

平成23年 5月 18日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592267

研究課題名(和文)

新規間葉系幹細胞のヒト幼弱智歯歯胚からの分離と象牙質再生への応用

研究課題名(英文)

Characterization of putative amelogenic cells and mesenchymal cells isolated from human dental follicle and dental papilla

完山 学 (KANYAMA MANABU)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：90294420

研究成果の概要(和文)：

本研究では、ヒト幼弱智歯から新規に分離した歯胚由来間葉細胞と歯原性上皮細胞を用いて、*in vitro* で上皮間葉相互作用を再現することを目的とした。その結果、歯小囊から分離・培養した上皮細胞はアメロゲニン遺伝子の発現を認め、歯肉から分離・培養した上皮細胞と比較して増殖能が高い歯原性上皮細胞であることが確認できた。この細胞と歯乳頭由来間葉細胞を混合培養法すると上皮細胞の分化が促進された。

研究成果の概要(英文)：

In this study, we isolated human dental follicle epithelial (DFE) cells that were different from gingival epithelial (GE) cells in terms of their gene expression profiles and proliferative capacity. Furthermore, DFE cells were revealed to be putative amelogenic cells based on their gene expression of an ameloblast marker, amelogenin. We found that a direct contact between DFE and dental papilla mesenchymal (DPM) cells increased an amelogenin expression in DFE cells, suggesting transmembrane signaling from the DPM cells played some pivotal roles for DFE cells to enter into the ameloblast lineage. More importantly, this increase was remarkable when DFE cells were cultured with DPM cells in comparison to DFM cells. We confirmed that DPM cells expressed dentin sialophosphoprotein (DSPP), one of odontoblast markers, but DFM cells did not. Therefore, this DPM cells-driven DFE cells differentiation might be a reproduction of epithelial - mesenchymal interaction, found in tooth generation. However, the underlying mechanisms of this induced differentiation of DFE cells were not cleared. Much more signaling works are required to elucidate epithelial - mesenchymal interaction in human tooth generation. Novel human amelogenic cells, DFE cells, might be useful tool for such kind of signaling works.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：上皮間葉相互作用，象牙質再生

1. 研究開始当初の背景

歯の発生を振り返ってみると、上皮間葉相互作用を契機として上皮細胞と間葉細胞がそれぞれ分化し、エナメル質と象牙質を形成し始める。すなわち、未分化間葉細胞の象牙芽細胞への分化開始にあたっては、上皮細胞から産生されるなんらかの因子が必要であることは明らかである。すなわち、この時期の上皮細胞から産生されるなんらかの因子が、この時期の間葉細胞の増殖と分化をコントロールしているのである。したがって、上皮間葉相互作用を模倣するという観点から効率よく象牙質を再生させる方法を見出せる可能性は高い。しかしながら、(1)現在同定されている象牙質形成能を持つヒト間葉細胞は歯根形成段階以降の細胞であり、上皮間葉相互作用が活発には起こっていない時期で、上皮細胞側からの因子に応答できない可能性がある。

(2)上皮細胞の培養は一般的に困難であることに加え、ヒトの歯原性上皮細胞は萌出時には消失するため、歯原性上皮細胞の分離が困難であることから、ヒト細胞において上皮間葉相互作用の知見を生かした象牙質形成研究はあまり進んでいない。

その様な中、我々は倫理委員会の許可を得て、ヒト幼若智歯歯胚から、歯胚間葉細胞の分離に成功した。さらに、同じ抜去歯に付着した歯小囊からの上皮細胞の分離を試み、その培養に成功した。

2. 研究の目的

本研究では、これらの新規に分離した歯胚由来間葉細胞と歯原性上皮細胞を用いて、上皮間葉相互作用を起こさせ、その際、象牙質形成能を持った間葉細胞の増殖と分化を制御する因子を検索することを目的とした。また、

その知見をもとに、自己細胞とスキヤフォードを用いて再生した象牙質を、その形成量、質、形成速度など多面的に検討したうえで、新鮮抜歯窩に移植し、臨床に耐えうる歯根の再生を目指した。

3. 研究の方法

(1)ヒト歯胚由来間葉細胞と歯原性上皮細胞の分離・培養と、増殖能の検討

①抜去歯からの細胞の分離・培養

本研究は岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認を得て行った（承認番号433）。12名のボランティア（9～12歳）より抜去した幼弱智歯（14歯）から間葉組織（歯乳頭、図1B）を分離し、酵素処理によって単一細胞化を行った。この細胞懸濁液を間葉細胞に適した培地で播種し、培養により出現したコロニーをクローニングした。同時に、抜去歯に付着した歯小囊（図1C）からも間葉細胞を分離・培養した。さらに上皮細胞を分離するため上皮細胞用の培地で培養し、それらの細胞からRNAを抽出し、エナメル上皮細胞のマーカであるcytokeratin14, amelogeninを用いてRT-PCRを行った。また、歯肉上皮も採取し、同様に培養を行った。

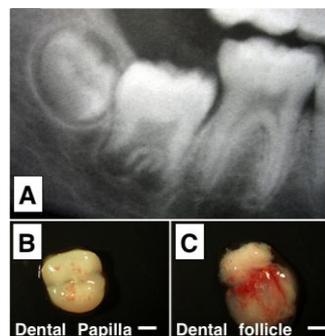


図1 幼弱智歯のレントゲン像と歯乳頭、歯小囊

② 歯小囊由来上皮細胞の細胞増殖能の検討

これらの細胞の単独での増殖や分化能を、ポピュレーションダブリングやBrdU取り込み能で検討した。

(2) 共培養による上皮間葉相互作用の検討

① 混合共培養法と分離共培養法の比較

(1) で得られた細胞を用いて上皮間葉相互作用をin vitroで再現すべく、上皮細胞と間葉細胞の接触がある混合共培養と細胞同士の接触はないが液性因子のやり取りが可能な分離共培養を行い、上皮細胞の分化を観察するためにamelogeninをマーカーとしたRT-PCRを行った。

② 歯小囊由来間葉細胞と歯乳頭由来間葉細胞の上皮細胞への影響度の違い

歯小囊由来間葉細胞と上皮細胞、歯乳頭由来間葉細胞と上皮細胞を混合共培養し、上皮細胞へ影響度の違いを検討するため①と同様にamelogeninをマーカーとしたRT-PCRを行った。

4. 研究成果

(1) ヒト歯胚由来間葉細胞と歯原性上皮細胞の分離・培養と、増殖能の検討

① 抜去歯からの細胞の分離・培養

歯小囊、歯乳頭から分離・培養した間葉細胞を図2に示す。いずれの細胞も線維芽細胞様の形態をしていた。

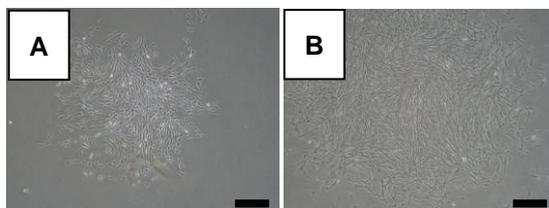


図2 A: 歯乳頭由来間葉細胞, B: 歯小囊由来間葉細胞

一方、歯小囊から分離した上皮細胞と歯肉から分離した上皮細胞を図3に示す。いずれ

の細胞も上皮細胞特有の形態をしていた。

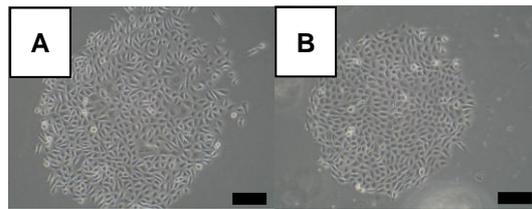


図3 A: 歯小囊由来上皮細胞, B: 歯肉由来上皮細胞

これらの上皮細胞におけるcytokeratin14, amelogeninの発現は図4に示すように歯小囊由来の上皮細胞においてamelogeninの発現は認められたが、歯肉由来の上皮細胞ではamelogeninの発現は認められなかった。本結果は、今回われわれが歯小囊から分離した上皮細胞が歯原性上皮細胞であることを示している。

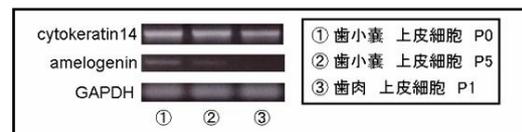


図4 各上皮細胞におけるamelogeninの発現

② 歯小囊由来上皮細胞の細胞増殖能の検討

歯小囊由来上皮細胞BrdU染色を行ったところ、BrdU陽性細胞は、コロニーの外周付近の細胞に多く認められた(図5)。また、ポピュレーションダブリングの結果から歯小囊由来上皮細胞は歯肉上皮細胞と比較して高い増殖能を持つことが示された(図6)。

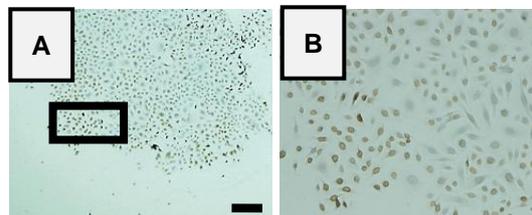


図5 BrdU染色 (A: 弱拡大, B: 強拡大) 茶褐色に染色されている細胞がBrdU陽性細胞である。

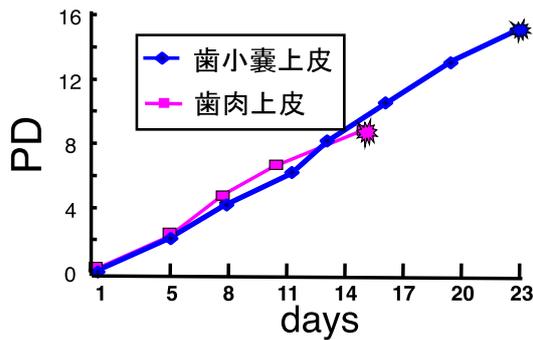


図6 ポピュレーションダブリング

(2) 共培養による上皮間葉相互作用の検討

① 混合共培養法と分離共培養法の比較

上皮細胞と間葉細胞の接触がある混合共培養と細胞同士の接触はないが液性因子のやり取りが可能な分離共培養を行い、歯小囊由来上皮細胞の分化を観察するためにamelogeninをマーカーとしたRT-PCRを行った結果、混合共培養で培養したものが有意にamelogenin遺伝子の発現が高かった(図7)。この結果から、上皮間葉相互作用を再現するためには液性因子のやり取りのみならず、上皮細胞と間葉細胞の直接的な接触が必要である可能性が示唆された

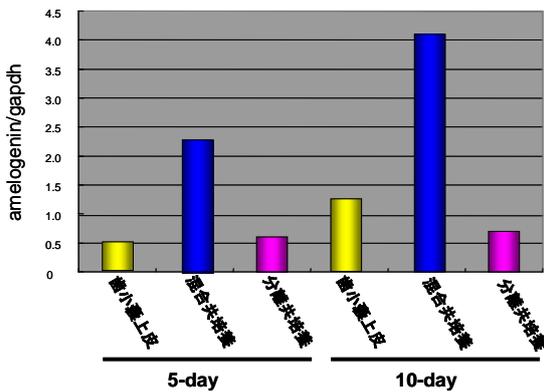


図7 培養法の違いによる歯小囊由来上皮細胞における amelogenin 遺伝子発現の比較

② 歯小囊由来間葉細胞と歯乳頭由来間葉細胞の上皮細胞への影響度の違い

歯小囊由来間葉細胞と上皮細胞、歯乳頭由来間葉細胞と上皮細胞を混合共培養し、上皮

細胞へ影響度の違いを検討するため①と同様にamelogeninをマーカーとしたRT-PCRを行った結果、歯乳頭由来間葉細胞と混合共培養したものが有意に高いamelogenin遺伝子の発現を示した。

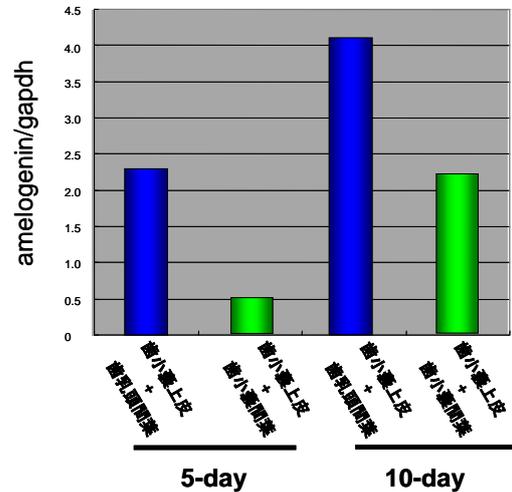


図8 間葉細胞の違いによる歯小囊由来上皮細胞における amelogenin 遺伝子発現の比較

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1件)

① Shimo T, Koyama E, Kanyama M, Kurio N, Okui T, Yamamoto D, Hassan NMM, Sasaki A, Sonic Hedgehog Positively Regulates Odontoblast Differentiation by a BMP2/4-dependent Mechanism., Journal of Oral Tissue Engineering, 査読有, 7(1), 2009, 26-37.

[学会発表] (計3件)

① 園山 亘, 窪木拓男, Functional regeneration of oral tissue-transfer of in vitro results with cultured stem/progenitor cells to in vivo-, 日本組織培養学会 第83回大会, 2010/5/21, 岡山市

② 内部健太, 浅原弘嗣, 窪木拓男, 発生期歯胚において発現する新規遺伝子群の同定とその発現パターン解析, (社)日本補綴歯科学会 歯科補綴ウインタースクール 淡路 2009, 2009/11/14, 兵庫県淡路市

③Tsuchimoto Y, Sonoyama W, Shinkawa S, Okamoto Y, Oshima M, Ueda M, Oida Y, Matsuka Y, Kuboki T., Characterization of putative amelogenic cells isolated from human dental follicle., The 50th Anniversary of KAP International Prosthodontic Congress and the 6th Biennial Congress of Asian Academy of Prosthodontics. 2009/4/25, Seoul, Korea.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

完山 学 (KANYAMA MANABU)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：90294420 (H22)

土本 洋平 (Tsuchimoto, Yohei)
岡山大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号：20423311 (H20～H21)

(2) 研究分担者

窪木 拓男 (KUBOKI TAKUO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00225195

園山 亘 (SONOYAMA WATARU)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：40325121

片岡 健 (KATAOKA KEN)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10293317

完山 学 (KANYAMA MANABU)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：90294420 (H20～H21)