

令和元年5月23日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11644

研究課題名(和文) 口腔内神経堤幹細胞の採取部位別生物学的共通点と相違点を解明する次世代再生医学研究

研究課題名(英文) Next-generation research for regenerative medicine to elucidate the biological similarities and differences of the intraoral neural crest-derived cells from distinct sites.

研究代表者

阿部 成宏 (Abe, Shigehiro)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：00510364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多くの顎口腔組織由来幹細胞は神経堤幹細胞の特徴を有している。これらは、一見同じ表現型を示しているがその違いは明らかになっていない。同一患者より歯乳頭、歯根膜および口腔粘膜を採取し、由来細胞を単離した。各組織幹細胞の幹細胞生物学的検討を行った。各組織において神経堤幹細胞マーカーおよび神経堤マーカーの発現を認めた。各組織由来細胞の表面マーカー解析では、ほぼ同様の表現型を示した。スフェア形成細胞は、幹細胞マーカーを発現し、*in vitro*下での分化能は神経堤細胞系統への分化能を認め、しかしながら、口腔粘膜幹細胞は歯乳頭および歯根膜と比較し硬組織形成細胞分化は低く、脂肪細胞分化が高い事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれは、顎口腔領域の幹細胞の代表である歯乳頭、歯根膜および口腔粘膜間質由来幹細胞の幹細胞特性に関して検討した。その結果、大部分の幹細胞特性は、共通しているにもかかわらず、分化能などに違いがあることを、同一患者、同一部位、同一時期に3つの組織を採取することにより個体差を最小限に比較することができた。本研究から、神経堤由来の幹細胞には採取部位によって、目的の再生しやすい組織が異なることを見出した。個々の幹細胞にはその有用性には部位特異的な特徴を有しており目的とする再生組織を考慮し、どの組織幹細胞を用いるのかを検討する必要があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Oral and Maxillofacial tissue-derived stem cells have the capability of the neural crest stem cells. These stem cells have the same stemness characteristics. However, it is suggested that the capability of multilineage differentiation differ at the collection site. Apical papilla (AP), periodontal ligament (PDL) and oral mucosa (OM) were collected from the same patients. These tissue-derived cells were obtained from each tissue. Then, stem cell biological analyses were investigated. The neural crest stem cell markers and neural crest-related markers were confirmed in AP, PDL and OM tissues. As a result of candidate markers and surface marker analyses of each tissue-derived cell, it showed almost the same phenotype. Sphere-forming cells expressed stem cell markers and had the ability to differentiate into neural crest cell lineages. While OM cells had a higher adipogenic differentiation, AP and PDL cells exhibited a higher osteogenic potential.

研究分野：再生歯科

キーワード：顎口腔組織 幹細胞 再生医学 神経堤幹細胞 分化

## 1. 研究開始当初の背景

歯の発生には神経堤由来の細胞が大きく関与している。現在までに報告されている神経堤幹細胞の分離方法は非常に複雑であり、非常に高額な機器を用いなければならないのが現状であった。以前の報告で神経幹細胞と同様に皮膚由来、骨髄由来の神経堤幹細胞でも無血清培地下にb-FGFとEGFを添加させ、浮遊培養することでneurosphere形成を認め、幹細胞が濃縮されることが示唆されている。そこでわれわれは、neurosphere法を用いてヒト根未完成歯根尖部歯髄幹細胞およびヒト口腔粘膜幹細胞の簡便な分離方法に関して報告した ([Abe S et al. Stem Cell Res Therap](#), 2012, [Abe S et al. Stem Cells Transl Med](#), 2016)。これらは、それぞれの細胞を見ただけでは神経堤由来の細胞であり、分化能も神経堤細胞系統への分化が認められることから、同じ神経堤幹細胞にカテゴライズされているが、実際にこれらを細胞生物学的に実験していると、その違いが多分に存在している。今までにこれらを同一条件で比較している報告はない。

## 2. 研究の目的

歯髄および口腔粘膜由来sphere形成細胞は一見同じ表現型を示すが、分化能に違いがある。再生医療においては、同系統の組織幹細胞であっても、ターゲットとする組織に適切に分化しやすい細胞でなければならない。現在までに各口腔組織のsphere分離法で単離された細胞集団の共通点と相違点を詳細に同一患者由来の細胞で解析した報告はない。そこで、本研究では各種ヒト口腔組織幹細胞における最適な再生組織が何であるのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織採取

東京都立広尾病院倫理委員会ならびに東京医科歯科大学歯学部倫理委員会の承認のもと、同一患者の智歯抜歯時に採取される歯乳頭組織、歯根膜組織および口腔粘膜組織を採取した。

### (2) 組織学的検討

採取された組織を4%パラホルムアルデヒドにて固定後、PBSにて洗浄しOCTコンパウンドに包埋し、凍結切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色およびnestin (eBioscience) とCD44 (BD Pharmingen) の蛍光免疫染色を行った。

### (3) 細胞培養

採取した各組織を2-3mm大の組織片に細片し、各組織片を培養皿に接着させ、10%FBS添加のIMDM培地にて3週間培養し、初代培養を行った。その後、 $2.0 \times 10^4$ 細胞/wellにて継代培養を行った。

### (4) コロニーアッセイ

500細胞/wellにて6穴プレートに播種して、14日後のコロニー形成能をクリスタルバイオレット染色にて染色し計測した。

### (5) Flow cytometry

各表面マーカーに対する抗体にて、1時間室温にて反応後、PBSにて洗浄し、蛍光標識した2次抗体を30分室温にて反応後、PBSにて洗浄し解析に用いた。用いた抗体はCD29、CD73、CD90、CD34およびCD45 (すべてBD Pharmingen) を用いた。

### (6) Neurosphere培養

継代された単層培養の細胞を酵素処理し、シングルセルにしたのち、超低付着培養皿 (Cellseed) にてDMEM/F12培地 (Gibco) にN2サプリメント (Gibco)、20ng/ml のb-FGF (Peprotech) およびEGF (Sigma) を添加した培地にて7日間培養し、sphere形成細胞を得た。

### (7) マイクロアレイ

Agilent Technologies社製、SurePrint G3 HumanGE Microarray8x60Kv3にて発現解析を行う

た。

#### (8) 分化誘導

Sphere形成細胞を培養皿に付着させ、1週間、培養後に分化誘導を行った。

硬組織形成細胞への分化：間葉系幹細胞骨芽細胞分化培地 (PromoCell) に100ng/mlのBMP-2 (Peprotech) 添加し、分化誘導を3週間行った。

脂肪細胞分化：過去のわれわれのプロトコールにて3週間分化誘導を行った (Abe S *et al. Oral Sci Int*, 2006)。

軟骨細胞分化：間葉系幹細胞軟骨細胞分化培地 (PromoCell) を用いてマイクロマスベレット培養を3週間行った。

平滑筋細胞分化：過去のわれわれのプロトコールにて3週間分化誘導を行った (Abe S *et al. Cell Biol Int*, 2012)。

神経細胞分化：間葉系幹細胞

神経細胞分化培地

(PromoCell) にて分化誘導を1週間行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 各組織の組織学的評価

神経堤幹細胞マーカーとして nestin および CD44 の共陽性細胞の局在を検討した。歯乳頭組織では根尖部歯髄と象牙質の移行部に、歯根膜では、中央部に、口腔粘膜では上皮直下の粘膜固有層に nestin<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>陽性細胞を認めた (図-1)。

これらの組織から mRNA を抽出し、RT-PCR にて神経堤幹細胞マーカーならびに神経堤関連遺伝子の評価したところ、nestin、CD44、SNAI1、SNAI2、Msx1、Sox9 および Hes1 陽性であり、これらの組織中に神経堤幹細胞が存在する可能性を示唆した。

##### (2) 各組織由来細胞の性状解析

各組織から Outgrowth 培養にて初代細胞を得た。その後、継代し、各実験に用いた。細胞増殖能は、有意差は認められなかった。コロニー形成能は、口腔粘膜で最も高い結果を示した。各組織由来細胞における nestin<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>陽性細胞は、大部分の細胞で陽性を示した。表面マーカー解析の結果、間葉系幹細胞マーカーである CD29、CD73 および CD90 は陽性であり、血球系マーカーである CD34

および CD45 は陰性であった (図-2)。各組織由来細胞における、マーカー発現に関しては、部位によって発現が異なるマーカーを見出し、現在詳細な検討を行っている (投稿準備中)。

##### (3) Neurosphere 法による幹細胞純化

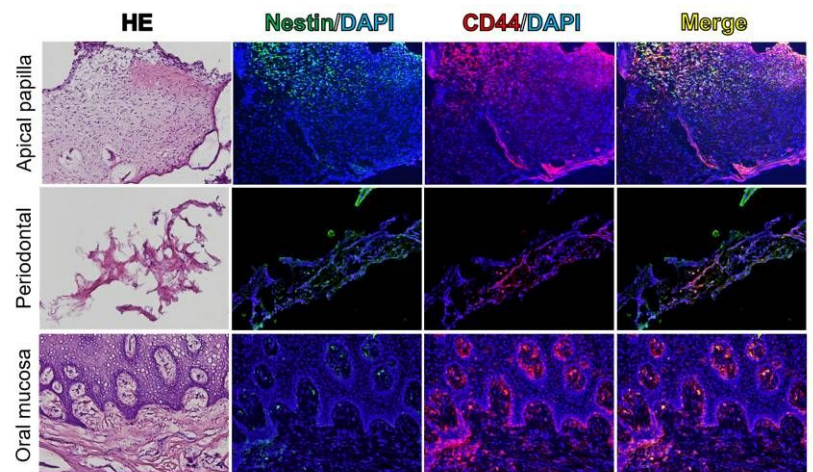


図-1: 歯乳頭、歯根膜および口腔粘膜組織の組織学的検討

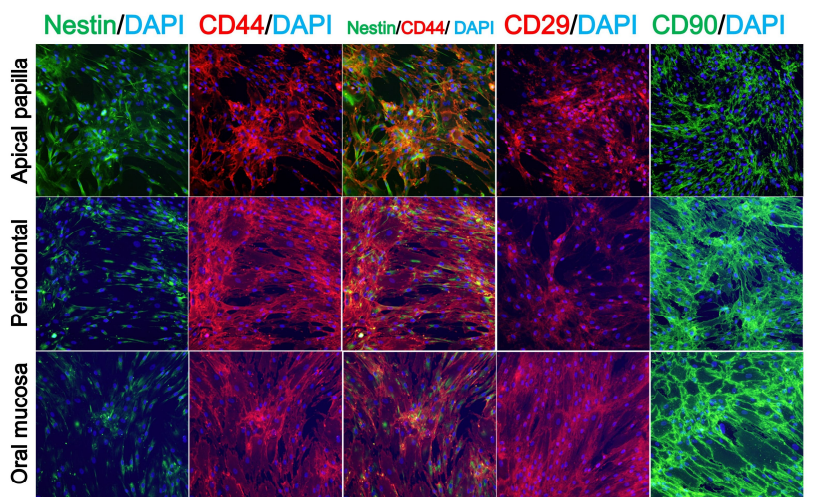
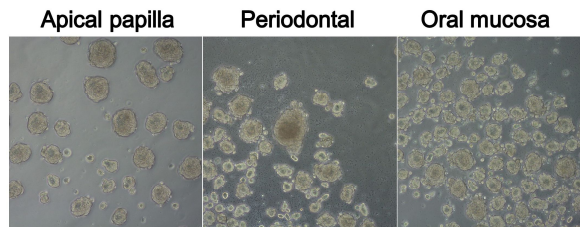


図-2: 各組織由来細胞の幹細胞マーカーの発現

われわれは、今までの研究にて歯乳頭組織および口腔粘膜間質組織由来細胞より neurosphere 法によって幹細胞をより多く単離できうることを報告している (Abe S *et al. Stem Cell Res Therap*, 2011. Abe S *et al. Cell Biol Int*, 2012,



図—3 : Neurosphere法により単離されたsphere形成細胞

Abe S *et al. Stem Cells Transl Med*, 2016. )。また、歯根膜由来細胞においても幹細胞が enrich されることが報告されている (Osathanon T *et al. Stem Cells Dev*, 2013. )。

無血清の DMEM/F12 に N2 サプリメント、b-FGF および EGF を添加した培地にて超低付着培養皿にて培養すると、球状のスフェア形成細胞を認める(図 3)。これらは、nestin<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>細胞集団であり、神経堤関連遺伝子 (SNAI1, SNAI2, Msx1, Sox9 および Hes1) の発現を認めた。マイクロアレイの結果、各組織間の神経堤関連遺伝子に差は認められなかったが、ある種の遺伝子にて歯乳頭、歯根膜および口腔粘膜由来の sphere 形成細胞における遺伝子発現の異なる遺伝子を見出した。その結果、歯乳頭と歯根膜が非常によく似た遺伝子の発現パターンであることを見出した。現在、詳細な検討を行っている (投稿準備中)。

#### (4) 各組織由来の sphere 形成細胞の神経堤細胞系統への分化能

各組織由来細胞から形成された sphere 形成細胞は、神経堤細胞系統である硬組織形成細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞および神経細胞系統へと分化誘導実験を行い、すべての細胞がこれらの神経堤細胞系統へと分化することに成功した。その中で、特に硬組織形成細胞ならびに脂肪細胞分化において顕著な分化の違いを見出した。歯乳頭および歯根膜細胞では硬組織形成細胞への分化は著名であるが、一方で脂肪細胞分化能が低く、口腔粘膜細胞では、硬組織形成細胞への分化能は非常に低いが、脂肪細胞分化能は高い事を見出した。

顎口腔領域の幹細胞の代表である、歯乳頭、歯根膜および口腔粘膜間質細胞は、従来の幹細胞マーカーの発現では、同じ表現型を示し、神経堤細胞系統への分化能を保持しているため、神経堤幹細胞の特徴を有している。しかしながら、同一患者、同一時期および同一部位から採取した組織から得た細胞にて分化能に違いがあることを見出すことに成功した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

(1) Moro A, Abe S, Yokomizo N, Kobayashi Y, Ono T, Takeda T. Topographical distribution of neurovascular canals and foramens in the mandible: avoiding complications resulting from their injury during oral surgical procedures. *Helvion*, 4 (9), e00812, 2019. 【原著論文、査読あり】(DOI: 10.1016/j.helivion.2018.e00812)

(2) 阿部 成宏、山口 聡、依田 哲也 : ヒト口腔粘膜由来の Sphere 形成細胞は、神経堤由来細胞を多く含む . *日本再生医療学会雑誌* ,17(3) ,93-98 ,2018 .【総説論文、査読なし】(DOI: なし)

(3) Ishii S, Abe S, Moro A, Yokomizo N, Kobayashi Y. The horizontal inclination angle is associated with the risk of inferior alveolar nerve injury during the extraction of mandibular third molars. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 46(12), 1626-1634, 2017. 【原著論文、査読あり】(DOI: 10.1016/j.ijom.2017.07.010.)

(4) Yoshida C, Yamaguchi S, Abe S, Harada K. Property of Human Bone Marrow Stromal Cells Derived From Bone Fragments Removed in Sagittal Split Ramus Osteotomy. *Journal of Craniofacial Surgery*, 27(4), 1104-1109, 2016. 【原著論文、査読あり】(DOI:

10.1097/SCS.0000000000002599.)

〔学会発表〕(計4件)

(1) 阿部 成宏, 茂呂 歩実, 石井 滋, 横溝 尚子, 小林 裕: 上下顎に多発性歯牙腫を認めた非症候性患者の1例. 第62回日本口腔外科学会総会, 2017年10月20日(京都).

(2) 石井 滋, 阿部 成宏, 茂呂 歩実, 横溝 尚子, 小林 裕: 下顎智歯の水平傾斜角は抜歯時の下歯槽神経損傷リスクに関係する. 第62回日本口腔外科学会総会 2017年10月20日(京都).

(3) 茂呂 歩実, 阿部 成宏, 石井 滋, 横溝 尚子, 小林 裕: 下顎骨内に分布する神経血管腔の分枝分類 - 口腔外科手術の出血リスク回避のために . 第62回日本口腔外科学会総会 2017年10月20日(京都).

(4) 阿部 成宏: ヒト口腔粘膜間質由来幹細胞の再生医療への応用の可能性. 第59回歯科基礎医学会, アップデートシンポジウム7, 2017年9月16日(松本).

〔図書〕(計1件)

(1) クイズで学ぶ口腔疾患 123, 阿部 成宏, 横溝 尚子, 小林 裕: (担当: 分担執筆, 範囲: 咬合・顎関節の異常 Q.090 開咬と咀嚼障害), デンタルダイヤモンド社 2019年3月 .

〔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:  
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:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。