

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11857

研究課題名(和文) 歯嚢由来細胞の神経系細胞分化機序と神経再生への有効性の検討

研究課題名(英文) Capacity of human dental follicle cells to differentiate into neural cells and to regenerate of neuron

研究代表者

小倉 直美 (OGURA, Naomi)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：10152448

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)：神経は再生能力が低いことから、移植再生医療が検討されている。歯嚢は、歯科治療過程で破棄される組織で、組織幹細胞が存在することから、歯嚢由来細胞(歯嚢細胞)の神経再生医療応用への可能性を検討した。歯嚢細胞は神経幹細胞マーカーを発現し、神経細胞への分化誘導を行うと神経細胞様細胞が出現し、神経前駆細胞や神経系細胞のマーカー遺伝子の発現は上昇した。コロニー形成後に分化誘導を行う2ステップ法は、神経系細胞への分化を促進した。また、歯嚢に付随して得られる退縮エナメル上皮には、未分化間葉系幹細胞マーカーを発現している細胞が多く存在した。歯嚢は、神経組織の再生医療応用の細胞源となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経組織は再生能力が低く、神経幹細胞(神経系細胞へ分化する細胞)を移植する再生治療が注目されている。しかし、人から神経幹細胞を得ることは難しい。そこで、神経系細胞へと分化可能な細胞を採取できる細胞源が検討されている。歯科治療過程で破棄される歯嚢から、神経再生医療用の細胞が得られれば、有意義である。本申請では、歯嚢から分離した細胞(歯嚢細胞)には、神経系細胞へ分化可能な細胞が含まれている可能性が示された。歯嚢細胞は、神経再生医療応用のみならず、神経系細胞への分化機序などの基礎研究にも有用であると示唆される。本研究は、将来の神経組織再生医療に役立つものとする。

研究成果の概要(英文)： Neurodegenerative disorders are characterized by the loss or atrophy of neurons, leading to functional impairment. The neural function can be restored by replacing lost cells with stem cells that can mature into neural cells. The dental follicle contains stem cells and/or progenitor cells, can be easily obtained during the extraction of impacted teeth. Dental follicle cells (DFC) have the capacity to commit to differentiation into multiple cell lineages. We investigated the capacity of DFC to differentiate into neural cells. Undifferentiated DFC were positive for neural markers. The number of cells with neuronal-like morphology and gene expression of neural markers were increased during neural differentiation. The positive of pluripotent stem cells are observed in reduced enamel epithelium accompanied the inner layer of dental follicle. In conclusion, hDFCs may be another optimal source of neural/glial cells for cell-based therapies to treat neurological diseases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯嚢由来細胞 神経系細胞 神経系細胞マーカー 細胞分化機序 遺伝子発現 神経再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト成人にも中枢神経組織に神経幹細胞が存在することが報告された。神経組織は再生能力が低いことから、内在性神経幹細胞の活性化による神経再生や、神経幹細胞の損傷部位への細胞移植治療が注目されている。一方、歯嚢は埋伏歯を抜歯する際に抜去歯と共に破棄される組織で、組織幹細胞が存在すること、歯嚢由来細胞（歯嚢細胞）は、骨芽細胞や脂肪細胞等へと分化することが報告された。我々は、歯嚢細胞のトランスクリプトーム解析やプロテオミクス解析を行うことによって、歯嚢細胞の未分化間葉系幹細胞としての性質や、歯嚢細胞の骨芽細胞への分化関連因子の検索を行ってきた。歯嚢は神経堤由来の組織であることから、歯嚢細胞は神経再生医療に有用ではないかと考えた。そこで、歯嚢細胞を神経系細胞への分化機序を検索するとともに、歯嚢細胞の神経再生促進能力を調べることにした。

2. 研究の目的

歯嚢から分離した歯嚢細胞が神経系細胞へと分化するのかを検討する。また、歯嚢細胞が神経系細胞への分化能を有していた場合、分化関連因子の検討を行う。さらに、歯嚢の組織学的検討を行い、神経系細胞へと分化する細胞の局在を調べることによって、神経細胞へ分化可能細胞を効率よく分離する方法を検討する。

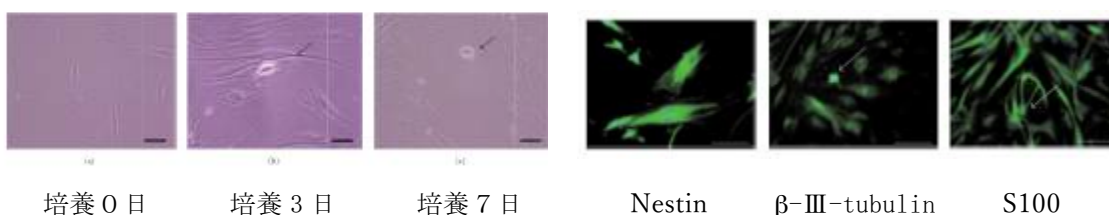
3. 研究の方法

- (1) 埋伏歯の抜歯の際に歯嚢を採取する。
- (2) 歯嚢を collagenase/dispase 処理し、滑膜細胞を分離、初代培養および継代培養を行う。
- (3) 歯嚢細胞を fibronectin coating plate に播種し、間葉系幹細胞神経細胞誘導培地で培養、免疫染色法を用いて、Nestin、 β III-tubulin 等神経系細胞マーカー発現を調べる。
- (4) 歯嚢細胞を無血 DMEM にサプリメント B-27, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor を加えた培養液で培養し、neurosphere コロニーを形成させる。
- (5) Neurosphere を fibronectin coating plate に播種し、間葉系幹細胞神経細胞誘導培地で培養を行い、免疫染色法を用いて Nestin、 β III-tubulin 等神経系細胞マーカー発現を調べる。
- (6) 歯嚢細胞を神経系細胞へ分化誘導する過程で、RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出する。
- (7) Real-time PCR 法で遺伝子発現を測定する。
- (8) 歯嚢を 10%中性緩衝ホルマリン水溶液で浸漬固定後、通法に従いパラフィン包埋ブロックを作製し、4 μ m 厚薄切片を作製する。
- (9) 切片は通法に従い、ヘマトキシリン-エオジン重染色を行う。
- (10) 一次抗体には、組織幹細胞に関連するマーカーに反応する抗体を使用し、通法に従い免疫細胞化学的染色および免疫組織化学染色を行う。

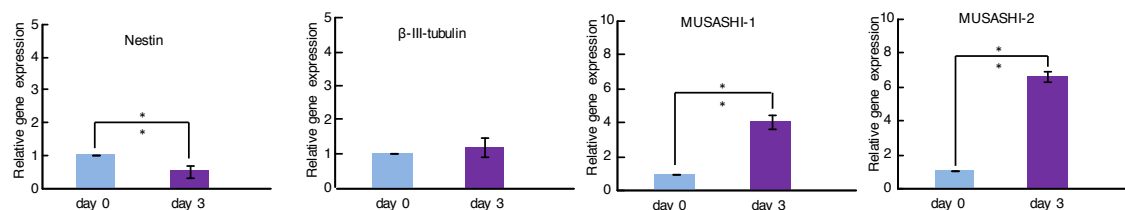
4. 研究成果

(1) 歯嚢細胞の神経系細胞への分化誘導

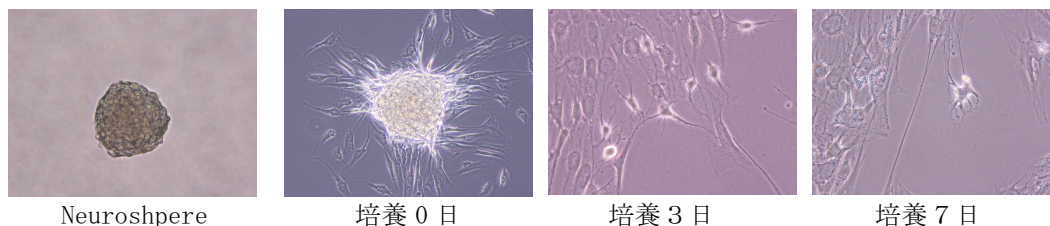
歯嚢細胞を 1 step 法で神経細胞誘導培地で培養を行ったところ、神経細胞誘導培地で培養 3 日目から神経細胞様の形態を示す細胞が認められた。また、歯嚢細胞は、神経幹細胞マーカーのネスチンや神経細胞マーカーの β -III-チューブリンおよび S100 タンパク質を発現していることが認められた。



神経細胞誘導培地で培養 3 日目では、神経幹細胞マーカーの Nestein 遺伝子発現は減少し、神経前駆細胞マーカーの Musashi-1、-2 遺伝子発現は上昇した。成熟神経細胞マーカーの β -III-tubulin の遺伝子は、発現変動は認められなかった。

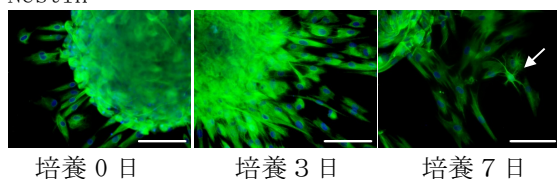


次に、歯嚢細胞を神経系細胞へ2 step 法で誘導を行った。Neuroshpere 形成後、神経細胞誘導培地で培養を行うと、Neuroshpere 形成させない時に比べ神経細胞様細胞が多く認められた。



Neuroshpere 形成後に Nestin、 β -III-tubulin、S100 の免疫染色を行った。
 Nestin: sphere 全体が Nestin 陽性を示し、Sphere から hDFC が広がっていた(培養0日)。培養7日では、細胞体から突起を伸ばす神経細胞様細胞は Nestin 陽性であった。
 β -III-tubulin: 培養3日では、神経細胞誘導時に見られた神経細胞様細胞は β -III-tubulin 陽性、培養7日では、突起の数を増えた神経細胞様細胞は β -III-tubulin 強陽性のものであった。
 S100: 培養3日では、神経細胞様細胞は S-100 β 強陽性であった。培養7日には、S-100 β 強陽性神経細胞様細胞は、さらに突起を伸ばした。

Nestin

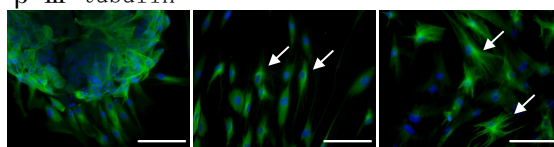


培養0日

培養3日

培養7日

β -III-tubulin

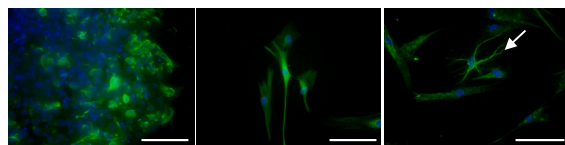


培養0日

培養3日

培養7日

S100

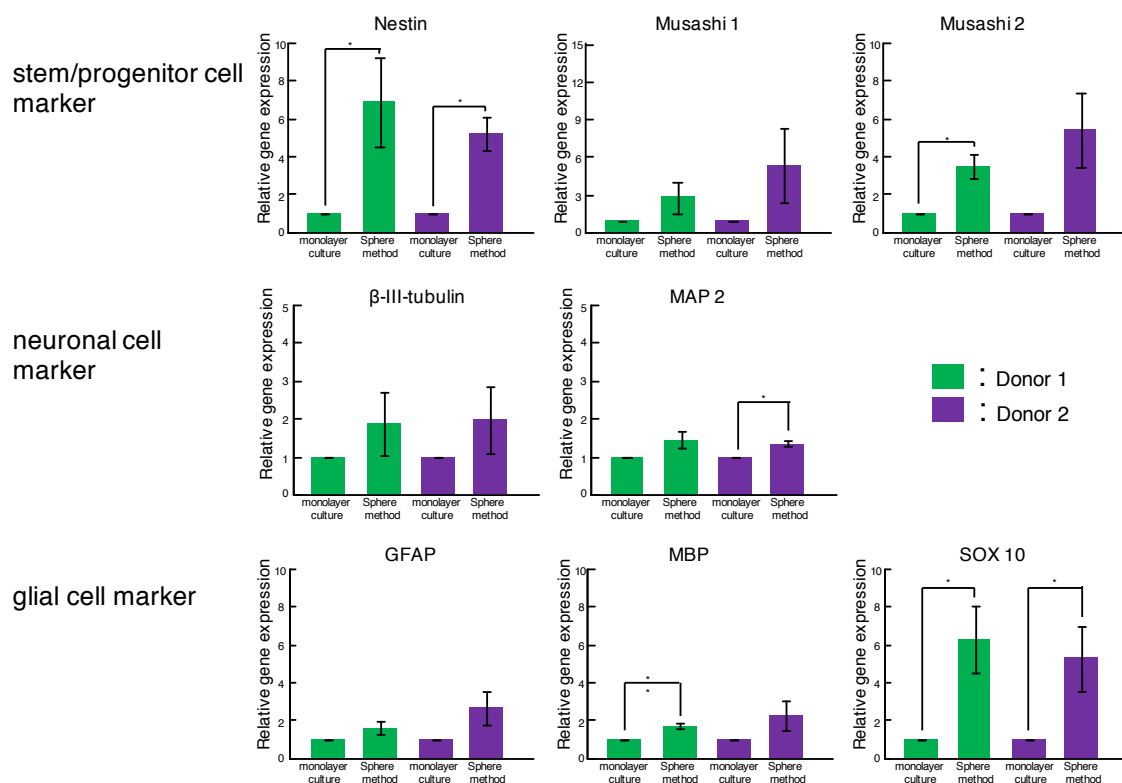


培養0日

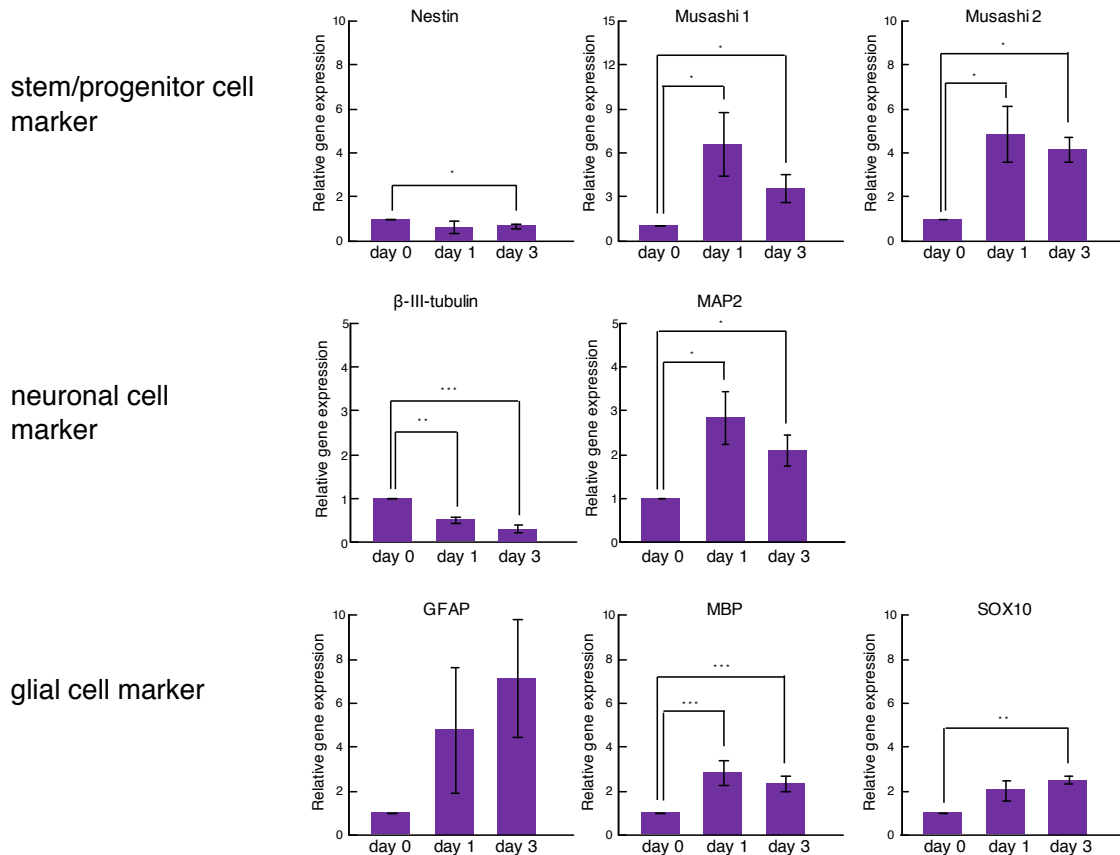
培養3日

培養7日

2名の患者から得られた2株の歯嚢細胞を神経系細胞へ誘導した場合、1 step 法と2 step 法間での比較検討を行った。その結果、2 step 法を用いたほうが、神経系細胞マーカーの遺伝子発現上昇が高かった。



歯嚢細胞を 2 step 法で神経系細胞へ誘導し、神経系細胞マーカーの遺伝子発現を測定した。Nestin 遺伝子発現は、経時的に減少した。Musashi は、培養 0 に比べ 1 日で発現上昇し、3 日で発現減少傾向を示した。グリア細胞マーカーの GFAP の発現は分化誘導によ経時的に上昇傾向を示し、MBP および SOX10 は培養 0 日に比べ 3 日で遺伝子発現上昇した。

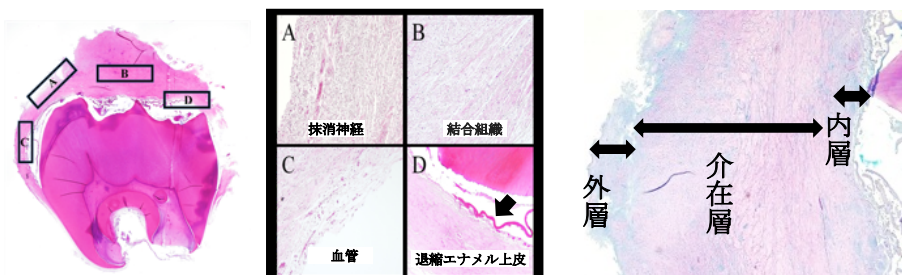


神経系細胞への分化誘導を行っていない培養ヒト歯嚢細胞でも、神経系細胞に関連するマーカー遺伝子は発現していた。Neurosphere 形成法を用いて培養することで、神経細胞様細胞の数および神経系細胞に関連する遺伝子マーカーの発現量が増加し、神経細胞への分化誘導により、神経系細胞に関するマーカー遺伝子の発現が上昇した。以上の結果から、ヒト歯嚢由来細胞は、神経系細胞へ分化する能力を持つ可能性が示唆された

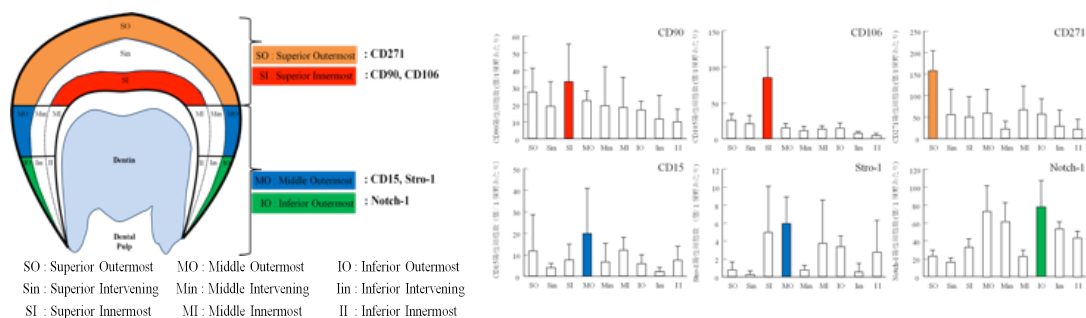
(2) 歯嚢の組織学的検討

歯嚢細胞に存在している神経系細胞への分化能を有する細胞を効率よく分離することを目的として、歯嚢の組織学的検討を行った。

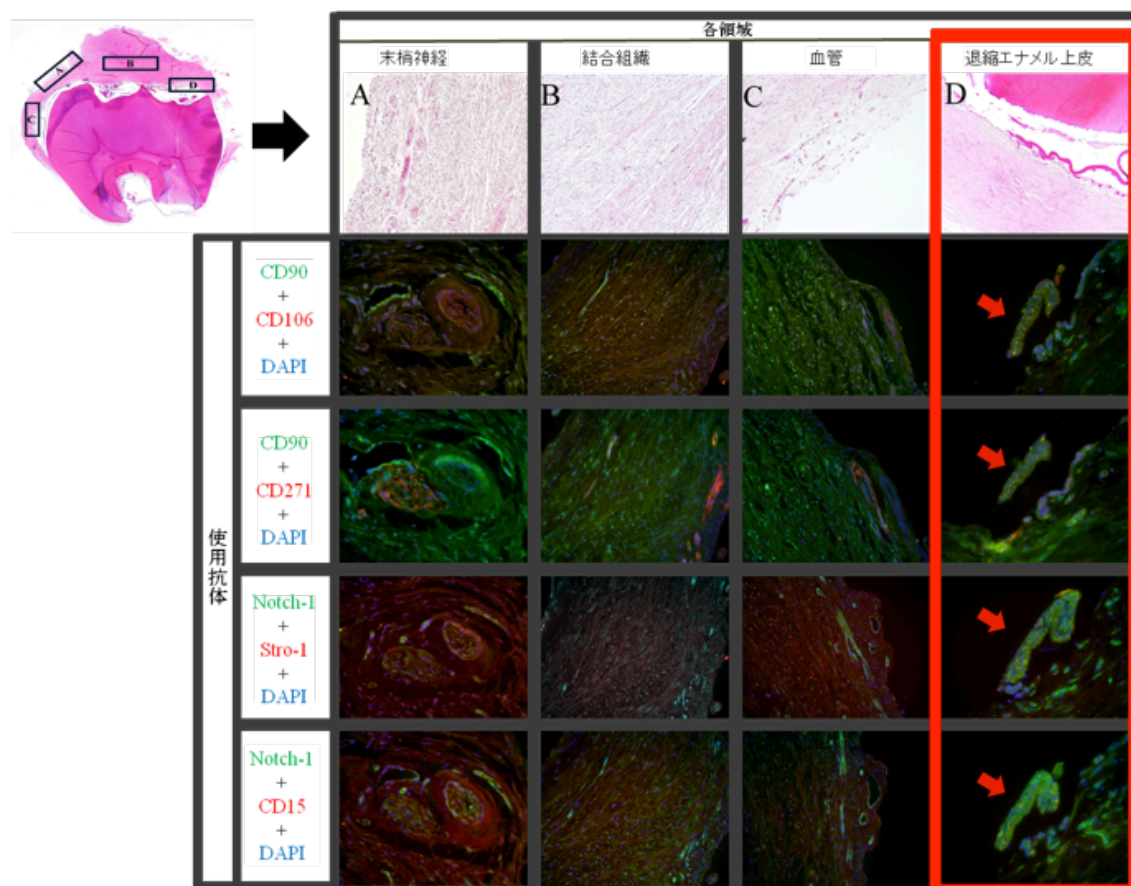
歯牙が付着した状態の歯嚢組織の H-E 染色および歯嚢組織の PAS アルシアンブルー重染色を行った。歯嚢は三層構造を呈しており、外層は疎性線維性結合組織で、線維芽細胞様細胞が認められる。また、末梢神経も認められた (A)。内層では、比較的高密度な毛細血管、歯原性上皮島、紡錘形もしくは楕円形の核を有する細胞が観察され (C)、歯冠との隣接面には菲薄な一層ないし二層の一部の退縮エナメル上皮が認められた (D)。外層と内層の間 (介在層) は高密度の線維芽細胞様細胞を伴う緻密性線維性結合組織で構成され、ヘマトキシリンに淡染していた (B)。更に、介在層にみられたヘマトキシリンに淡染した領域に一致して、PAS 反応にて陽性所見が認められた。外層及び内層は PAS 反応陰性であった。



次に、歯嚢組織における未分化な幹細胞マーカー陽性細胞の局在を検討した。CD271 陽性細胞は、歯冠部外層 (SO) に多く認められた。CD90、CD106 陽性細胞は、歯冠部内層 (SI) に多く認められた。CD15、Stro-1 陽性細胞は、歯頸部中段の外層 (MO) に多く認められた。Notch-1 陽性細胞は、歯頸部下段の外層 (IO) に多く認められた。



多分化能を有し、増殖能に優れている間葉系幹細胞は、間葉系幹細胞のマーカーである CD90、CD106 および CD271 を共発現していると報告されている。CD90 および CD106、または、CD90 および CD271 の二重陽性細胞は、毛細血管および退縮エナメル上皮において観察された。CD15、Stro-1 および Notch-1 は多能性幹細胞のマーカーとして知られている。Notch-1 と Stro-1、または、Notch-1 と CD15 の二重陽性細胞は、退縮エナメル上皮において観察された。



歯嚢組織は三層構造であり、幹細胞マーカーを発現する細胞は歯嚢外層に多く認められた。また、複数の幹細胞マーカーを共発現している細胞が歯嚢組織全域に認められ、特に退縮エナメル上皮には多くの陽性細胞が認められた。歯嚢組織から再生医療用細胞を有効に採取できる可能性を検討することを目的に、歯嚢組織における体性幹細胞の局在を検討したところ、歯嚢に付随して採取される退縮エナメル上皮が有用な再生医療用の細胞源である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yugo Kato, Masaaki Suemitsu, Kosuke Takahashi	4. 巻 18
2. 論文標題 Histological Study and Localization of Stem/ Progenitor Cells in Human Dental Follicle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 213-219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5466/ijoms.18.227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ko Ito, Risa Tomoki, Naomi Ogura, Kosuke Takahashi, Takashi Eda, Fumie Yamazaki, Yugo Kato, Alastair Goss, Toshiro Kondoh	4. 巻 15
2. 論文標題 MicroRNA-204 regulates osteogenic induction in dental follicle cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hidesuke Yoshimoto, Naomi Ogura	4. 巻 16
2. 論文標題 Effect of prostaglandin E2 on human dental follicle cells during osteogenic differentiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oral-Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 39-48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5466/ijoms.16.39	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤有悟、小倉直美、末光正昌、枝 卓志、金尾真吾、高橋康輔、青木暁宣、久山佳代、近藤壽郎
2. 発表標題 ヒト歯嚢における体性幹細胞マーカー陽性細胞の局在について
3. 学会等名 第64回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤有悟、小倉直美、末光正昌、枝 卓志、金尾真吾、高橋康輔、青木暁宣、伊藤 耕、久山佳代、近藤壽郎
2. 発表標題 歯嚢組織における体性幹細胞の局在性についての検討
3. 学会等名 第73回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 有悟、小倉 直美、末光 正昌、枝 卓志、金尾 真吾、高橋 康輔、青木 暁宣、伊藤 耕、久山 佳代、近藤 壽郎
2. 発表標題 歯嚢組織における体性幹細胞の局在性についての検討
3. 学会等名 第73回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤有吾、小倉直美、枝 卓志、金尾慎吾、高橋康輔、青木暁宣、伊藤 耕、末光正昌、久山佳代、近藤壽郎
2. 発表標題 ヒト歯嚢における神経系細胞の局在および歯嚢由来細胞の神経系細胞への分化誘導
3. 学会等名 第63回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤勇吾、末光正昌、小倉直美、枝 卓志、金尾慎吾、吉本秀輔、高橋康輔、青木暁宣、伊藤 耕、久山佳代、近藤壽郎
2. 発表標題 ヒト歯嚢組織の組織学的特徴およびNotch-1陽性細胞の分布における検討
3. 学会等名 第72回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	伊藤 耕 (ITO Ko) (20419758)	日本大学・松戸歯学部・講師 (32665)	
研究 分担者	高橋 康輔 (TAKAHASHI Kosuke) (30705687)	日本大学・松戸歯学部・講師 (32665)	
研究 協力者	加藤 有悟 (KATO Yugo)		