

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390518

研究課題名(和文) 骨髄間質由来成体幹細胞の歯原性細胞への分化誘導と
歯の再生医療への応用研究課題名(英文) Induced Odontogenic Differentiation of Bone Marrow Stroma-derived
Stem Cells and Their Possibility for Teeth Regeneration

研究代表者 里村 一人(KAZUHITO SATOMURA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：80243715

研究成果の概要：マウス由来骨髄間質細胞(MMSC-3)は遺伝子操作を行うことなくその培養条件を変更することにより、*in vitro*において中胚葉系機能細胞(骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞)、外胚葉系機能細胞(神経細胞)、内胚葉系機能細胞(肝細胞)への分化能を示し、マウス骨髄由来成体幹細胞であることが示唆された。同細胞を用いて、歯への分化誘導を行ったところ、*in vitro*および*in vivo*において歯に関連する遺伝子ならびにタンパク質発現を示し、歯の再生医療を実現する細胞源として利用できることが考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,350,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学(歯学)

科研費の分科・細目：外科系歯学・口腔外科学一般、再生医学

キーワード：マウス骨髄由来成体幹細胞、分化誘導、歯原性間葉細胞、歯の細胞

1. 研究開始当初の背景

未曾有の高齢化社会を迎えたわが国において歯の喪失は高齢者の約8割にみられ、その大部分が義歯やインプラントなどの人工物による機能補填により治療されているのが現状である。このことから、人類の福祉とQuality of Lifeのさらなる向上を図る上で歯の再生医療実現の意義は大きい。歯を含む種々の臓器や組織の再生を目指す上で重要なことは、安定した幹細胞の供給源を確保するとともに、それを安定に増殖させ、かつ適切に分化させることである。この際患者自身の体細胞を用いることができれば、胚性幹細胞

胞を用いる場合に伴うような倫理的問題や生物学的制約のない理想的な治療法となることが予測される。このような観点から、われわれはヒト歯胚より歯乳頭細胞、歯小囊細胞を分離し、それらが*in vitro*で象牙芽細胞、セメント芽細胞等に分化すること、さらには歯乳頭細胞の移植により象牙質が形成されることを確かめ、これらの細胞が歯原性細胞の増殖・分化機構の解明や歯の再生を目指す上できわめて有用であることを確認してきた。一方、骨髄間質細胞は最近、中胚葉系の骨芽細胞や筋細胞のみならず神経細胞や肝細胞にも分化し得ることが示され、間葉

系幹細胞というよりはむしろ全能性体性幹細胞と呼ぶべき細胞を含んでいることが明らかになりつつあり、歯の再生にとっても幹細胞のきわめて有力な供給源となり得ると考えられる。

われわれは、すでにマウス骨髄間質細胞株を樹立し、三胚葉へ分化し得ることを確かめている。今後、その詳細なメカニズムを解明するとともに、歯の再生医療の細胞源として利用できる可能性を検討する。

2. 研究の目的

歯原性細胞の増殖・分化機構、歯原性上皮-間葉間相互作用につきさらに解明を進めるとともに、その研究過程で得られる種々の情報に基づき、骨髄間質由来成体幹細胞株および末梢血由来線維芽細胞の歯原性細胞への分化誘導を試みる。さらに種々の細胞外マトリックスや細胞増殖因子等を用いた安定した分化制御法の確立を目指すことにより、骨髄間質由来成体幹細胞および末梢血由来線維芽細胞の歯の再生医療への利用の可能性につき検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

細胞は、われわれの教室で樹立し、継代培養をおこなっているマウス由来骨髄幹細胞株(以下MMSC-3)である。

(2) 細胞増殖能の検討

MMSC-3の細胞増殖能の検討はクリスタルバイオレット染色法により行った。

(3) 間葉系細胞であることの確認

MMSC-3の性質を把握するため、間葉系幹細胞に発現することが確認されている分子(CD34, c-kit, Sca-1)のmRNAの発現を確認した。また間葉系細胞で発現するvimentinの発現についても確認した。

(4) MMSC-3における多分化能の検討

①骨芽細胞への分化

10mM β -glycerophosphate を添加した培地にて4週間培養した。

②軟骨細胞への分化

10ng/ml TGF- β , 10 nM dexamethasone, を含む培地にて、33°C下にペレットカルチャーを行った。

③脂肪細胞への分化

0.5 mM isobutyl-methylxanthine, 10 μ M insulin, 60 μ M indomethacin, 1 μ M dexamethasone を含む培地にて3日間培養した。

④神経細胞への分化

Fibroblast growth factor(FGF), Epidermal growth factor(EGF), Neural Cell survival factor(NSF-1)を含む培地にて7日間培養した。

⑤肝細胞への分化

10ng/ml Hepatocyte Growth Factor, 20ng/mlFGF-4 を含む肝細胞分化誘導培地にて7日間培養した。

(5) MMSC-3の歯原性間葉細胞への分化誘導 (HAT-7を用いた細胞性分化誘導)

MMSC-3をラット由来歯原性細胞株(HAT-7)と共培養した。

(6) MMSC-3の歯原性間葉細胞への非細胞性分化誘導

MMSC-3をマトリゲルおよびEMD処理下に培養した。

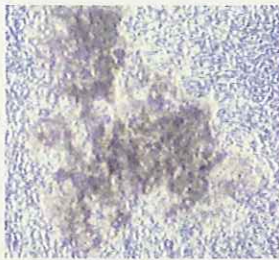
(7) 歯原性間葉細胞への分化誘導を行ったMMSC-3の歯髄腔内移植

MMSC-3をマトリゲルおよびEMD処理下に分化誘導後、ラット上顎白歯髄腔へ移植し2週間後に、周辺の組織とともにとりだし、その検索を行った。

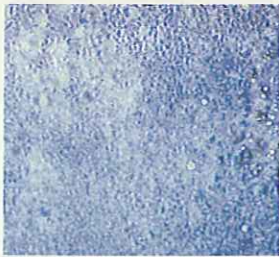
4. 研究成果

(1) マウス骨髄間質細胞株(MMSC-3)は増殖期において繊維芽細胞様の形態を示し、population doubling time は約 24 時間で、50 代以上にわたり継代可能であった。また、間葉系細胞のマーカである vimentin および未分化間葉系細胞のマーカである CD34, c-kit および Sca-1 の mRNA 発現を示した。

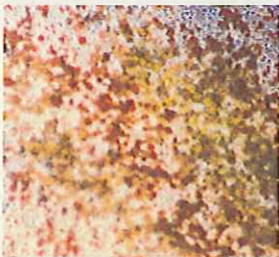
(2) MMSC-3 は、遺伝子操作を行うことなくその培養条件のみを変更することにより、in vitro において中胚葉系機能細胞 (骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞)、外胚葉性機能細胞 (神経細胞)、内胚葉系機能細胞 (肝細胞) への分化能を示し、マウス骨髄由来成体幹細胞であることが示唆された。



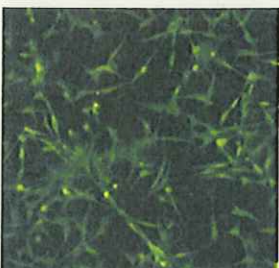
←骨芽細胞



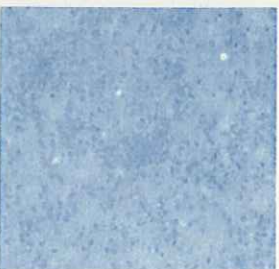
←軟骨細胞



←脂肪細胞



←神経細胞



←肝細胞

(3) MMSC-3 は、ラット由来歯原性上皮細胞(HAT-7)との共培養により、in vitro において3次元的な細胞増殖を示し、DSPP を遺伝子レベル、タンパク質レベルで発現した。

(4) HAT-7 との共培養により、MMSC-3 は歯の発生過程で発現する転写因子 Msx1、Pax9 の mRNA 発現を示した。また Msx1 の発現は EMD またはマトリゲルにより促進され、EMD およびマトリゲルの併用によって、よりさらに増強される傾向がみられた。

(5) HAT-7 の非存在下においても、MMSC-3 は EMD またはマトリゲルの存在下に DSPP および Msx1 の mRNA を発現し、それらの発現は EMD およびマトリゲルの併用により促進された。Pax9 の発現は誘導されなかった。

(6) MMSC-3 は HAT-7 の有無に関わらず、EMD の存在下のみで Lhx6 を発現した。

(7) HAT-7 の非存在下に EMD およびマトリゲルにより培養を行った MMSC-3 をラット上顎臼歯髄腔へ移植したところ、細胞移植後 2 週間においては明かな硬組織の形成は認められなかったものの、同細胞は生体内においても DSPP のタンパク質発現を維持していることが確認された。



↑生体内に移植した細胞を免疫染色したところ、DSPP の発現が認められた。

以上のことから、MMSC-3 は生体外において中胚葉系機能細胞のみならず、外胚葉、内胚葉系機能細胞への分化能を有する骨髄由来成体幹細胞である可能性が強く示唆された。また、同細胞は歯原性上皮細胞の存在下に、歯原性間葉細胞の表現型をも発現し得ることが明らかとなり、さらにその分化は EMD またはマトリゲルの利用により非細胞性に誘導され得る可能性が示された。

これらにより、骨髄由来制癌幹細胞は歯の再生医療において有用な資源となりうると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Kazuhito Satomura, Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing, J Mater Sci Mater Med, 19, 2949-2952, 2008, 査読有
- ② Kazuhito Satomura, Satoru Tobiume, Reiko Tokuyama, Yasufumi Yamasaki, Keiko Kudoh, Eriko Maeda and Masaru Nagayama, J Pineal Res, 42, 231-239, 2007, 査読有
- ③ Reiko Tokuyama, Kazuhito Satomura, Eriko Maeda, Keiko Kudoh and Masaru Nagayama, Maspin is involved in bone matrix maturation by enhancing the accumulation of latent TGF- β , J Bone Miner Res, 22, 1581-1591, 2007, 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 里村一人、富岡重正、徳山麗子、工藤景子、田岡計久、ダワドルジ プレブスレン、山村佳子、前田恵利子、遺伝子導入を伴わない機能細胞の分化転換と組織再生への応用の可能性、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会合同大会、2008.12.10、神戸
- ② Kazuhito Satomura, Adult Stem Cells as a Resource of Tooth Regeneration, The 8th Asia Congress on Oral and maxillofacial Surgery, 2008.11.5, Bangkok
- ③ 里村一人、前田恵利子、工藤景子、徳山麗子、長山 勝、骨髄由来成体幹細胞の歯原性細胞への分化誘導とその臨床応用への可能性、第62回日本口腔科学会学術大会、2008, 4, 17, 福岡
- ④ 徳山麗子、里村一人、プレブスレングダワドルジ、工藤景子、長山 勝、骨組織成熟過程に関与するマスピンは軟骨組織形成や歯の発生にも影響している、第62回日本口腔科学会学術大会、2008, 4, 17, 福岡
- ⑤ 里村一人、田岡計久、工藤景子、徳山麗子、前田恵利子、山崎泰文、長山 勝、派の発生制御におけるメラトニンの役割、第61回日本口腔科学会学術大会、2007. 4. 19, 神戸

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

里村 一人 (SATOMURA KAZUHITO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：80243715

(2) 研究分担者

長山 勝 (NAGAYAMA MASARU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：30022867

工藤 景子 (KUDOH KEIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：70380029

徳山 麗子 (TOKUYAMA REIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：20380090

湯浅 哲也 (YUASA TETSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：70332822

(3) 連携研究者

該当者なし