

講演

歯髄幹細胞の基礎医学と細胞治療における今後の展望

本田雅規

●抄録●

本稿では、現在考えられている歯髄幹細胞の歯髄内における働きから、歯髄幹細胞を用いた細胞治療の現状および今後の細胞治療の展望について概説させていただきます。

歯髄幹細胞は歯髄では線維芽細胞と象牙芽細胞に分化して象牙質・歯髄複合体を維持しています。一方で、この歯髄幹細胞を生体外に取り出すと骨芽細胞、脂肪細胞および軟骨細胞に分化します。従来は、この歯髄幹細胞の分化能を応用する再生医療が主でした。近年、歯髄幹細胞を含む間葉系幹細胞には抗炎症作用、血管新生作用および免疫抑制作用などの能力を備えることが明らかになってきました。今後は、この間葉系幹細胞から産生される液性因子に期待する細胞治療が主流になると考えられます。一方で、現在は間葉系幹細胞を用いた細胞治療は自家細胞移植が主ですが、同種細胞移植が注目されています。同種細胞移植における細胞源としての歯髄幹細胞の有利な利点についても考察させていただきます。

キーワード：間葉系幹細胞、細胞治療、歯髄幹細胞、自家細胞移植、同種細胞移植

I. はじめに

2年前に制定された再生医療新法によって、再生医療の臨床研究は認可されやすくなり、細胞の製品化も早期に実現できるようになりました。IPS細胞の適応となる治療もあれば、間葉系幹細胞が適応となる疾患も多いことから、今後、ますます歯髄幹細胞を含む間葉系幹細胞による細胞治療の開発が進むと思われま

す。歯科領域における再生医療もしくは細胞治療の研究を富士山の登山で例えるならば、歯全体を再生させる研究は、まだ、1合目に到達した程度と思われま

す。においては、5合目まで登ってきています。では、山頂まで到達するにはどのような方法が必要なのでしょう。という問いかけを本稿のゴールとして、歯髄幹細胞を用いた細胞治療の今後の展望について概説させていただきます。

II. 歯髄の中の歯髄幹細胞の働き

図1は脱灰切片をヘマトキシリン・エオジン溶液で染色した歯の組織像です。歯髄は象牙質に囲まれた結合組織で、最表層から象牙芽細胞層、細胞希薄層、細胞稠密層、歯髄中心部の4層に分かれています。最表層に並んでいるのが象牙芽細胞です。

歯髄幹細胞の歯髄内における働きは、歯髄幹細胞を増やすことと線維芽細胞と象牙芽細胞を作り出すことです。線維芽細胞からは歯髄そのものの組織が形成され、象牙芽細胞からは象牙質が形成されます。一つの例を示しますと、何らかの要因で、線維芽細胞や象牙芽細胞が必要になると歯髄幹細胞が二つの細胞に分裂します。二つに分裂した細胞の片方が線維芽細胞に分化したり、象牙芽細胞に分化したりします。多くの場



※冬期学会講師

(ほんだ・まさき)

医学博士

歯科医師

愛知学院大学歯学部 口腔解剖学講座

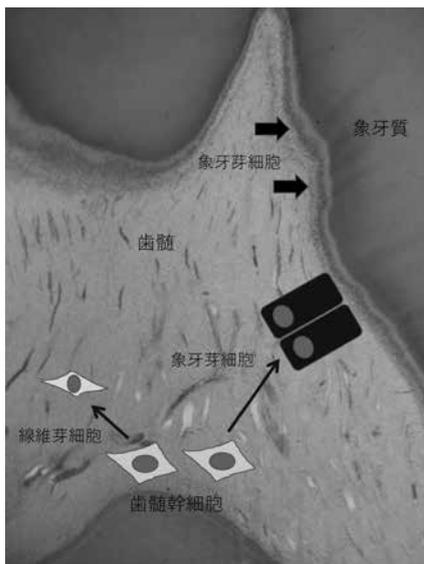


図1 歯髄幹細胞の生体での役割。歯髄幹細胞は歯髄の中で、線維芽細胞に分化したり、象牙芽細胞に分化したりする

fig. 1 Function of dental pulp stem cells (DPSCs) in dental pulp. DPSCs have multilineage differentiation potential into fibroblasts and odontoblasts

合、幹細胞が分裂したらその一つは、歯髄幹細胞として維持されます。これを「自己複製能」といいます。歯髄幹細胞は驚く事に、歯髄の中で、線維芽細胞と象牙芽細胞に状況に応じて分化できるすごい能力を持っています (図2)。

次は、臨床から歯髄幹細胞の働きを考えましょう。象牙質や歯髄の再生現象は昔から知られています。例えば、咬耗や歯の切削等の刺激に反応して第3象牙質が形成します。また、齲蝕の除去中に露髄すると直接覆罩材を添付し象牙質形成を促す治療を行います。その時、歯髄幹細胞は、直接覆罩材の刺激によって象牙芽細胞に分化し直接覆罩材の直下に象牙質を形成します。これで、空いた穴が塞がります。すでに、歯科医師は歯髄幹細胞を利用した治療をしてきました。ただ、幹細胞の概念が無かったのです。

Ⅲ. 再生医療と細胞治療

20年ほど前に再生医療の第一次ブームがありました。当時は、幹細胞の分化能に期待していました。つまり、骨を再生したいときには、骨芽細胞に分化できる細胞を移植していました¹⁾。その後、移植した細胞

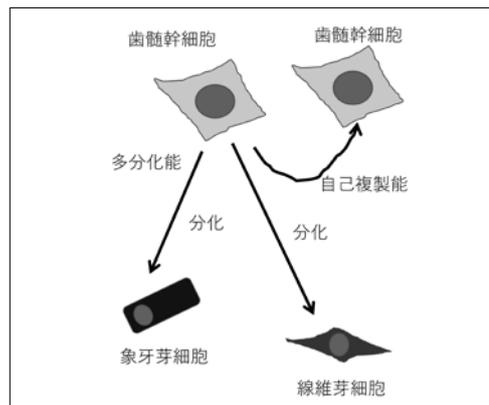


図2 歯髄幹細胞の自己複製能と多分化能。自分を作り出せることを自己複製能という。二つの細胞に分化する能力があるので多分化能を持つ

fig. 2 Self-renewal and multipotent function of DPSCs

が長期間、組織に存在しないという驚く報告ができました。移植した細胞は、組織の形成にあまり関与していませんでした。しかし、細胞を移植すると移植しない場合と比較して有意な差をもって組織は形成されます。これはどういうことでしょうか？ 間葉系幹細胞は多様な成長因子を分泌します。その分泌された因子が、もともと生体にいる間葉系幹細胞を刺激して組織が再生されることが分かってきました。これをトロフィック効果といいます。我々の実験で、ラットの脂肪由来細胞を歯周組織の欠損部に移植すると、ほとんどの細胞は確認できませんでしたが、一部の細胞は、再生した組織に生存していました^{2, 3)}。その後の研究から血管誘導因子、炎症抑制因子、免疫寛容に関与する因子が分泌されていることが分かっています。疾患の多くは炎症ですから、炎症性疾患には間葉系幹細胞の移植が適応できます。これが細胞治療であり、大きな期待がよせられています。

Ⅳ. 歯髄幹細胞は細胞治療の細胞源として有利

間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪、歯根膜、そして歯髄から採取可能です。骨髄や皮下脂肪などからの採取には身体に侵襲が加わりますが、抜歯された歯から歯髄を採取する時には身体に侵襲が加わりません。また、乳歯の間葉系幹細胞の増殖能が高いことは良く知られています⁴⁾。さらに、脱落した乳歯からも歯髄幹細胞が入手できることも、乳歯が最も入手しやすい細胞治療の細胞源と考えられる理由です (図3) ⁵⁾。

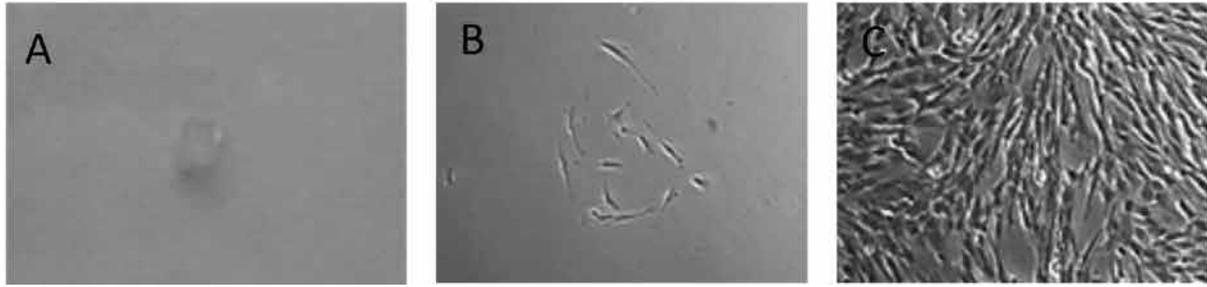


図3 A: 脱落した乳歯、B: 脱落した乳歯の歯髄からも歯髄幹細胞が採取できる、C: 乳歯の歯髄幹細胞の増殖能は高い
fig. 3 A) Deciduous tooth, B) Stem cells from dental pulp in deciduous tooth, C) High proliferation potential of cells from deciduous teeth

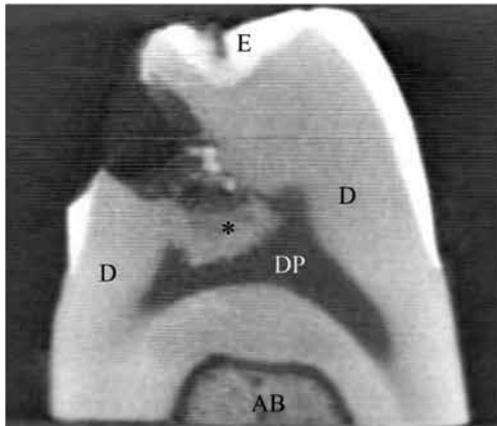


図4 白歯部の露髄部分に新生象牙質が形成されている (*). E: エナメル質、D: 象牙質、DP: 歯髄、AB: 歯槽骨

fig. 4 Newly dentin bridge formation on the exposed dental pulp after the transplantation of DPSCs
E: enamel, D: dentin, DP: dental pulp, AB: alveolar bone

V. 間葉系幹細胞を用いた再生医療と細胞治療

我々は歯髄幹細胞を用いて象牙質と歯髄の再生を試みたことがあります⁶⁾。犬の臼歯の歯髄を露髄させて歯髄幹細胞を移植しました。細胞の足場となる担体には β -TCPを用いました。移植後6週が経過すると、マイクロCTにて象牙質橋が確認できました(図4)。組織学的にも元の歯根と連続する象牙質が観察されました。この実験から一つの課題が生まれました。歯髄幹細胞を得るのに健全な歯が必要になることです。

昨年、間葉系幹細胞が歯周病の進行を抑えることを動物実験で明らかにしました⁷⁾。マウスの歯肉溝に糸を巻いて歯周病を発生させます。一方で、糸を巻いた同日に、糸を巻いた歯の周囲の歯肉に注射針で間葉系幹細胞を投与しました。すると、歯槽骨破壊が有意に抑えられたのです(図5)。間葉系幹細胞を、歯の近

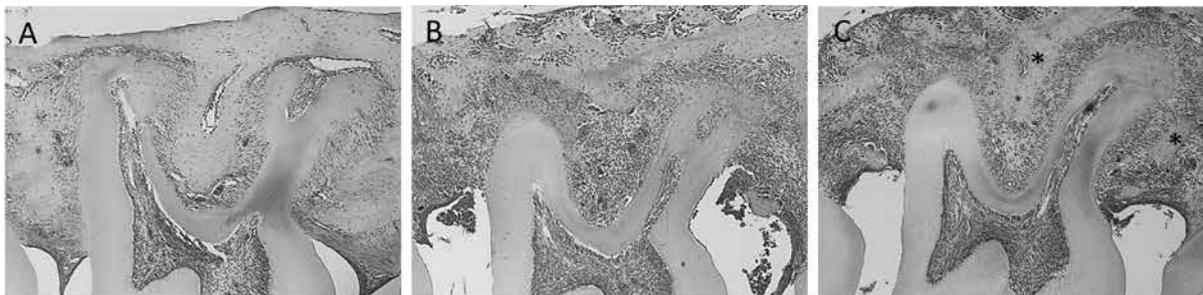


図5 マウスに歯肉に間葉系幹細胞を投与すると歯周炎が抑えられる

A: 正常なマウスの歯周組織像、B: 臼歯の歯肉に糸をまくと歯周炎が発症し、歯槽骨は吸収して、観察できない、C: 歯肉溝に糸を巻いた直後に細胞を近心側の歯肉に投与すると、近心側の歯槽骨の吸収が有意に抑えられた。*: 歯槽骨

fig. 5 Inhibition of periodontitis by transplantation of mesenchymal stem cells in mice

A) Low-magnification histological images revealed no alveolar bone resorption around second molar tooth in no-ligation control group. B) Approximately 50% of alveolar bone in the mesial and distal roots was resorbed in the ligature control group at 5 days after ligature placement. C) Approximately 30% of the alveolar bone in the mesial root was resorbed in the ligature and MSCs transplantation group at 5 days after ligature placement

心の歯肉だけに投与すると、近心側の歯槽骨破壊は抑制されましたが、遠心側の歯槽骨は、細胞を投与しない時と同様に破壊されました。拙者が大学院生の時は、炎症部位に細胞を投与することは細胞が死滅するので禁忌とされていました。しかし、今回の実験で、炎症部位に投与した細胞は数日間生存できることが分かりました。今後は、投与した細胞から分泌される因子に期待した細胞治療が発展することでしょう。

VI. 今後の細胞治療の展望

現在、細胞治療は自家細胞移植が主流です。我々の動物実験から脊髄の損傷直後に歯髄幹細胞を損傷部位に直接投与すると後肢の運動機能の悪化が有意に抑制されました（投稿準備中）。では、受傷直後に、歯髄幹細胞を採取して培養して増やすことは可能でしょうか？ 脊髄損傷術後2週間以内を急性期と考えて、それ以降を慢性期としています。慢性期になると炎症もかなり広がり、組織破壊も進行し歯髄幹細胞による回復の見込みはかなり減ることでしょう。実際に、急性期の脊髄損傷患者を対象とした骨髄由来の間葉系幹細胞移植の治験は始まっていますが、この治験では、受傷直後に腸骨から骨髄液を採取し、2週間ほど培養して増やした細胞を点滴にて患者さんに戻します。事前に同種細胞移植できる細胞が保管されていたら、培養期間を待たずに投与できるので、効果はさらに上がると思われれます。

歯科領域においても、歯髄再生治療の臨床研究が始まりました。自家細胞移植では、歯髄幹細胞を採取する歯が必要です。また、患者さんの細胞を採取後に、細胞が培養中に感染したり、増殖が止まったりしたら細胞治療は中止になります。患者さん自身の自家細胞移植にはいくつかのリスクが伴います。そこで、事前に安全性と機能を評価した他人の細胞を使うことにはいくつかの利点があります。すでに、自家細胞において臨床研究の成績が良い疾患においては、同種細胞移植の研究が始まっています。

VII. HLAハプロタイプホモ接合体の細胞

ヒト白血球抗原（Human Lymphocyte Antigen : HLA）とは、ほぼ全ての細胞に分布し、細胞の自他

を区別する型のことです。すなわち、自身の型と異なるHLA型のヒトから細胞や臓器の移植を受けると、体が「異物」と認識し拒絶反応が起きます。HLA型は両親からA座、B座、C座、DR座、DQ座およびDP座と呼ばれる抗原を一つずつ受け取ります。さらに、各抗原には、数十種類の異なる型があるため、自分と完全に一致するHLA型の人を探せる確立は数百～数万人に1人です。

父親と母親から同じHLA型を受けついで細胞を「HLAハプロタイプホモ接合体」といいます。例えばA座についてのみを考えると、両親それぞれから二つの同じ型を受け継ぐと「A1A1」となり、A1A1型の細胞は、A1A2やA1A3の細胞を持つ人に移植しても拒絶反応が起きません。統計学的には、1万種類の細胞のHLA型を解析すると8種類の異なるハプロタイプホモ接合体の細胞が見つかり日本の人口の50%がカバーできるようです。さらに、20万個の細胞を解析すると65種類のハプロタイプホモ接合体の細胞が見つかり人口カバー率は90%になります。

VIII. 歯髄幹細胞による同種移植の利点

統計学的に調査された資料⁸⁾を見ますと、1年間に20万本の乳歯が歯科医院にて抜歯されています。日本のすべての歯科医院から抜歯した乳歯を集めれば、1年間でハプロタイプホモ接合体が65種類も見つかる計算になります。65種類のハプロタイプホモ接合体の細胞が用意できれば、細胞移植を必要とする患者さんの90%の方に提供できることになります。我々歯科医師がこのような事業に取り組むことや細胞治療の製品化を視野に入れた研究開発を始める時期がきたのかもしれない。

IX. おわりに

拙者は医科における再生医療・細胞治療と歯科における再生医療・細胞治療では考え方が異なる面もあると考えています。医科における再生医療は、iPS細胞を用いた医療に代表されるように、これまでに治療方法が無かった医療に対して、幹細胞を用いた治療法が開発されていると感じています。一方で、歯科における細胞治療は、すでに確立された治療方法があり、そ

の治療に使われている材料が細胞に代わるものと考えています。つまり、直接覆罩材を歯髄幹細胞に置き換えたり、エムドゲイン®を細胞に置き換えたりすることで、治療が可能になりますので、将来、歯科医師による細胞治療は多くの国民に貢献できることになるでしょう。

参考文献

- 1) Tsuchiya S, Ohshima S, Yamakoshi Y, Simmer JP, Honda MJ : Osteogenic differentiation capacity of porcine dental follicle progenitor cells. *Connect Tissue Res*. Jun, 51(3) : 197-207, 2010.
- 2) Akita D, Morokuma M, Honda MJ. et al : Periodontal tissue regeneration by transplantation of rat adipose-derived stromal cells in combination with PLGA-based solid scaffolds. *Biomed Res*, 35(2) : 91-103, 2014.
- 3) Akita D, Kano K, Honda M. et al : Use of Rat Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells as a Cell Source for Periodontal Tissue Regeneration. *Front Physiol*. 2016.
- 4) Toriumi T, Takayama N, Honda MJ. et al : Characterization of mesenchymal progenitor cells in the crown and root pulp of primary teeth. *Biomed Res*, 36(1) : 31-45, 2015.
- 5) Mikami Y, Ishii Y, Honda MJ. et al : CD271/p75 (NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells Dev*, 20(5) : 901-13, 2011 May.
- 6) Ando Y, Honda MJ, Ohshima H. et al : The induction of dentin bridge-like structures by constructs of subcultured dental pulp-derived cells and porous HA/TCP in porcine teeth. *Nagoya J Med Sci*, 71 (1-2) : 51-62, 2009 Feb.
- 7) Iguchi S, Suzuki D, Honda M. et al : Effect of local bone marrow stromal cell administration on ligature-induced periodontitis in mice. *J Oral Sci*, 59(4) : 629-637, 2017.
- 8) 安藤雄一 : 社会医療診療行為別調査を用いた歯の喪失状況の現状把握, *ヘルスサイエンス・ヘルスケア*, 11(1), 2011.

Stem Cell Biology of Dental Pulp and Future Prospects for Cell Therapy of Dental Pulp Stem Cells

Masaki HONDA, D.D.S., Ph.D.

Aichi Gakuin University School of Dentistry

This article describes the function of dental pulp stem cells in dental pulp, the current state of cell therapy using dental pulp stem cells, and the prospects for such cell therapy in the future. Dental pulp stem cells can differentiate into fibroblasts and odontoblasts that maintain the dentin/pulp complex. However, when these cells are cultured under specific conditions, they differentiate into osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes. Traditionally, regenerative medicine using dental pulp stem cells was mainly developed based on their differentiation potential. In recent years, the therapeutic applications for regenerative medicine using mesenchymal stem cells, including dental pulp stem cells, are attributed to their anti-inflammatory, angiogenic, and immunomodulatory properties. In the future, cell therapy using the trophic effect of mesenchymal stem cells will become mainstream. However, at present, cell therapy using mesenchymal stem cells mainly uses autologous cell transplantation. Nevertheless, allogeneic cell transplantation is slowly attracting attention. We could also consider the advantages of dental pulp stem cells as a cell source in allogeneic cell transplantation.

Key words : Allograft, Autograft, Cell Therapy, Dental Pulp Stem Cells, Mesenchymal Stem Cell