

令和元年5月10日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20628

研究課題名(和文) 乳歯歯髄由来幹細胞による未分化維持機構の同定

研究課題名(英文) Identification of undifferentiated maintenance mechanism by dental pulp-derived stem cells

研究代表者

福島 久夢 (FUKUSHIMA, Kumu)

北海道大学・歯学研究院・専門研究員

研究者番号：10632408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：顎骨部の再建において、幹細胞による再生医療が主体となることが期待されている。現状の再生医療技術において、皮質骨のような単一の骨質の再生に関しては臨床応用可能なレベルまで達しているが、顎骨再建術に見られるような広範にわたる骨組織を再生させるためには、解決しなければならない課題が存在している。その一つとして、骨髄機能を伴った骨組織の再現が必要なことが挙げられる。本研究は、骨髄を含む骨組織の構築に必要な要件に関して、幹細胞同士の相互的な分化転換という観点から明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎裂部の骨再建には比較的広い範囲の骨組織を再建する必要があるため、現在、自家骨を用いた骨移植術が行われている。自家骨移植には、自家骨採取のための侵襲手術が必要であり、症例によっては十分な骨量の確保が困難な場合や、移植した自家骨が後に吸収を起こしてしまい再手術が必要な場合も見受けられる。幹細胞から正常な骨組織の再生が可能となれば、自家骨の採取の必要がなくなり、患者にかかる負荷が軽減されることから、幹細胞による骨組織再建法を確立することは重要な意味を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the reconstruction of the jawbone, it is expected that regenerative medicine with stem cells will be the main component. In the current state of regenerative medicine, the regeneration of single bones such as cortical bone has reached the level of clinical application. However, there are problems that must be solved in order to regenerate a wide range of bone tissue as found in jawbone reconstruction. One of them is that it is necessary to reproduce bone tissue with bone marrow function. This study clarified the requirements necessary for construction of bone tissue including bone marrow from the viewpoint of mutual transdifferentiation between stem cells.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯学 乳歯歯髄幹細胞

1. 研究開始当初の背景

日本人に多くみられる代表的な先天奇形である口蓋裂は、胎生期の組織欠損または癒合不全により生じる病態であり、歯列不正・構音および発音障害・摂食障害など多くの障害を引き起こす。そのため、顎裂部の骨組織再建は、単に裂隙の形態的閉鎖にとどまらず、歯槽堤の形成にともなう後継永久歯の萌出スペースの確保、顔面形態の改善など良好な口腔機能の達成には必要不可欠な治療である。現在、自家骨移植による骨再建が行われているが、患者自身の腸骨あるいはオトガイ部から移植骨を採取のための侵襲性の大きい手術が必要である。

iPS細胞に代表されるように、幹細胞は人体内の様々な組織に分化可能であり、幹細胞を用いた再生医療は今後の医療として注目されており、骨再生法においても、幹細胞による再生医療は有用な方法といえる。口腔領域に存在している乳歯歯髄由来幹細胞は、抜去した乳歯より採取することが可能な間葉系幹細胞であり、骨髄由来間葉系幹細胞などと比較しても、骨芽細胞への高い分化能を有している。そのため、口蓋裂における顎裂部の骨再生法においても、乳歯歯髄由来幹細胞は、細胞ソースとして有用である。

乳歯歯髄由来幹細胞を用いて顎裂部を再生する場合、広範囲の骨を再生する必要があり、そのためには大量の幹細胞の移植が必要となる。一般に生体内に存在している幹細胞数はごく少量であり、生体内から十分量の幹細胞を得ることは極めて困難である。実際には、限られた資源から幹細胞を同定し、生体外で効率よく幹細胞数を増やす必要があるが、長期間にわたり幹細胞を培養すると、幹細胞の特徴である自己複製能力が著しく低下すると共に、幹細胞としての多分化能が失われることが知られている。幹細胞を用いた再生医療を実現するためには、幹細胞を未分化の状態で保持し培養することが非常に重要となる。生体内においては、幹細胞を未分化な状態で維持する微小環境が存在していることが判明している。また、骨髄内の骨髄由来間葉系幹細胞は、支持細胞と接着しカドヘリンを介したWntシグナルによって微小環境が維持されていることが報告されている。

2. 研究の目的

乳歯歯髄由来幹細胞を用いて広範囲に亘る顎骨組織を再生するためには、未分化状態を維持した乳歯歯髄由来幹細胞を生体外で拡大培養することが必要である。そこで本研究の目的は、乳歯歯髄由来幹細胞を用いた再生医療の実現するための基礎研究として、培養条件における乳歯歯髄由来幹細胞の未分化維持機構において Wnt/ -カテニンシグナルがどのような役割を果たしているか明らかにすることである。

3. 研究の方法

交換期のため脱落した乳歯から歯髄組織を分離し酵素処理によって初代乳歯歯髄由来幹細胞を単離した。単離した初代乳歯歯髄由来幹細胞に対して継代培養を行い、継代ごとに（継代初期 5-10代:5th、継代後期 25-30代:25th）乳歯歯髄由来幹細胞の分化能について以下の項目で比較検討を行った。

(1) *in vitro*の実験

- ・細胞増殖 assay
- ・BrdU assay
- ・幹細胞マーカーの FACS analysis (Oct4, STR01, SSEA4, CD44, CD45, Scar1, C-kit)
- ・ALP 染色
- ・アリザリンレッド染色
- ・RT-リアルタイム PCR 解析 (Runx2, Osterix, Msx2, Dlx5, Twist, AP-1)

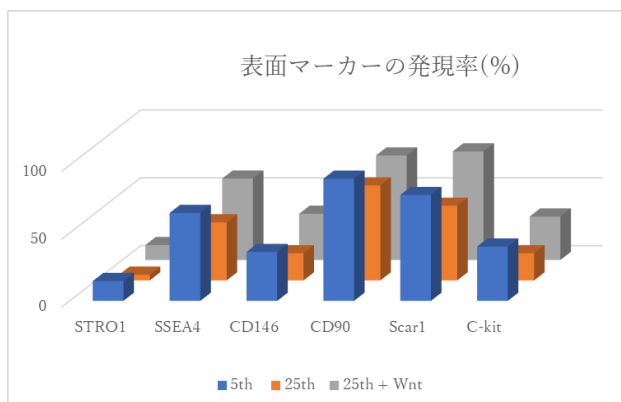
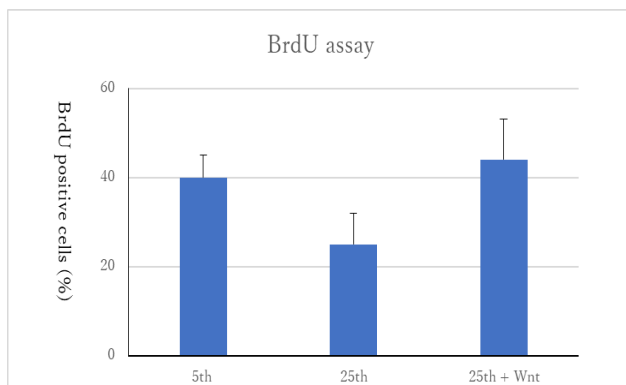
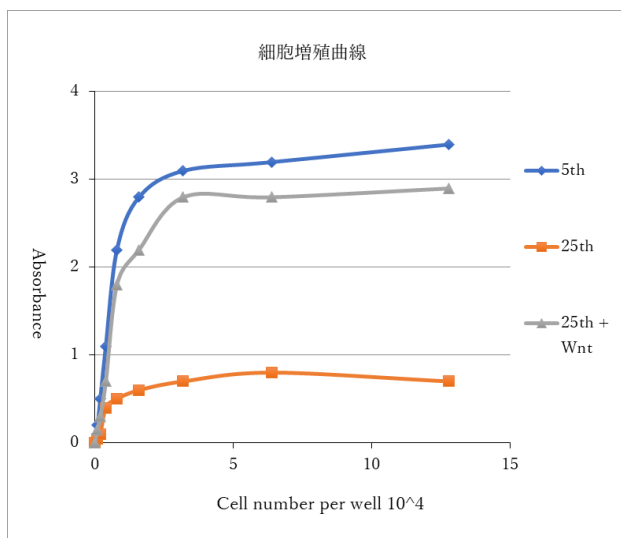
(2) *in vivo*の実験

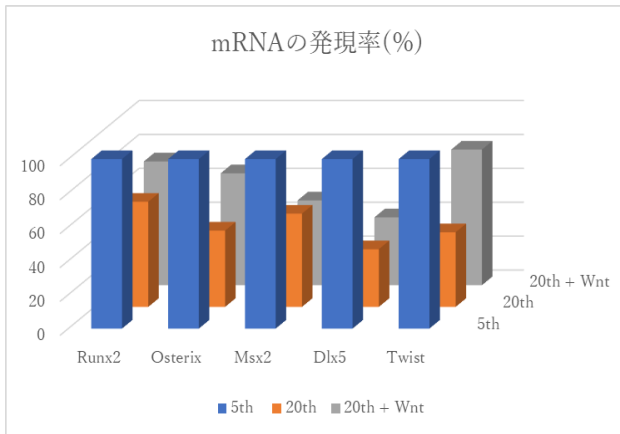
免疫不全マウスの頭蓋部の表皮を切開、前頭骨部に歯科用ドリルを用いて円形の骨欠損を作成した。骨欠損部に乳歯歯髄由来幹細胞を移植する。移植 8 週後に移植体とその周囲組織について評価した。

4. 研究成果

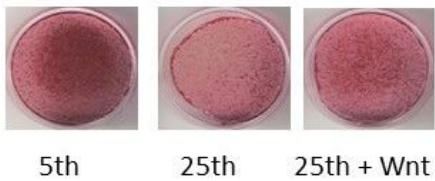
本研究において、培養系における乳歯歯髄幹細胞の継代は、継代を重ねるごとに、継代を重ねるたびに間葉系幹細胞の細胞表面マーカーである Oct4、STR01、SSEA4、CD44、CD45、Scar1、C-kit の発現と、骨芽細胞の分化マーカーとされる Runx2、Osterix、Msx2、Dlx5、Twist、AP-1 の発現の低下を引き起こしていた。間葉系幹細胞から骨芽細胞および骨細胞への分化において、Wnt/ -カテニンシグナル伝達経路の活性化は極めて重要であることが報告されている。そこで、継代による Wnt/ -カテニンシグナル伝達経路の変化について検索した。その結果、継代を重

ねるごとに Wnt/ -カテニンシグナルが減衰していることが判明した。そこで、継代を重ねた乳歯髄幹細胞に対して recombinant の Wnt solution を添加したところ (25th + Wnt)、継代に伴う細胞表面マーカーの発現および骨芽細胞への分化能の低下は軽減されることが判明した。また、継代を重ねた乳歯髄幹細胞に対して造血幹細胞との共存培養を行うことで、継代に伴う細胞表面マーカーの発現の低下は軽減されることが判明した。造血幹細胞の condition medium を用いた条件下では、乳歯髄幹細胞における Wnt/ -カテニンシグナル伝達経路の活性化は低下したままであったため、乳歯髄幹細胞と造血幹細胞との cell to cell の直接接触が、乳歯髄幹細胞における可塑性の回復には重要であることが判明した。さらに、乳歯髄幹細胞と造血幹細胞間の細胞接着に関与している受容体について検索し中和抗体によって受容体をブロックしたところ、乳歯髄幹細胞における可塑性の回復は確認されなかった。以上の知見から、乳歯髄幹細胞と造血幹細胞間の細胞接着は、Wnt/ -カテニンシグナルを介して乳歯髄幹細胞の可塑性を維持している可能性が示唆された。

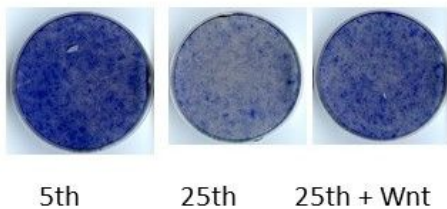




Alizarin red S staining



ALP staining



マウスを用いた *in vivo* での骨組織分化誘導実験においても、継代を重ねた乳歯歯髄幹細胞によって再生された骨量は、継代を重ねていない乳歯歯髄幹細胞によって再生された骨量と比較が少ないことが判明した。また、継代を重ねた乳歯歯髄幹細胞に造血幹細胞を作用させることで骨組織の再生量が増加していることから、*in vivo* の条件においもて造血幹細胞を介した Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路は、乳歯歯髄幹細胞における可塑性に関与していることが示唆されていた。

5. 主な発表論文等

〔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)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

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。