

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007 年～2008 年  
 課題番号：19890242  
 研究課題名（和文） 多能性歯髄幹細胞を用いた筋系譜細胞への分化転換に関する基礎的研究  
 研究課題名（英文） Investigation of differentiation into a skeletal muscle cell lineage of dental pulp stem cells.  
 研究代表者  
 中塚 隆介 (Nakatsuka Ryusuke)  
 関西医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：90454561

研究成果の概要：歯髄中の組織幹細胞の特性を明らかにするために、筋分化誘導と歯髄幹細胞の純化を行った。間葉系幹細胞などで報告のある骨格筋分化誘導系のうち、5-aza-2'-deoxycytidine を用いることで、筋管形成と Myosin Heavy Chain の発現が見られた。また、FACS 解析により、間葉系幹細胞マーカーである Sca-1 と PDGFR を共に発現する細胞が歯髄に存在し、脂肪、骨といった多分化能を示すことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：幹細胞生物学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：歯髄細胞、分化可塑性、間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、組織中の体性幹細胞・前駆細胞についての報告が様々な臓器、器官についてなされている。成体組織の一部から単離可能なこれらの幹細胞は ES 細胞のような倫理的問題や技術的問題が比較的少なく、拒絶反応のない自己臓器移植など再生医療への期待が高いとされているが、体性幹細胞の持つ分化転換能などについては細胞により差があるとされ、十分には解明されていない。歯を構成する組織においても組織幹細胞・前駆細胞の報告がなされており、とりわけ歯髄では歯の摩耗や治療後の歯髄において象牙質の再生

が起こることが知られている。これまでの研究で歯髄細胞は骨や脂肪への分化能や Nestin など初期の神経マーカーの発現が見られることが明らかとなっている。歯髄幹細胞が示すこれらの特性は骨髄間葉系幹細胞に類似していると考えられ、骨髄間葉系幹細胞に報告されている多分化能を歯髄の幹細胞もまた備えていると考えられる。これまで歯髄由来細胞について骨格筋分化の報告はほとんどない一方で骨髄間葉系幹細胞の骨格筋分化能については多くの報告がなされている。本研究ではこのような背景を踏まえ、歯髄に含まれる幹細胞にも筋細胞への分化転換能がある可能性を考え、歯髄細胞の骨格

筋分化を試みるに至った。

## 2. 研究の目的

歯髄細胞が将来的には筋肉や歯、骨、神経などの再生に利用できる多能性組織幹細胞として、再生医療、幹細胞治療へ利用可能な幹細胞ソースであることを示すため、歯髄細胞を用いた筋細胞への分化転換を試みた。また、歯髄幹細胞を効率よく得るために、FACSを用いた幹細胞分離技術によって歯髄幹細胞の分離、同定を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯髄細胞の単離

ラット及びマウス下顎切歯より分離した歯髄をコラゲナーゼ、ディスパーゼによる酵素処理後培養ディッシュ上に播種し、接着する初代培養歯髄細胞を単離する。これらの細胞の形態を顕微鏡下で観察した。

### (2) 分化誘導培地による細胞分化の評価

単離された歯髄細胞について、低・無血清培地あるいは5-aza-2'-deoxycytidineを用いたDNAの脱メチル化による筋分化促進を試みた。

### (3) 歯髄幹細胞の MyoD-1 強制発現による筋分化誘導とその評価

真核細胞で MyoD-1 を発現するコンストラクトを作成、細胞に導入し筋分化能を示すかを検討した。筋管形成など形態変化の観察と MyoD により誘導される筋管形成にかかわる蛋白の発現を免疫蛍光染色により細胞を染色、蛍光顕微鏡下で観察し、筋分化または筋管形成を評価した。

### (4) FACS による歯髄幹細胞の純化

単離した歯髄細胞から多分化能を有する細胞を間葉系幹細胞特異的な表面抗原を指標とした FACS を用いて歯髄幹細胞を純化し、歯髄幹細胞の分化能について間葉系の分化誘導を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 歯髄細胞の *in vitro* 骨格筋分化誘導

#### ① 無血清培養条件による検討

無血清培地による筋分化誘導においては MyoD-1 の発現は分化誘導前に比べ増加傾向にあったが、筋管形成などの形態的变化は確認されなかった。しかしながら BMP 受容体に拮抗的に結合し BMP シグナルを抑制する Noggin を分化誘導培地に添加し同様の分化誘導を行ったところ、通常の筋分化条件より効率良く歯髄細胞を筋系譜細胞へと分化誘導できる傾向にある可能性を見出した。

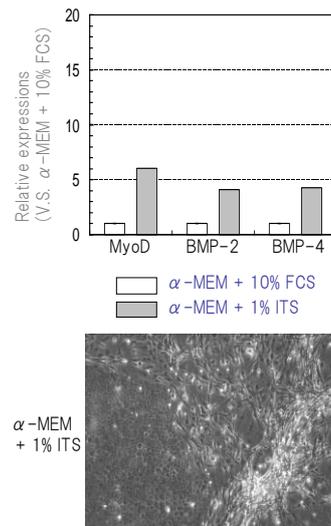


図1 歯髄細胞の筋分化誘導後mRNA発現変動 (Real Time RT-PCR解析) と、位相差顕微鏡像

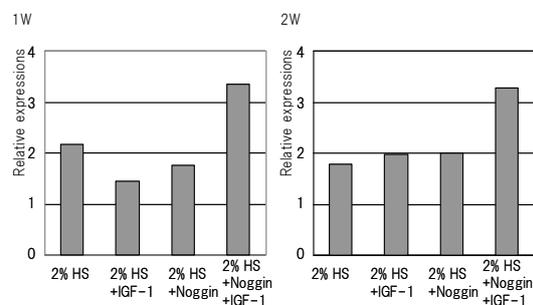


図2 筋分化誘導とNoggin処理による歯髄細胞におけるMyoD mRNA発現変動 (Real Time RT-PCR解析)

#### ② MyoD-1 強制発現による筋分化誘導の検討

MyoD-1 をコードする cDNA を持つ発現コンストラクトを作成し、マウス歯髄細胞へ導入した。この強制発現系においては無血清培地による誘導同様、筋管形成などの形態的变化は見られなかったが、Myogenin の発現誘導が見られた。

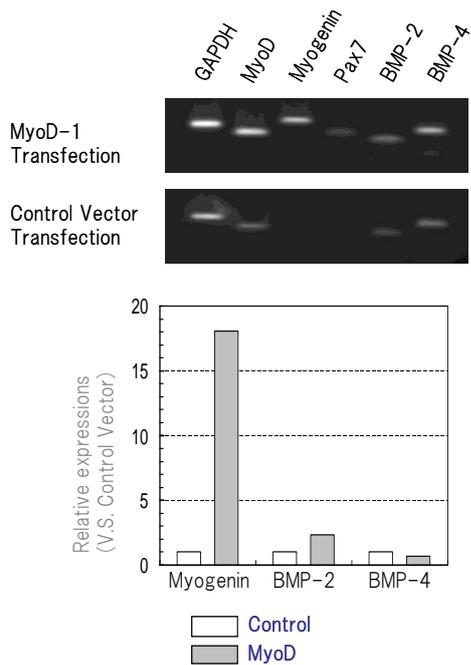


図3 歯髄細胞のMyoD-1強制発現後mRNA発現変動 (RT-PCR, Real Time RT-PCR解析)

### ③脱メチル化促進剤による筋分化誘導

5-aza-2'-deoxycytidine を用い、DNA の脱メチル化による筋分化促進を試みたところ、骨格筋特有の筋管形成と Myosin Heavy Chain の発現が見られた。

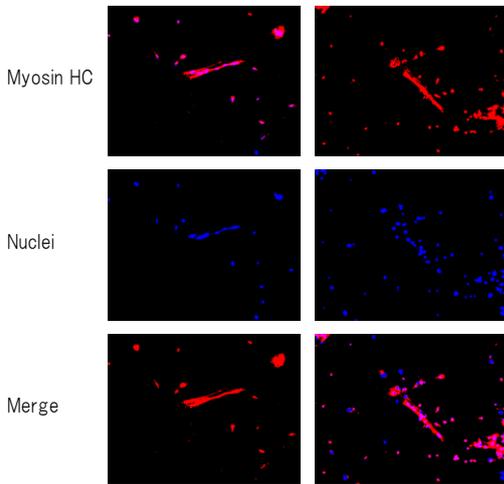


図4 脱メチル化促進剤により筋分化した歯髄細胞の免疫染色

これらの結果から、歯髄細胞からの骨格筋分化にはクロマチン凝集の低下による脱分化の促進と筋特異的遺伝子発現誘導の必要性が示唆された。

### (2) FACS による歯髄幹細胞の純化

マウス切歯の歯髄より採取した細胞における組織幹細胞マーカーの発現を FCM により解析した。その結果間葉系幹細胞マーカーである Sca-1 と PDGFR  $\alpha$  を共に発現する細胞が歯髄に存在し、高い増殖能と脂肪、骨といった間葉系細胞への分化能を示すことが明らかとなった。

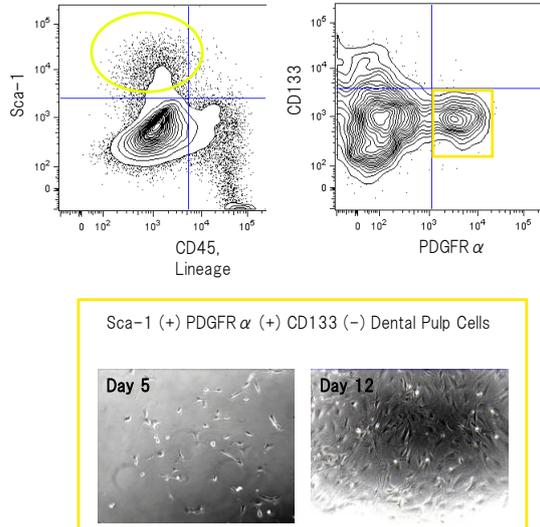


図5 Sca-1とPDGFR  $\alpha$  共陽性歯髄幹細胞のFACS解析と位相差顕微鏡像

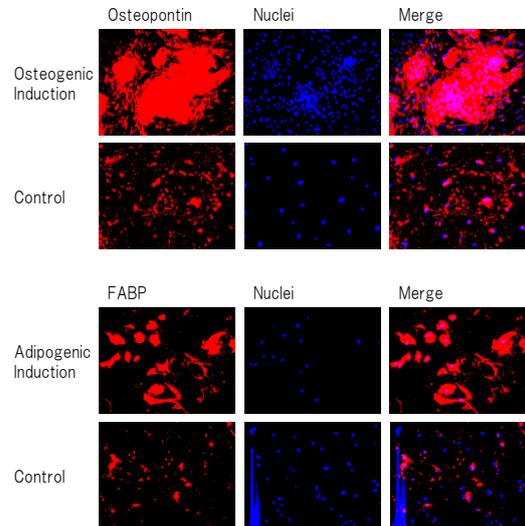


図6 Sca-1とPDGFR  $\alpha$  共陽性歯髄幹細胞の骨・脂肪分化能

以上の結果より、歯髄細胞における筋分化能は歯髄中に存在する高い分化能を持つ間葉系幹細胞の分化可塑性による可能性が考えられた。

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

① 中塚隆介、野崎中成、松岡由和、菅野渉平、植村靖史、佐々木豊、藺田精昭  
CD45 陰性歯髄幹細胞の探索と筋系譜細胞への分化転換、第 8 回 日本再生医療学会総会、2009 年 3 月 6 日、東京国際フォーラム

② 野崎中成、中塚隆介、大浦清  
歯髄細胞の脂肪細胞系譜への分化における遺伝子発現変動の網羅的解析、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 11 日、パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中塚 隆介 (Nakatsuka Ryusuke)  
関西医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90454561

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者