

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861690

研究課題名(和文)臨床入手可能な細胞を用いた体外培養下における歯・歯周組織ユニットの再生

研究課題名(英文)Regeneration of the tooth and periodontal tissue unit derived from adult tooth cells, in vitro.

研究代表者

豊村 順子 (toyomura, junko)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：80645630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトで応用できるように臨床で入手可能な細胞を用いて、歯・歯周組織ユニットの再生を目指した。

まず、有用な細胞源として、抜去歯からマラッセ上皮遺残細胞、歯髄細胞、歯根膜細胞を分離した。分離した細胞を用いて、内部に歯髄細胞を入れたアテロコラーゲンビーズの表面にマラッセ上皮遺残細胞を付着させたもの(細胞ビーズ)を作製した。歯根膜細胞シートを作り、これで細胞ビーズを包み、スキッドマウスの腹腔内に移植した。1ヶ月後に開腹し、組織形成物を探したところ、実体顕微鏡下で歯・歯周組織様ユニットの組織形成物が確認された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to generate correct tooth structure by adult tooth cells derived from deciduous tooth for clinical application.

We isolated pig epithelial cell rests of Malassez(pERM), human dental pulp cells(hDPcs) and human periodontal ligament cells(hPDLcs). We made atelocollagen beads included hDPcs and attached with pERM (we call cell-bead). Cell-bead was wrapped in hPDLcs-sheet and was transplanted in abdominal cavity of scid mouse. We performed an operation one month later and found the tooth and periodontal tissue unit-like structure under a stereoscopic microscope.

研究分野：再生医療

キーワード：歯の再生

### 1. 研究開始当初の背景

歯は一度失うと二度と元に戻らず、治療方法としては入れ歯やブリッジ、インプラントがある。現在、入れ歯やブリッジは元の歯のようにどんな食べ物でも噛めるわけではなく、また、支える他の歯への負担が大きい。インプラントは、歯根膜によるクッションがなく圧力などを感じるセンサーの役割や歯周組織への栄養補給がないことや骨に結合するが粘膜との結合が強くないため天然の歯に比較すると感染に弱いことなどが挙げられ、また、経年的な骨吸収の問題もある。さらに歯槽骨が十分に存在しない場合、そもそもインプラント治療は不可能である。よって、元の歯と同じ機能を取り戻すのは難しいのが現状である。

すでに、マウスでは胎生期の歯胚原基を取り出し、上皮細胞と間葉系細胞の2種類の細胞に分けてコラーゲンゲル内に入れ、再生歯胚として体外で再構築し、再生歯胚をマウスの腎皮膜下に移植して再生歯ユニット(歯と支持組織の歯根膜、歯槽骨が一体となっているもの)が作製されている。この再生歯ユニットをマウスの顎骨の中に移植したところ、歯槽骨の再生を伴った再生歯の生着が確認されている。しかし、この歯の再生法は、臨床応用するには大きな問題が2つある。1つは、臨床では入手不可能な歯胚の細胞を使うこと、もう1つは免疫や感染のリスクを伴う動物への移植を行わなければ、歯の再生を誘導できないという点である。動物体内での再生は、体内では血流が酸素・栄養や生理活性物質が作用するため歯の再生に有利な環境である点では優れているが、前述したように免疫や感染のリスクを伴うので、ヒトでこの手法を使うことは困難である。

### 2. 研究の目的

臨床的再生医療の応用に可能な細胞を用い、体外培養で歯・歯周組織ユニットを作製し、ヒトに臨床応用できる方法を開発する。

#### (1) 有用な細胞源の分離

再生歯に有用な細胞源として、マラッセ上皮遺残細胞と歯髓細胞、歯根膜細胞が考えられる。

歯が萌出した後、内エナメル上皮は消失するが、その遺残はマラッセ上皮遺残細胞として歯根膜内に一生残存していることが明らかになっている。このマラッセ上皮遺残細胞がエナメルを形成する能力を維持している。ブタマラッセ上皮遺残細胞を歯髓細胞とともに免疫不全動物の大網に移植したところエナメルを形成させたという報告があり、歯冠形成にはマラッセ上皮遺残細胞と歯髓細胞が有用な細胞源と考えられる。

また、歯根未形成のマウスの歯冠を歯根膜細胞のシートでまいて培養したところ、歯根だけでなく、歯根と歯槽骨の間の歯根膜、歯

根を支える歯槽骨まで再生しており、歯の歯周組織がほぼ完全な形で再生されたことが報告されている。以上のことから、歯根や歯周組織形成に歯根膜細胞が有用な細胞源として考えられる。

これらの細胞の分離を行う。

#### (2) In vivo での生体と一致した構造の歯冠または歯・歯周組織ユニットの形成

動物体内での再生は、体内では血流が酸素、栄養や生理活性物質が存在するため歯の再生に有利な環境であるという点において優れている。そのため、まず、in vivo で臨床応用に可能な(1)の細胞を用いて生体と一致した構造の歯冠または歯・歯周組織ユニットの再生をする。

#### (3) In vitro での生体と一致した構造の歯冠または歯・歯周組織ユニットの形成

臨床応用できるように、体外培養下で臨床応用に可能な(1)の細胞を用いて生体と一致した構造の歯冠または歯・歯周組織ユニットの形成をする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞の分離

歯髓細胞と歯根膜細胞は、ヒトの抜去歯から採取する。

また、マラッセ上皮遺残細胞は、ヒトの歯根膜からの分離は難しいので、本研究では、マラッセ上皮遺残細胞が多く存在し分離しやすいブタの歯根膜より分離する。抜去歯の歯根中央部から歯根膜を尖刀でシャーレ内の培養液中に削ぎ落とし静置培養すると、線維芽細胞シートの中にマラッセ上皮遺残細胞コロニーが散在する。ここからマラッセ上皮遺残細胞を濾紙法または筒法を用いて colonial cloning し分離する。

細胞の同定は Cytokeratin 2, Cytokeratin 14, Amelogenin, Ameloblastin の PCR と Cytokeratin 14, Amelogenin, Ameloblastin の免疫染色で行い、発現を確認する。

#### (2) In vivo での生体と一致した構造の歯冠または歯・歯周組織ユニットの形成

アテロコラーゲン溶液とヒト歯髓細胞を混和した溶液を電動式マイクロピペットにて滅菌ミネラルオイルの中へ滴下し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で加温しゲル化して、アテロコラーゲンビーズを作る。パスツールピペットを用いてビーズのみを吸い取り、ミネラルオイルを除去する。そのビーズをマラッセ上皮遺残細胞を浮遊させた培養液内へ移し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で細胞とビーズを巡回培養し、ビーズの周囲に細胞を付着させ細胞ビーズを作る。

歯冠の形成は、上記細胞ビーズをスキッドマウスの腹腔内に移植し、28日間飼育した後、摘出する。

歯周組織を含む歯・歯周組織のユニットの形成は、細胞ビーズに overconfluent に培養しシート化させた歯根膜細胞を気泡が入らないように巻き、歯冠形成の時と同様にスキッドマウスの腹腔内に移植し、28日間飼育した後、摘出する。

摘出した組織の細胞分化、形態変化、組織形成を確認するため、 $\mu$ CT 撮影と HE 染色および Dentin sialo protein, Cytokeratin 14, Amelogenin, Ameloblastin, Enamelin, Periostin などの免疫染色を行う。

### (3) In vitro での生体と一致した構造の歯冠または歯・歯周組織ユニットの形成

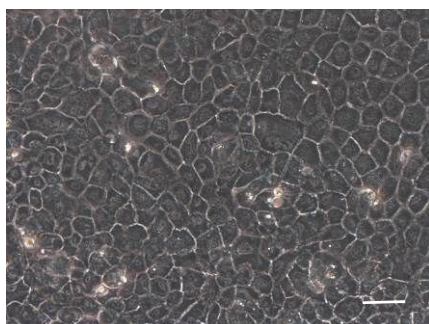
In vivo と同様に細胞ビーズや細胞ビーズを歯根膜細胞シートに巻いたものを作製し、コラーゲンスポンジに埋め込み ETF (embryotrophic factor) を添加した培養液を使って培養シャーレ、あるいは、還流培養で培養し、形態変化を確認する。組織の細胞分化、形態変化、組織形成の確認は、 $\mu$ CT 撮影と HE 染色および Dentin sialo protein, Cytokeratin 14, Amelogenin, Ameloblastin, Enamelin, Periostin などの免疫染色を行う。

## 4. 研究成果

### (1) マラッセ上皮遺残細胞の分離

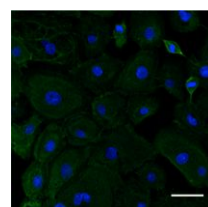
ブタの抜去歯の歯根中央部から歯根膜を尖刀でシャーレ内の培養液中に削ぎ落とし静置培養したところ、線維芽細胞シートの中にマラッセ上皮遺残細胞の大小のコロニーが散在した。ここからマラッセ上皮遺残細胞を濾紙法にて colonial cloning し、分離した(図 1)。

細胞の同定は、Cytokeratin14, Amelogenin, Ameloblastin の免疫染色(図 2)、Cytokeratin 2, Cytokeratin14, Amelogenin・Ameloblastin の PCR(図 3)で行い、発現を確認した。

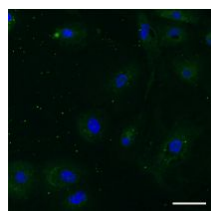


50  $\mu$ m

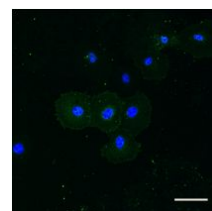
図 1 分離したブタマラッセ上皮遺残細胞



Cytokeratin14



Amelogenin



Ameloblastin

Scale bars 50  $\mu$ m

図 2 ブタマラッセ上皮遺残細胞の免疫染色

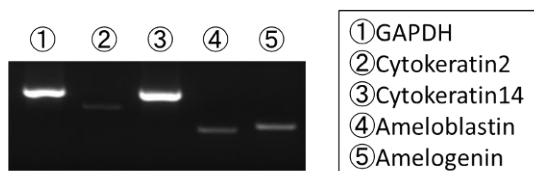


図 3 ブタマラッセ上皮遺残細胞の PCR

### (2) In vivo での生体と一致した構造の歯冠または歯・歯周組織ユニットの形成

ヒト歯髓細胞・ブタマラッセ上皮遺残細胞ビーズを作り、スキッドマウスの腹腔内に移植し、1ヶ月後に開腹し細胞ビーズによる組織形成物を探したが、歯冠のみの形成だと組織形成物が小さく(1mm 以下)、腹腔内での形成物の発見に至るのに困難があった。

そこで、シート化した歯根膜細胞で上記細胞ビーズを包み、スキッドマウスの腹腔内に移植し、1ヶ月後に開腹し、組織形成物を探したところ、実体顕微鏡下で歯・歯周組織様ユニットの組織形成物が確認された(図 4)。しかし、成功率が低く、歯・歯周組織様ユニットの組織形成の再現が困難であった。

また、同時に、ヒトのマラッセ上皮遺残細胞を用いて、ブタのマラッセ上皮遺残細胞と同様のやり方で細胞ビーズや歯根膜細胞シートを作製し、スキッドマウスの腹腔内に移植した。移植時、ヒトの歯髓細胞は同じ個体の細胞を使用した。マラッセ上皮遺残細胞はブタとヒト由来のものを使用した。これらを別々のマウスの腹腔内に移植すると、歯周組織を含むユニットが形成されるときは、ブタのマラッセ上皮遺残細胞でもヒトのマラ

マッセ上皮遺残細胞でも双方同時にできた。  
歯の発生において、象牙質形成はエナメル形成よりわずかに早く、幼弱な内エナメル上皮細胞が歯乳頭の細胞を象牙芽細胞に分化誘導を開始し、内エナメル上皮細胞はエナメル芽細胞に同時に分化していく。よって、大切なのは、上皮・細胞と間葉系細胞の相互作用で、相互作用するために互いの分化のスピードが早いことが推定されると考えられる。さらに、歯胚の分化発育を観察すると、当初エナメル上皮と歯髓の細胞は密に接着している。次に上皮と歯髓の間にエナメル基質が形成される。このことは、上皮間葉の相互作用は分化初期のみで大切なものであると考えられる。エナメル芽細胞に早く分化する能力のあるマッセ上皮遺残細胞が歯髓細胞を象牙芽細胞に早く誘導できるかどうか、また、異なる細胞同士の(細胞ビーズとシート状の歯根膜細胞など)の密着が、再現性をあげるキーポイントになると考えられた。再現性を高めるために、移植に用いる細胞の更なる選定が必要であると考えられた。

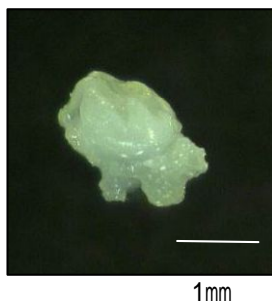


図4 歯・歯周組織様ユニットの組織形成物

#### <引用文献>

- Oshima M et al. PLOS ONE. Volume6. Issue7. e21531.2011)  
Shinmura Y et al. J. Cell Physiol. 217: 728-738,2008  
中原 貴 et al. 日本歯科評論. Vol.72(4). 9-11.2012

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

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

取得状況(計0件)

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

#### 〔その他〕

ホームページ等なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

豊村 順子 (TOYOMURA, JUNKO)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：80645630