔径やピッチ、厚さ及び精密加工法を種々条件で変化させた高密度メッシュを試作し、上記1)の実験系における細胞増殖応答を指標として最適なものを決定した。

#### (3) 歯由来幹細胞の増殖・分化誘導機構の *in vitro* での検討

上記1)と同じ方法で得た細胞を用いる。培養した細胞に所定濃度のnano-HA を添加・培養し、BMP-2 などの硬組織形成細胞マーカーの発現変化をreal-time PCR で定量的に検討する。特にnano-HA 添加の影響とシグナル伝達経路について明らかにした。また種々の細胞を用いて、歯由来幹細胞から硬組織形成に至る過程のシグナル伝達機構を解明した。

#### (4) ビーグル犬骨欠損モデルを用いた大規模骨欠損の再生過程の評価

ビーグル犬に対して歯肉弁を形成して顎骨を露出せしめ、第4小白歯を抜歯した顎骨に10x10x5mmのボックス窩洞を形成したのちキャリア(nano-HAあるいはβ-TCP)単独、キャリア+細胞を充填した。製作したチタンメンブレンあるいはコントロールとして既製チタンメッシュ (Frios®, Dentsply) のいずれかにて充填部を歯肉組織と隔離するよう被覆したうえチタンスクリューで固定、歯肉弁を腹位縫合した。4ヶ月後に再度ビーグル犬を屠殺し、手術部位の骨欠損の状態を肉眼的

観察するとともに、micro-CT によるエックス線学的評価と組織学的検索を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規チタン製高密度メッシュのトポグラフィ効果は歯由来幹細胞の増殖・分化に及ぼす作用

歯根未完歯より分離したヒト歯小囊細胞を用いて、新規チタンメッシュ上で培養し、メッシュ孔径とピッチが細胞増殖に及ぼす影響を検討した(図2)。

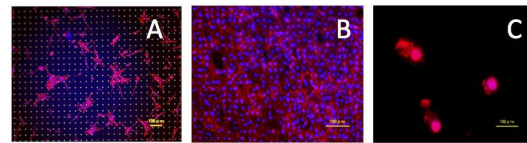


図2 孔径20μmの新規チタンメッシュ(A:ピッチ50μm, B:同30μm)上で72時間培養した歯小囊細胞の蛍光顕微鏡像. Cはコントロールとした既製チタンメッシュ(Frios® Bone Shield)上で培養した像を示す。

図2で示したように、新規チタンメッシュは歯由来幹細胞に対しても増殖誘導作用を発揮し、しかもその作用はメッシュのピッチに依存することが明らかになった。

##### (2) 新規チタン製高密度メッシュの最適化の検討

結果(1)で示したように、新規チタン製メッシュのトポグラフィ効果はメッシュ孔のピッチが小さいほど、すなわち単位面積当たりの孔数が多いほど高いが、逆にバリアとしての機械的強度は低下した。従って、GTRやGBRの用途、あるいは再生する骨欠損の大きさにより至適な孔径とピッチがあるものと考えられたが、本研究では広範な骨欠損のGBRでの試験を予定しているため、孔径20μm、ピッチ50μmのメッシュを動物実験に用いることとした。

##### (3) *In vitro*における歯由来幹細胞からの硬組織形成細胞への分化誘導機構の検討

nano-HAによるBMP発現誘導効果

nano-HAをPDL細胞に添加培養することにより、同細胞からのBMP-2発現がどのよ

うに変化するかを調べた ( 図 3 )

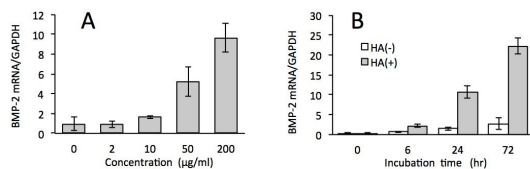


図3 nano-HAによるPDL細胞からのBMP-2発現誘導のkinetics (A: nano-HA濃度, B: 培養時間)

この結果から, nano-HA が BMP-2 発現を濃度および培養時間依存的に強発現させることが明らかになった。さらにこれが nano-HA の溶解による  $Ca^{2+}$  あるいは  $PO_4^{2-}$  イオンの放出によるかを調べたところ, 培養時間を延長しても両イオンの放出は認められず, ナノ粒子効果によることが示された。

歯由来幹細胞の分化誘導に影響を与えるシグナル分子の検討

Wnt は発生過程および発生後の生体の機能維持を調節する分泌型糖タンパク群で、 $\beta$ -catenin 依存性の古典的経路あるいは同非依存性の非古典的経路を介して、細胞の増殖や分化、アポトーシスを制御している。同シグナルの歯小囊細胞のセメント芽細胞 / 骨芽細胞系への分化に対する作用およびその分子メカニズムについて調べた。

歯小囊細胞株をリコンビナント Wnt5a (rWnt5a) で刺激したところ、細胞の遊走能が抑制されたが、増殖能およびセメント芽細胞 / 骨芽細胞系への分化度には影響がみられなかった。古典的 Wnt リガンドである Wnt3a は、歯小囊細胞に作用してアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase; ALP) の発現を誘導することが知られているが、歯小囊細胞株の Wnt5a 遺伝子の発現を siRNA 法で抑制したところ、Wnt3a 誘導性 ALP 発現が遺伝子および酵素活性レベルで増強されることが明らかとなった ( 図 4 )。反対に rWnt5a を加えたところ、Wnt3a 誘導性 ALP 発現は抑制された。

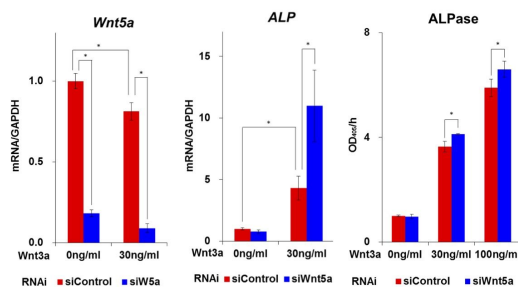


図4 Wnt5aの抑制によるアルカリホスファターゼ (ALP) 発現増強効果。siRNAを用いてWnt5aの発現を抑制するとALPが遺伝子ならびに蛋白レベルで発現が増強された。

以上の結果から、歯小囊細胞においては古典的 Wnt シグナルによる初期分化誘導に対して、Wnt5a が負の調節因子として機能することが示唆された。さらにリコンビナント Wnt3a 刺激により Wnt5a の遺伝子発現が有意に増加したことから、歯小囊細胞の分化においては、古典的および非古典的 Wnt シグナル間でのフィードバック機構が存在することが示唆された。

( 4 ) ビーグル犬を用いたグラフトとチタンメッシュ併用による歯槽骨再生効果

ビーグル犬の下顎両側小臼歯 P4 を抜歯後、周囲歯槽骨にラウンドバーにて長さ 15mm、高さ 10mm、深さ約 5 mm の窩洞形成を行い、歯周病骨欠損モデルとした。

骨欠損モデルに -TCP あるいは nano-HA をキ

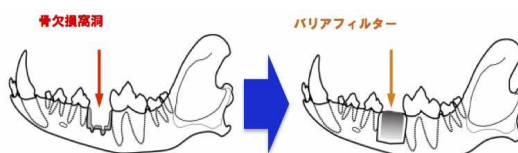


図5 ビーグル犬に作製した歯槽骨欠損モデル。バリアとしたグラフトを充填した後、新規チタンメッシュで被覆して縫合した ( 図 5 )。なお対照側は抜歯のみあるいは欠損部を Frios bone shield を用いて被覆を行った群とし、4ヶ月後に実験動物を屠殺して顎骨を摘出した後、被験部位を 3D-CT による観察を行った。

図6に示した通り、チタンメッシュで被覆を行った群では、抜歯のみと比べ明らかに歯槽骨が再生されていた。

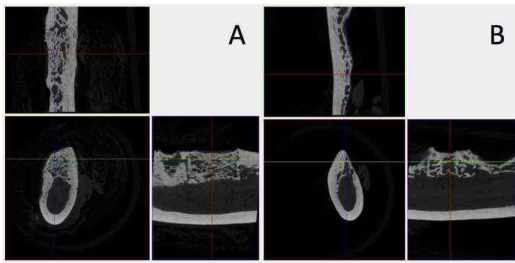


図6 チタンメッシュグラフト併用による歯槽骨再生効果 (3D-CTによる検索結果, A: 試験群, B: 対照群)

さらにキャリアのみと細胞を含むグラフトを移植し、新規チタンメッシュで被覆した群の比較を行ったところ、図7に示した通りキャリアのみグラフトを移植した群ではキャリアのみの場合と比べ、明確な骨化の進行と大きな骨再生が得られた。

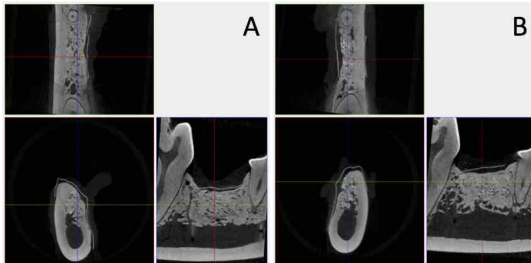


図7 チタンメッシュグラフト併用による歯槽骨再生効果 (3D-CTによる検索結果, A: キャリアのみ, B: 細胞を含むグラフト移植)

さらに従来型チタンメンブレン (Fios bone shield; 対照群) との間で同様の比較を行ったところ、実験群 (新規チタンメッシュ) ではチタン膜により増生スペースが維持され、内部は殆ど骨に置換していたのに対し、対照群では膜の変形によってスペースが押しつぶされ増生量が減少していた。

#### (5) 研究の総括

本研究の結果、歯髄細胞や歯小囊細胞などの歯由来幹細胞における硬組織形成細胞への分化誘導機構、特に Wnt シグナルの古典的および非古典的シグナル伝達経路間のフィードバックによる調節機構が明らかになり、両者を制御することによる増殖と分化の人為的制御の可能性が示された。さらに研究に用いた新規チタンメッシュはこれらの細胞に対してトポグラフィーによる増殖効果を発揮し、キャリアのみでも十分な再生効果を示したのみならず、従来型チタンメシ

ュとの決定的な違いとして、スペースへの軟組織進入は全く見られず、従来の顎骨再生法 (GBR) における懸案であった埋め込み材料との組織癒着が生じなかった。この新材料によってスペースメイキングによる顎骨再生は、その量 (再生量の増加) と質 (組織癒着の抑止) おいて大きく進歩するものと期待される。

#### 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)

[学会発表] (計 6 件)

1) 石幡浩志, 須藤瑞樹, 向坂幸彦, 小松秀裕, 島内英俊. 新規開発チタンメンブレンによる顎骨増生. 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会, 2015 年 5 月 15 日~5 月 16 日, 千葉市.

2) 向坂幸彦, 根本英二, 金谷総介, 中村卓史, 田村正人, 島内英俊. 歯小囊細胞における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルによる Osterix 発現への p38MAP キナーゼの関与. 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会, 2015 年 5 月 15 日~5 月 16 日, 千葉市.

3) Sakisaka Y, Nemoto E, Suto M, Kanaya S, Tamura M, Shimauchi H. Wnt5a attenuates dental follicle cells differentiation triggered by Wnt3a. The 93<sup>rd</sup> International Association for Dental Research General Session & Exhibition. 2015 年 3 月 11 日~3 月 14 日, Boston, MA, USA.

4) 向坂幸彦, 根本英二, 須藤瑞樹, 金谷総介, 田村正人, 島内英俊. Non-canonical Wnt がセメント芽細胞の分化に与える影響. 第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2014 年 6 月 19 日~6 月 20 日, 大津市.

5) 向坂幸彦, 根本英二, 金谷総介, 田村正人, 島内英俊. Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルによる歯小囊細胞アルカリフォスファターゼの発現誘導. 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会,

2014年5月23日～5月24日，岐阜市。

Suto M, Nemoto E, Suzuki R, Tsuchiya M, Shimauchi H. Induction of BMP-2 by extracellular  $Ca^{2+}$  and Pi as nano-hydroxyapatite in periodontal ligament cells. 10<sup>th</sup> Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, 2013年9月3日～9月4日，奈良市。

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

島内 英俊 (SHIMAUCHI, HIDETOSHI)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：70187425

### (2)研究分担者

石幡 浩志 (ISHIHATA, HIROSHI)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：40261523

根本 英二 (NEMOTO, EIJI)  
東北大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：40292221

金谷 聡介 (KANYA, SOUSUKE)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：80375097