再生歯科医学
～　乳歯歯髄由来細胞の可能性　～

大阪歯科大学小児歯科学講座
准教授　原田　京子

はじめに

～研究の背景～

齲蝕や歯周病に代表される歯科疾患は、その発病や進行により歯の喪失へと繋がるため、食生活や社会生活等に支障をきたし、ひいては、全身の健康に影響を与えるものとされている。現在、生涯にわたり自分の歯を20歯以上保とうという8020運動が提唱、推進されている。歯の喪失の直接的な原因の約半数が、歯内治療の予後不良と歯根破折で占められていることから[1,2]、各ライフステージに応じた適切な齲蝕、歯髄炎、歯周炎予防を推進することが重要である。特に乳歯の齲蝕と永久歯の齲蝕には強い関連が認められ、乳幼児期は基本的歯科保健習慣を身につける時期として非常に重要であり、生涯を通じた歯の健康づくりに対する波及効果も高いと言える。乳歯や幼若永久歯が歯髄炎に罹患した場合には出来る限り早期に発見し修復することで、歯髄を保存することが可能となり、良好な列咬合状態を確保することができる。また、乳歯歯髄組織を保存することは、正常な歯根吸収と後継永久歯の交換につながり、健康な口腔発育に重要である。

歯髄は歯の機能維持に種々の重要な役割を有するが、深い齲蝕や歯髄炎に対する覆髄生活歯髄切断法には限界があり、対応として抜髄処置となる場合が多い。抜髄処置の予後は必ずしも良好とはいえず、また歯の強度低下を招き、歯根破折などにより歯を喪失する可能性が増大することとなる。永久歯の抜歯原因調査報告書によると、抜去した歯の歯髄の状態は、「無髄・根充有」が43.1%と最も多く、根充無の抜去歯を含めると、約60%の抜去歯が無髄歯であることが明らかにされており[3]、歯の延命を図るためには、まず歯髄を保存することがとても重要であるといえる。しかしながら現実には抜髄や感染根管治療が必要となる症例は多い。そのような場合、従来の根管内への人工物による充填ではなく、失われた歯髄を再生し充填することができるなら、抜去歯を著しく減少させることが期待できる。そこで我々は乳歯歯髄組織に存在する幹細胞を用いた新しい歯髄再生治療法を開発し、歯髄再生への応用の可能性を明らかにしたいと考えている。

近年の再生医療技術は飛躍的に発展しており、その実用化に向けて安全かつ有効な方法が研究されている。再生医療とは、様々な組織に分化することのできる幹細胞を用いて、機能障害や機能不全に陥った生体組織や臓器の機能再生を図るものとされている。幹細胞として利用できる細胞として、歯科領域では抜去した歯に含まれる歯髄由来細胞が注目されている。特に乳歯歯髄由来細胞においては、幹細胞の特性といわれる自己複製能および多分化能が高いことが報告され[4]、採取方法に関しても比較的患者の負担なく採取することが可能であるため、今後の臨床応用が期待される細胞であり、その細胞を保存しようとする歯髄バンクの設立も進められている（**図1**）。また、2012

細胞バンクに適した条件	歯髄細胞の特徴
容易（低侵襲）に採取できること	容易に採取可能
採取チャンスが多いこと	性別・年齢問わず採取可能
細胞増殖力が高いこと	細胞増殖力が極めて高い
遺伝子損傷が低いこと	遺伝子損傷が少ない（タイムカプセル構造）
iPS細胞に用いることが可能であること	効率良くiPS細胞にできる

※骨髄バンクの課題　・・・ 採取時の外科的侵襲
※臍帯血バンクの課題　・・・ 出産時にしか採取できない

図１：歯髄細胞が細胞バンクに適している理由
（Advanced Center for Tissue Engineering Ltd.　HPより）

年にノーベル賞を受賞し世界的に期待されている人工多能性幹細胞induced pluripotent stem cells（iPS細胞）も、この乳歯歯髄細胞から効率よく作製することができると報告されており、今後の臨床応用に向けて、乳歯歯髄由来幹細胞についての研究の必要性が高まってきている。しかしながら、乳歯歯髄に存在する幹細胞は非常にわずかであると報告されている[5)]。したがって、乳歯歯髄由来細胞を再生医療に有効に活用するためには、その細胞数を十分に増やすこと、幹細胞特性を維持、向上させること、および必要な時期まで適切な環境下で保存しておくこと、などが必須条件とされる。当講座ではこのような問題点の解決に向けて、乳歯歯髄由来細胞の培養条件等に着目し研究を行っている。

2. 乳歯歯髄由来細胞の特性について

1）細胞増殖能

歯髄由来細胞を応用するにあたり、まずは十分な数の細胞を得ることが必要である。骨髄由来の幹細胞は高い増殖能を示し、再生医療に有効な体性幹細胞として活用されてきたが、歯髄由来の幹細胞はこれに勝る増殖能を有することが報告されている[6)]。また、乳歯歯髄由来細胞と永久歯歯髄由来細胞の細胞増殖能の検討を行ったところ、永久歯歯髄由来細胞が培養後１週間で約２倍の増殖率を示したのに対し、乳歯歯髄由来細胞は培養後１週間で、約5.3倍の増殖率を示すことを確認した（**図2**）。

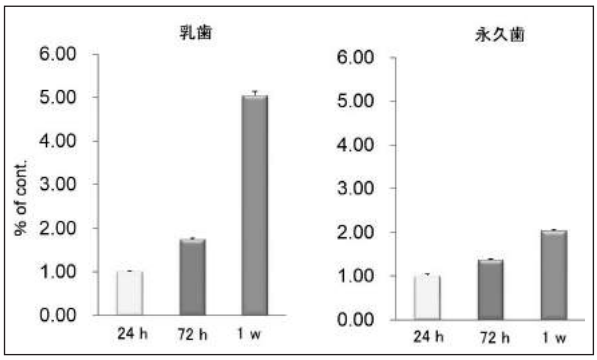

図２：乳歯および永久歯歯髄由来細胞の細胞増殖能

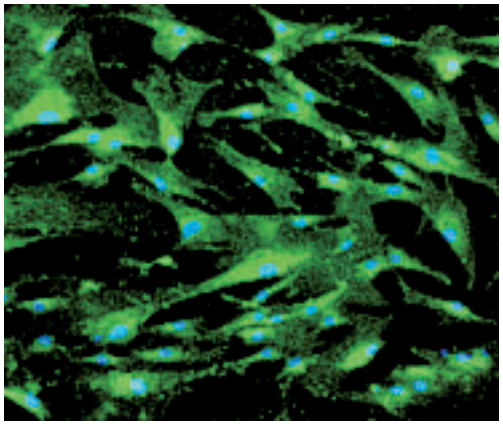

図３：乳歯歯髄由来細胞におけるSTRO-1染色
Immunocytochemical detection of analyzed markers in cultured human deciduous dental pulp cells. STRO-1 expression was readily detectable in all cells.

2）未分化能

細胞膜表面抗原であるSTRO-1が間葉系幹細胞マーカーの一つとして周知されている。そこで、STRO-1の抗体を用いて乳歯歯髄由来細胞における免疫組織化学染色を行った結果、STRO-1の発現が確認された（**図3**）。

3. 乳歯歯髄由来細胞の培養条件の検討

1）無血清培地の利用

実際の臨床応用に向けては、細胞を生体内から取り出してin vitroで培養し増殖させる必要があるため、in vitroでの培養条件を整えることは非常に重要であると考える。細胞培養の際には、細胞の維持増殖のためにウシやウマなどの動物血清や自家ヒト血清を使用することが多い。しかしながら動物由来の血清については、病原性ウイルスの感染、ロット間での性質の違い、免疫反応など解決すべき問題点が多く存在する。

またヒト血清を得るためには患者から比較的多量の血液を採取しなければならないため、患者への負担が懸念される。そこで、ヒト間葉系幹細胞研究用として開発された市販の無血清培地（STK2：DS Pharma Biomedical, Japan）が乳歯歯髄由来細胞においても有効であるかどうかを検討することを目的として、乳歯歯髄由来細胞のSTK2培養を行った。

その結果、STK2にて培養を行った乳歯歯髄由来細胞では、10% Fatal Bovine Serum（FBS）を添加したDulbecco’s Modified Eagle medium（DMEM）培地よりも高い細胞増殖能がみられた

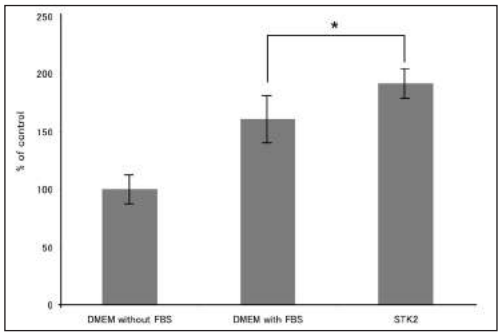

図４：乳歯歯髄由来細胞の増殖能

Cell proliferation rate during culture with STK2 was higher than with DMEM.
Deciduous dental pulp cells were incubated with DMEM without FBS, DMEM containing 10% FBS or STK2 for 3 days. Data are representative of more than five independent experiments. (*P <0.05)

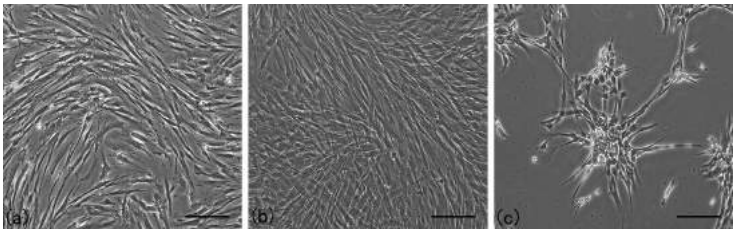

図５：乳歯歯髄由来細胞形態（３日間培養）

Deciduous dental pulp cells were incubated with DMEM without FBS (a), DMEM containing 10% FBS (b) or STK2 (c) for 3 days. Cells were observed under a microscope equipped with a digital camera, and scale bar indicates 100μm.

（図4）。この結果より、STK2が乳歯歯髄由来細胞の培養により有効であり、この無血清培地を使用することで血清に関わる問題点を解決できる可能性が示唆された。

また、乳歯歯髄由来細胞を各培地において37℃で３日間培養を行った後、位相差顕微鏡を用いて細胞形態の観察を行ったところ、10% FBS添加DMEMにて培養を行った細胞は一層で疎らに広がって増殖したのに対し、STK2にて培養を行った細胞は、細胞同士が密着し増殖する傾向がみられた**（図5）**。コロニーの形成は幹細胞特性のひとつであり、約９日間培養を行った乳歯歯髄由来細胞でコロニーの形成がみられ、骨芽細胞及び脂肪細胞へ分化する能力が増強したとの報告があることから[7]、STK２で培養した際も、その幹細胞特性が増強される可能性が示唆された。

以上より、間葉系幹細胞用の無血清培地が乳歯歯髄由来細胞の培養にも有用であり、この培地の利用によって、分離、増幅、分化、移植までのプロセスでの無血清化が可能となり、安全な再生医療の実現が可能になると考えられる。これらの無血清培地を臨床で使用するためには、さらなる低コスト化が望まれるところである。

2）6-bromoindirubin-3’-oxime（BIO）の添加

マウスやヒトのES細胞の未分化能を維持する薬剤として、グリコーゲンシンターゼキナーゼ３に特異的な抑制剤である6-bromoindirubin-3’-oxime（BIO）が報告されている。BIOは巻貝の一種であるHexaplex trunculus Lという天然源から抽出されたものである。インジルビンは１世紀以上前から知られている植物から採取した紫色の染料チリアンパープルの構成要素でもあり、BIOが生体内でGSK-3活性抑制剤であることが報告されている[8]。BIOが特異的に抑制するGSK-3は生体内の様々な経路に関与しており、多数の調節タンパクをリン酸化することで細胞分裂や分化、アポトーシスなど重要な役割を担っていると考えられている。また、GSK-3の関連している細胞シグナル伝達経路の異常により、様々な疾患に関与しているといわれている。Tauタンパク質はアルツハイマー病、グリコーゲンシンターゼは糖尿病、βカテニンは双極性障害など、それぞれの疾患においてGSK-3が関与している基質がみられる。βカテニンはWnt経路にも関与しており、BIOによる未分化能維持には、このWnt経路の活性化が関連していると考えられている。実際に、BIOを使用した研究において、ブタ膵臓間葉系幹細胞、ヤギ生殖系幹細胞（mGSCs）における未分化能維持の報告があり、さらに最近の研究では、マウス歯髄由来細胞にBIOを添加すると、未分化幹細胞へ誘導できたとの報告がある[9]。

そこで、BIOが乳歯歯髄由来細胞において未分化能の維持や増強に有効であるかを検討する目的で、乳歯歯髄由来細胞におけるBIOの影響について検討を行った。

その結果、リアルタイムRT-PCRでは、BIO（1.0～1.5μM）が未分化マーカーであるOct3/4、Sox2遺伝子発現を有意に増強し、乳歯歯髄由来細胞の未分化能を増強することが示唆された**（図6）**。またフローサイトメトリーでは、BIO（1.0μM）が間葉系幹細胞マーカーであるCD44およびCD90発現を有意に増強したことから、BIO添加により乳歯歯髄由来細胞は幹細胞特性が増加することが示唆された[10]**（図7）**。

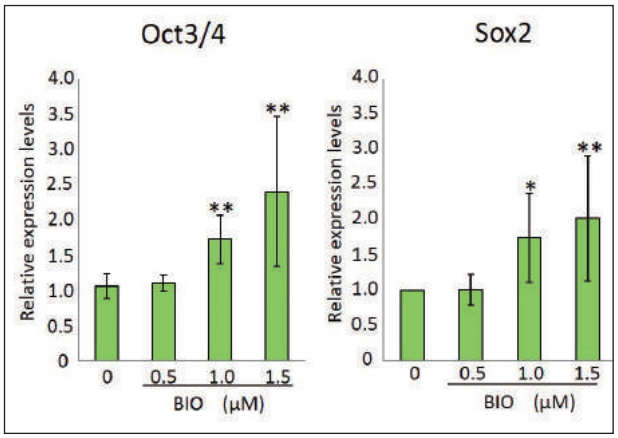

図６：real-time RT-PCRによるmRNA発現変動

Comparisons of the mRNA expression levels in human deciduous dental pulp cells (hDPCs) stimulated with BIO shown. These graphs showed gene expressions of Sox2 and Oct3/4. hDPCs stimulated with 0.5, 1.0 and 1.5μM BIO were incubated for 48 hour, collected and analyzed of mRNA expression levels by real-time RT-PCR. Results were all expressed as the mean ± SE. *P<0.05, **<0.01, when compared with untreated hDPCs. (n=3)

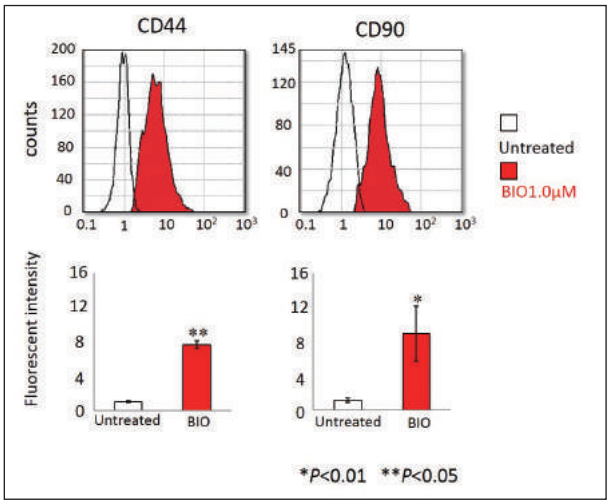

図７：Flow cytometryによる未分化間葉マーカーの発現変動

The expression of CD44 and CD90 were showed. Human deciduous dental pulp cells (hDPCs) stimulated with 1.0μM BIO were incubated for 48h, analyzed the expression of CD44 and CD90 by flow cytometry. (n=3) Mean fluorescent intensity is provided in Fig.7 bottom where values are Mean ±SE from three different specimens. *P<0.05, **<0.01, when compared with untreated hDPCs.

３）低酸素下での培養

幹細胞は通常20%酸素下で培養されているが、歯髄細胞や歯根膜細胞を低酸素状態で培養することにより、その幹細胞特性を維持できることが報告されている[11)]。また低酸素培養により、ヒトとマウスのiPS細胞の作製効率が大幅に向上することが報告され[12)]、低酸素下での未分化間葉細胞の変化について多くの研究が進められている。そこで、乳歯歯髄由来細胞における幹細胞特性の維持が、低酸素培養下で可能であるかどうかを検討する目的で、低酸素培養下における細胞増殖能および未分化マーカー遺伝子発現の検討を行った。

２%酸素条件下および20%酸素条件下で２日間培養した乳歯歯髄由来細胞の増殖能をMTS Assayにより比較したところ、わずかに低酸素下での増殖能増強が認められたが、有意な変化は認められなかった（**図8**）。また、Real time RT-PCRにより遺伝子発現変動を検討した結果、２%酸素条件下で培養した乳歯歯髄由来細胞は、20%酸素条件下で培養した細胞と比較して、低酸素状態で増強するといわれているHIF、未分化マーカー遺伝子であるOct4/3、Sox2、C-Myc、全ての遺伝子発現増強が認められ、特にHIF、C-mycに関しては有意な増強が認められた（**図9**）。

以上の結果より、低酸素条件下での培養は乳歯歯髄細胞の細胞生存率にはほぼ影響を与えないことが明らかとなった。また2%酸素条件下での培

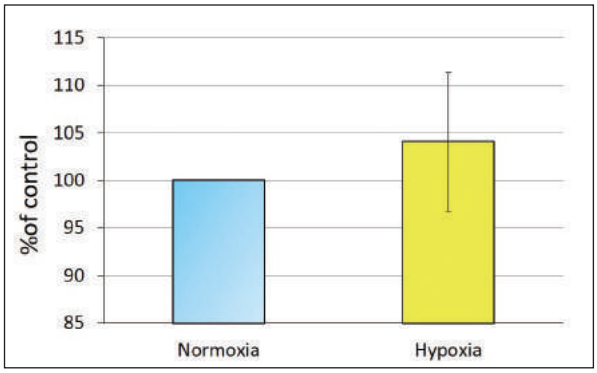

図８：低酸素培養下における細胞増殖能の変化（２日間培養）

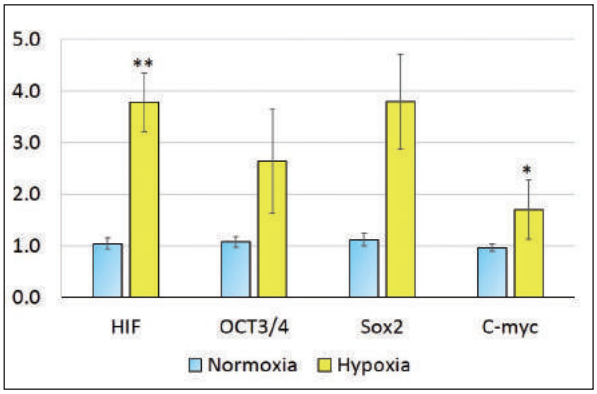

図９：real-time RT-PCRによるmRNA発現変動

Comparisons of the mRNA expression levels in human deciduous dental pulp cells (hDPCs) incubated under 2% or 20% O_2 conditions shown. These graphs showed gene expressions of HIF, OCT3/4, Sox2 and C-myc. hDPCs were incubated for 48 hour, collected and analyzed of mRNA expression levels by real-time RT-PCR. Results were all expressed as the mean ± SE. *P<0.05, **<0.01, when compared with untreated hDPCs. (n=3)

養で、未分化マーカー遺伝子発現が増強されたことから、乳歯歯髄細胞においても低酸素培養は通常の20%培養条件下よりも未分化能を維持できることが示唆された。

乳歯歯髄細胞は、すでに神経細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞などへの分化が確認されており、今後、低酸素下で培養した乳歯歯髄由来細胞においてもその分化能に変動がないかを、各種分化誘導培地を用いて検討を行う必要がある。

4. 乳歯歯髄由来細胞に存在するMuse細胞の検討

近年ヒト間葉系組織や間葉系培養細胞において多能性を有するが腫瘍性を持たないとされる新たなタイプの体性幹細胞 Multilineage-differentiating stress enduring（Muse）細胞が報告され、研究が進められている。Muse細胞は１細胞から３胚葉性の細胞に分化可能で、またストレス耐性能、多能性幹細胞マーカーの発現、自己複製能などを有するとされている細胞である。また生体に存在することから腫瘍性増殖を示さないという大きな利点を有し、間葉系幹細胞と多能性幹細胞の両方の特徴を備えており、間葉系マーカーCD105とヒトES細胞マーカーSSEA-3の二重陽性細胞として組織や間葉系の培養細胞から単離可能であると報告されている。さらに、腫瘍を作らないという安全面だけでなく、分化誘導もせずにそのまま生体内に投与するだけで組織修復細胞として働くことが確認されており、Muse細胞の母集団となる間葉系幹細胞は現在世界中で数多くの臨床試験が展開され、安全性が確認されている[13)]。

Muse細胞は、成人ヒトの皮膚、骨髄、脂肪組織、歯髄に存在することがすでに確認されており、今後Muse細胞を精製することや、比率を上げることによって組織修復効率の向上、再生医療への応用が期待される。このような背景に基づき、乳歯歯髄由来培養細胞に存在するMuse細胞を組織修復へと応用することを目的として、まずは乳歯歯髄由来培養細胞からMuse細胞を分離することを行った。

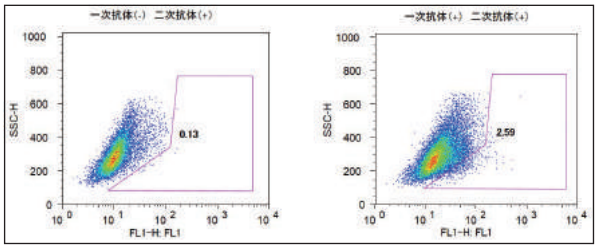

図10：乳歯歯髄細胞SSEA-3（+）2.46%±0.5

1）SSEA-3陽性細胞の発現検討

培養歯髄細胞を10cm dishに播種、コンフレント時に細胞を回収、一次抗体としてAnti-Stage-Specific Embryonic Antigen-3, clone MC-631（Millipore）、二次抗体としてAnti-rat IgM antibody, FITC conjugates（Jackson Immunoresearch）を反応させ、Flow cytometry（Becton Dickinson）を用いて、SSEA-3の発現を測定した。その結果、乳歯歯髄培養細胞において2.46%のSSEA-3陽性細胞が確認できた（**図10**）。

2）SSEA-3陽性細胞の培養

Flow cytometryでソーティングしたSSEA-3（+）細胞を限界希釈し、poly-HEMAコートした96wellプレートの各wellにシングル細胞で播種、以後３日毎に10%FBS含有α-MEMを30mlずつ追加しながら７日培養後に形成されたクラスターをpick upした。

乳歯歯髄由来細胞におけるSSEA-3陽性細胞を確認し、なかでも乳歯歯髄は永久歯歯髄（0.75%）よりもSSEA-3を多く発現していることを確認した。さらにSSEA-3陽性細胞をソーティングし培養すると、Muse細胞の元となると考えられるクラスター形成がみられた（**図11**）。

今後は、乳歯歯髄由来細胞から分離されたクラスターにおける分化能の検討、損傷歯髄組織に対する修復能の検討を行い、さらにはMuse細胞の製精、存在比率を上げる方法について検討していく必要がある。

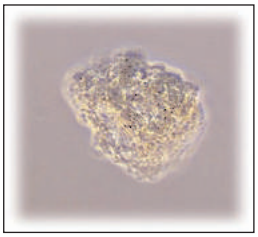

図11：single cell suspension culture による乳歯歯髄細胞のクラスター形成（培養７日目）

5．おわりに

歯髄疾患に罹患し、抜髄や感染根管治療となる症例は非常に多く、歯の延命化のために歯髄再生医療へのニーズは高まってきている。乳歯歯髄由来幹細胞の安全で効率の良い採取方法や増幅方法、適切な培養条件等の確立が出来れば、歯髄由来幹細胞の早期臨床応用が期待できる。また、必要な時に必要な細胞を得ることができるよう、歯髄細胞バンクの構築も必要となる。現在、イヌ非臨床研究が報告されており、抜髄後の根管内に歯髄幹細胞と特定の遊走因子を移植することで、血管、神経、歯髄の再生が確認され、歯髄再生治療の安全性が明らかになってきている[14)]。現在行われている歯髄疾患に対する一般的な治療法は、感染源となる炎症性歯髄組織を機械的清掃および化学的清掃によって除去し、根管内を人工物で充填することであるが、根未完成歯などの歯内治療は非常に困難であるため、歯髄幹細胞を移植し、歯髄の再生を図ることが期待されている。根未完成歯の歯内治療では、歯髄壊死した根未完成歯の根尖部からの出血に伴う残存細胞の活性化により、硬組織用組織を再生するという、revascularizatuionが注目されている[15)]。このような治療法においても自己の歯髄幹細胞と特定の因子の移植を組み合わせることにより、より良い予後が期待できると考えられるため、乳歯歯髄幹細胞特性を解明するさらなる研究を進めていく予定である。

謝　辞

以上の研究は、河合咲希助教（大阪歯科大学小児歯科学講座）との共同研究により行った。また平成23年～24年科学研究費若手研究（B）（課題番号23792459）および平成25年～27年度科学研究費基盤研究（C）（課題番号25463208）の研究補助金の支援によって行った。

参考文献

1) Morita, M et al.: Reasons for extraction of permanent teeth in Japan. Community Dent. Oral Epidemiol. 22, 1994.
2) Tsutomu Sugaya: Clinical survey of vertically fractured teeth and theoretical background for bonding treatment. Ann Jpn Prosthodont Soc. 6, 14-19 2014.
3) 安藤雄一, 相田潤, 森田学, 青山旬, 増井峰夫: 永久歯の抜歯原因調査報告書. 8020推進財団. 2005.
4) Nakamura S, et al.: Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. J Endod 35, 1536-42 2009
5) Kenmotsu M, et al.: Analysis of side population cells derived from dental pulp tissue. Int Endod J 43, 1132-1142 2010
6) Miura M, et al.: SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 5807–5812 2003
7) Momoko Sato, et al.: Characterization of Cultured Human Mesenchymal Stem Cells from Deciduous and Permanent Teeth.　小児歯科学雑誌 52, 409-416 2014.
8) Sato N, et al.: Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells though activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. Nature Medicine 10, 55-63 2004
9) Zhu H, et al.: Effect of GSK-3 inhibitor on the proliferation of multipotent male germ line stem cells (mGSCs) derived from goat testis. Theriogenology 77, 1939-50 2012
10) Kawai S, et al.: Effect of 6-bromoindirubin-3'-oxime on human deciduous tooth dental pulp cells. Oral Therapeutics and Pharmacology 31(3), 87-95 2012
11) Zhou Y, et al.: The effect of hypoxia on the stemness and differentiation capacity of PDLC and DPC. Biomed Res Int. ID890675 2014
12) Yoshinori Yoshida, et al.: Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell 5, 237-41 2009
13) Kuroda et al.: Unique multipotent cells in adult human mesenchymalcell populations. PNAS 107, 8639–8643 2010
14) Koichiro Iohara et. al.: A Novel Combinatorial Therapy With Pulp Stem Cells and Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Total Pulp Regeneration. Stem Cells Trans Med 521-533 2013
15) 牛窪敏博他: パルプ・リバスクラシゼーションの科学と臨床. Quintessence　33 96-112 2014