

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592347

研究課題名(和文) 骨再製医療に向けた歯嚢由来細胞の有用性の検討

研究課題名(英文) Study of osteogenic regeneration using dental follicle cells

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

研究成果の概要(和文)：歯嚢は歯科治療で廃棄される組織で、歯嚢から再生医療用の細胞が得られれば有意義である。歯嚢から分離した歯嚢細胞(hDFC)と骨髄由来未分化間葉系幹細胞(hMSC)の細胞学的性質を比較検討すると共に、hDFCの石灰化過程で発現変動する遺伝子を解析した。hDFCはhMSCと類似した性質を有し、石灰化過程で骨芽細胞分化に関連する遺伝子の発現上昇が認められた。よって、hDFCは骨再生医療応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dental follicle (DFC), which is an ectomesenchymal tissue surrounding the developing tooth germ, contains stem cells and lineage committed progenitor or precursor cells of osteoblasts. In this study, we compared characteristics of DFC and bone marrow mesenchymal stem cells, and analyzed gene expression profiles. DFC are suggested a major source of stem cells in adults, and have great potential for regenerative purposes in cell therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・外科系歯学

キーワード：歯嚢由来細胞, 未分化間葉系幹細胞, マイクロアレイ解析, 石灰化能, 骨芽細胞分化能, 骨再生医療応用, シグナリングパスウェイ解析

## 1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域では、腫瘍等で欠損した部位の機能回復やインプラント治療に向けた骨量増加のために、骨組織再生医療が求められている。そのためには患者の侵襲が少なく、十分な細胞数を得ることが可能な細胞源が必要となる。歯嚢は歯科治療過程で廃棄される組織である。歯嚢には未分化間葉系幹細胞が存在し、歯嚢から分離した細胞を骨芽細胞誘導培地で培養すると石灰化することが明

らかとなった。通常、破棄される組織から骨再生医療に用いる細胞を採取できるならば、患者の身体的負担を軽減できる。歯嚢由来細胞の再生医療応用には、本細胞の細胞学および分子生物学的性質を検索し、石灰化過程でどのような遺伝子が発現し、シグナルネットワークを形成しているのかを検討することが必要となる。そこで、歯嚢由来細胞についてマイクロアレイ解析し、シグナリングパスウェイ解析を行うことを計画した。

## 2. 研究の目的

歯嚢由来細胞が骨組織再生医療の細胞としての有用性を調べることを目的とした。

### (1) 歯嚢由来細胞の細胞学および分子生物学的性質

現在すでに骨再生医療に用いられているヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) とヒト歯嚢由来細胞 (hDFC) 細胞学および分子生物学的性質を比較検討する。

### (2) 歯嚢由来細胞の石灰過程で発現する遺伝子の網羅的解析およびシグナリングパスウェイ解析

hDFC を骨芽細胞誘導培地で培養を行い、石灰化過程で発現変動する遺伝子群についてマイクロアレイを用いて網羅的に解析する。また、発現変動した遺伝子群の分子間相互作用およびシグナリングパスウェイを解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯嚢由来細胞の分離・培養

埋伏抜歯の採取した歯嚢を collagenase / dispase 処理し、hDFC を分離後、mesenchymal stem cell growth medium (GM) を用いて、初代および継代培養を行った。

### (2) Immunocytochemistry

hDFC および hMSC の Notch-1 および STRO-1 発現を各抗体および LSAB kit を用いて免疫化学染色を行った。

### (3) 石灰化能の検討

hDFC および hMSC を mesenchymal stem cell osteogenic induction medium (OIM) で培養し、石灰化能については Alizarin S red staining または von kossa staining を用いて調べた。

### (4) ALP 活性の測定

hDFC および hMSC を mesenchymal stem cell osteogenic induction medium (OIM) で培養し、alkaline phosphatase (ALP) 活性を StemTAG ALP activity assay kit を用いて測定した。

### (5) 脂肪細胞への分可能の検討

hDFC および hMSC を mesenchymal stem cell adipogenic induction medium (AIM) で培養し、脂肪滴形成を Oil red o staining で検索した。

### (6) Total RNA の抽出

hDFC および hMSC を  $2 \times 10^5$  cell/100 mm dish の播種し、GM または OIM で培養し、経時的に total RNA を TRIzol で抽出した。

### (7) マイクロアレイ解析

GeneChip を用いて遺伝子発現量を網羅的に測定し、GeneSpring を用いて遺伝子発現解析を行った。

### (8) パスウェイ解析

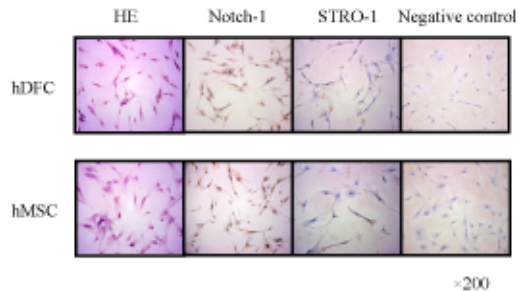
分子間相互作用およびシグナリングパスウェイ解析は Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) hDFC と hMSC の比較検討

#### ① Notch-1 および STRO-1 発現

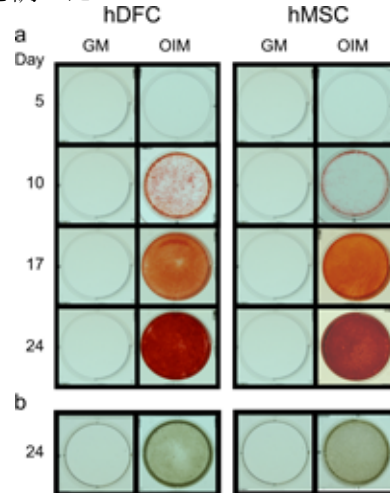
hDFC および hMSC について幹細胞マーカーである Notch-1, STRO-1 の免疫組織染色を行った。



hDFC および hMSC は Notch-1, STRO-1 陽性であった。

#### ② hDFC と hMSC の石灰化能

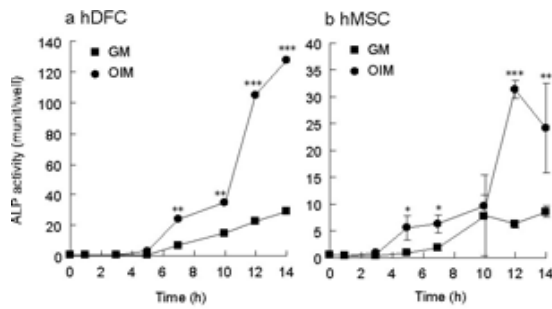
hDFC と hMSC を OIM で培養した時の石灰化能を調べた。



hDFC および hMSC は OIM で培養 10 日目から (a) Alizarin 染色陽性となり、培養 24 日目ではいずれも (b) von Kossa 染色陽性であった。

#### ③ ALP 活性

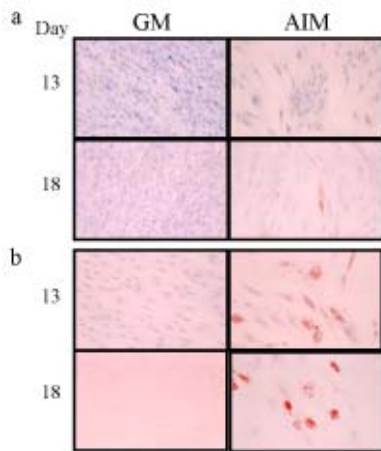
hDFC と hMSC を OIM で培養した時の ALP 活性の経時的変動を調べた。



OIM で培養すると hDFC および hMSC の ALP 活性は経時的に上昇し、GM で培養した時に比べ有意に高かった。

④ 脂肪細胞への分化誘導

hDFC と hMSC を AIM で培養し、脂肪細胞への分化能を調べた。



a: hDFC, b: hMSC

hDFC と hMSC を AIM で培養すると hMSC は培養 13 日目から、hDFC は培養 18 日目で脂肪滴が認められた。

⑤ マイクロアレイ解析

分化誘導していない hDFC と hMSC についてマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現について比較検討した。

Table 1 に各種細胞表面マーカーの遺伝子発現量を示す。hDFC と hMSC では、細胞表面抗原、stem cell マーカーおよび各種 growth factor receptor の発現は類似していた。

Table 2 に hDFC と hMSC 間で発現が異なる遺伝子群を示す。hDFC と hMSC 間で発現に差がある遺伝子には Hox 遺伝子が多く認められた。hDFC では LHX8, hMSC では HOXA9, HOXA5, HOXA10 が高い発現をしていた。

Table 1 Phenotypic characteristics

Common name	Genebank ID	Normalized Intensity	
		hDFC	hMSC
Cluster of differentiation			
<i>CD13</i>	NM_001150	7.6	29.6
<i>CD29</i>	NM_133376	229.2	261.7
<i>CD44</i>	NM_000061	67.0	65.9
<i>CD73</i>	NM_002526	106.2	103.8
<i>CD90</i>	AL161958	59.3	64.8
<i>CD105</i>	NM_000118	7.0	53.5
<i>CD106</i>	NM_001078	4.0	33.1
<i>CD14</i>	NM_000591	absent	absent
<i>CD31</i>	NM_000558	absent	absent
<i>CD34</i>	M81104	absent	absent
<i>CD45</i>	NM_002838	absent	absent
<i>CD62</i>	NM_080923	absent	absent
HLA Class II			
<i>HLA-DRA1</i>	M60334	absent	absent
<i>HLA-DRB1</i>	NM_002125	absent	absent
<i>HLA-DQA1</i>	BG397856	absent	absent
<i>HLA-DQB1</i>	AL583173	absent	absent
<i>HLA-DPA1</i>	A128225	absent	absent
<i>HLA-DPB1</i>	NM_002121	absent	3.8
Stem cell markers			
<i>Notch1</i>	NM_017617	2.6	2.7
<i>Sca-1</i>	NM_004346	19.8	15.2
<i>SSEA-1</i>	M58596	2.0	3.2
Receptors			
<i>TGFBR1</i>	NM_004612	2.3	4.6
<i>TGFBR2</i>	NM_003242	1.7	3.3
<i>BMPRI</i>	NM_004329	10.2	9.1
<i>BMPRII</i>	U20165	6.6	6.5
<i>Flg</i>	NM_023107	4.4	1.9
<i>FGFR2</i>	NM_022969	2.8	10.7
<i>FGFR3</i>	M58051	absent	absent
<i>PDGFR1</i>	NM_002609	18.5	25.8
<i>PDGFR2</i>	NM_002606	175.3	172.3
<i>Flt-1</i>	AA058828	3.5	absent
<i>CXCR4</i>	AF348491	absent	absent

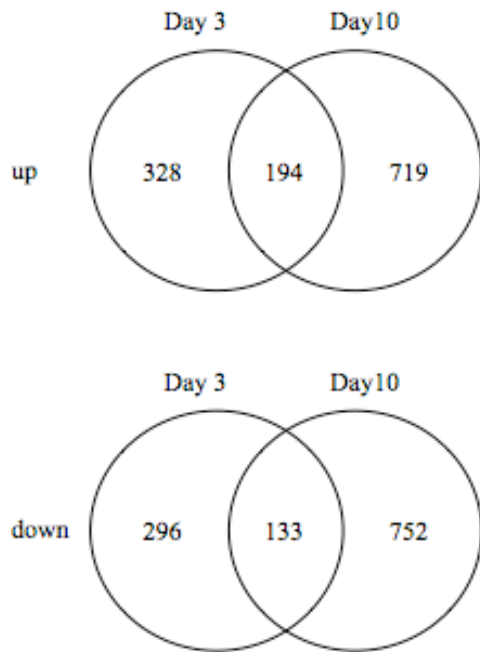
Table 2 Differentially-expressed genes between hDFC and hMSC

Common name	Genebank ID	Ratio	Normalized Intensity (F)	
			hDFC	hMSC
Up-regulation expressed genes in hDFC				
<i>LHX8</i>	BC040321	1093.4	35.04 (P)	0.03 (A)
<i>ITGA8</i>	BF939224	417.0	6.68 (P)	0.02 (A)
<i>EPB41L3</i>	AI770004	408.5	4.09 (P)	0.01 (A)
<i>FOXF1</i>	NM_001451	372.1	23.85 (P)	0.06 (A)
<i>APCDD1</i>	N48299	306.4	41.25 (P)	0.13 (A)
<i>HSPB3</i>	NM_006308	278.4	22.31 (P)	0.08 (A)
	N21096	267.0	4.28 (P)	0.02 (A)
<i>TFAP2C</i>	NM_000591	252.6	25.10 (P)	0.10 (A)
	BC036630	249.5	8.80 (P)	0.04 (A)
<i>FLT1</i>	AA149648	214.5	8.94 (P)	0.04 (A)
Up-regulation expressed genes in hMSC				
<i>RSG4</i>	NM_005613	986.3	0.07 (A)	71.18 (P)
<i>CH3L1</i>	M80927	584.4	0.11 (A)	64.76 (P)
<i>ZNF423</i>	AW149417	528.1	0.06 (A)	29.94 (P)
<i>HOXA9</i>	U418131	397.9	0.06 (A)	23.59 (P)
<i>HOXA5</i>	NM_019102	385.0	0.02 (A)	7.94 (P)
<i>MFAP5</i>	AW665892	355.6	0.40 (P)	142.96 (P)
<i>PITX2</i>	NM_000325	333.0	0.04 (A)	14.59 (P)
<i>NPR3</i>	NM_000908	316.9	0.12 (A)	37.57 (P)
<i>EMX2</i>	A1478455	262.7	0.03 (A)	8.80 (P)
<i>HOXA10</i>	BF792917	241.5	0.07 (A)	16.18 (P)

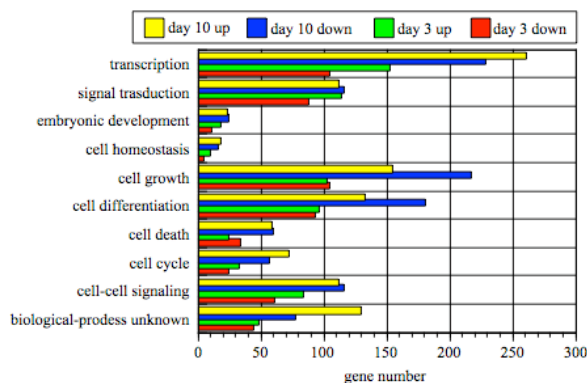
(2) hDFC が石灰化過程で発現変動する遺伝子の検索

① マイクロアレイ解析

GM または OIM で培養 3 日目, 10 日目の hDFC についてマイクロアレイ解析を行った. 約 47,000 遺伝子中, GM 培養した細胞に比べ, OIM で培養した時, 2 倍以上発現が上昇した遺伝子は, 培養 3 日目では 522 遺伝子, 培養 10 日目では 913 遺伝子であった. また, OIM で培養した時, 1/2 以下に発現が減少した遺伝子は, 培養 3 日目では 429 遺伝子, 培養 10 日目では 885 遺伝子であった.



発現変動が認められた遺伝子群について Ontology 分類を行った.



発現上昇した遺伝子は, 培養 3 日目, 培養 10 日目いずれでも transcription に分類される遺伝子が多かった.

Table 3 に細胞分化マーカー遺伝子の発現を示す.

Table 3 Gene expressions associated with differentiation

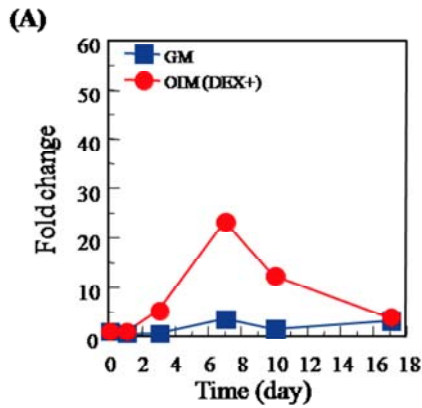
Common name	Genebank ID	Normalized Intensity			
		Day 3		Day 10	
		GM	OIM	GM	OIM
<b>Osteo/odontogenic</b>					
<i>ALP</i>	X14174	0.8	1.9	7.6	12.1
<i>RUNX2</i>	AL353944	44.8	50.4	67.4	43.4
<i>BGLAP</i>	NM_000711	2.7	2.6	2.7	3.3
<i>SPARC</i>	NM_003118	190.7	220.3	244.4	241.0
<i>BSP</i>	NM_004967	absent	absent	absent	absent
<i>OSX</i>	NM_152860	absent	absent	absent	absent
<i>CEMP1</i>	AI829081	absent	absent	absent	absent
<i>DMP1</i>	NM_004407	absent	absent	absent	absent
<i>DPP1</i>	AF094508	absent	absent	absent	absent
<i>AMG</i>	NM_001143	absent	absent	absent	absent
<i>AIH2</i>	AF125373	absent	absent	absent	absent
<b>Ligament</b>					
<i>OSF2</i>	AY140646	33.1	41.5	143.2	74.1
<i>Epha4</i>	AI799018	8.6	4.6	10.0	6.7
<i>ASP</i>	NM_017680	absent	3.5	35.1	46.7
<b>Neurogenic</b>					
<i>NES</i>	AW028075	2.93	2.53	absent	absent
<i>TUBB3</i>	NM_006086	114.0	135.4	29.3	32.5
<i>MAP2</i>	U89330	absent	1.1	absent	absent
<i>NFM</i>	NM_005382	3.3	absent	absent	absent
<b>Adipogenic</b>					
<i>PPARγ</i>	NM_015869	1.2	3.0	1.7	7.8
<i>C/EBPα</i>	NM_004364	absent	absent	absent	absent
<i>LPL</i>	NM000237	absent	absent	absent	absent
<i>aP4</i>	NM_001442	absent	absent	absent	absent

ALP は培養 3 日目, 10 日目いずれでも GM で培養した細胞に比べ OIM で培養した細胞で遺伝子発現が上昇していた. Runx2 は培養 3 日目では OIM で培養した細胞で遺伝子発現は上昇していたが, 培養 10 日目では OIM で培養した細胞で減少していた. odontogenic cell markers はいずれの細胞でも遺伝子発現は認められなかった. また, ligament および neurogenic cell markers は OIM で培養した細胞では遺伝子発現の減少が認められた.

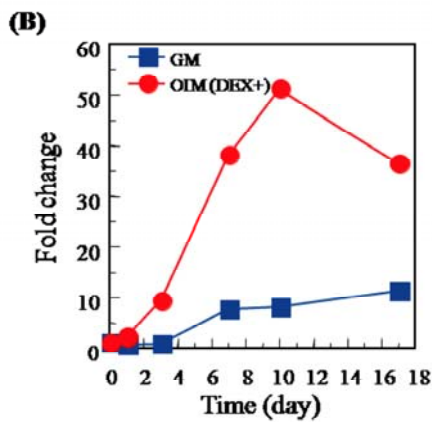
② IGF-II および IGFBP-2 の遺伝子発現

OIM で培養した hDFC の培養 3 日目について, 発現上昇率の高い遺伝子群に IGF-II が認められた. IGF と結合して存在し, IGF の作用制御に関与する IGFBP では, IGFBP-2 が認められた. そこで, real time-PCR 法を用いて IGF-II, IGFBP-2 について経時的な発現量を調査した. その結果, OIM で培養した細胞では, IGF-II, IGFBP-2 とともに培養 3 日目より発現が上昇しはじめ, 7 日目で発現上昇は最高値となった.

IGF-II



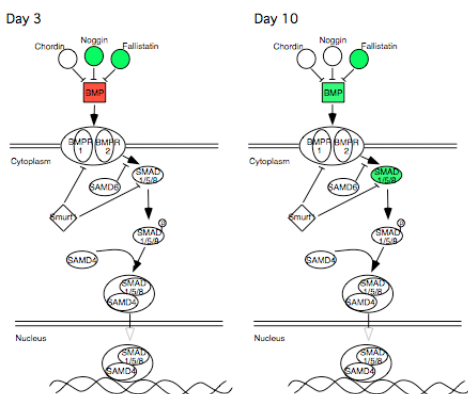
IGFBP2



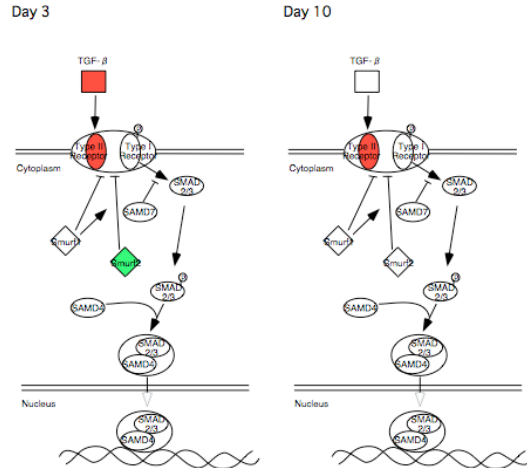
③ シグナリングパスウェイ解析

マイクロアレイ解析の結果発現変動が認められた遺伝子群 [培養 3 日目: 951 遺伝子 (OIMで上昇: 522 遺伝子, OIMで減少: 429 遺伝子), 培養 10 日目 (OIMで上昇: 913 遺伝子, OIMで減少: 885 遺伝子)] を IPA Database にアップロードし, シグナリングパスウェイ解析を行った.

BMP signaling



TGF-β signaling



赤: OIM で培養した細胞で遺伝子発現が上昇  
 緑: OIM で培養した細胞で遺伝子発現が減少

骨芽細胞への分化で重要な役割を担っている BMP および TGF-β のシグナリングパスウェイを調べた. 培養 3 日目では, GM で培養した細胞に比べ OIM で培養した細胞では, BMP および TGF-β の遺伝子発現上昇と, BMP および TGF-β の阻害因子の遺伝子発現減少が認められた. 一方, 培養 10 日目では, OIM で培養した細胞では, BMP 遺伝子は発現減少が認められ, TGF-β の遺伝子発現は変動が認められなかった. 尚, SMAD family は, GM または OIM で培養した細胞間で遺伝子発現変動はないが, hDFC で発現していることをマイクロアレイデータで確認した.

よって, BMP signaling および TGF-β signaling は骨芽細胞分化初期に亢進するものと示唆された.

以上の結果から, 歯嚢由来細胞には未分化間葉系幹細胞が存在した. しかし, 骨髄由来間葉系幹細胞と比べると脂肪細胞へは分化する細胞が少ないことから, 未分化間葉系幹細胞よりは骨芽細胞前駆細胞が多いと考えられた. また, 歯嚢由来細胞は骨芽細胞だけではなく, セメント芽細胞への分化が報告されているが, 今回の我々のマイクロアレイ解析では, セメント芽細胞の分化マーカーは検出されなかった. 歯嚢由来細胞がセメント芽細胞へと分化するには, dexamethasone, β-glycerophosphate, ascorbate 以外の別の刺激が必要なかもしれない.

今後は, 歯嚢由来細胞の骨再生医療応用を視野に入れ, in vivo の研究を進める必要があると考える.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① Aonuma H, Ogura N, kamino Y, Ito K, Kondoh T. Microarray analysis of human dental follicle cells in osteogenic differentiation. -Gene expression of IGF-II and IGFB-2 during osteogenic differentiation-. J Hard-Tissue Biol, 18: 27-34, 2009.
- ② Aonuma H, Ogura N, kamino Y, Ito K, Kondoh T. Gene expression of ostemodulin in human dental follicle cells. Int J Oral-Med Sci, 7: 91-97, 2008.

〔学会発表〕(計5件)

- ① 小倉直美, 他6名, 歯嚢由来細胞の骨芽細胞への分化を制御するmicroRNAについて, 日本口腔外科学会, 2010.10.17, 幕張
- ② 小倉直美, 他5名, 歯嚢由来細胞と骨髄由来未分化間葉系幹細胞に於ける遺伝子発現の比較検討, 日本再生医療学会, 2010.3.18 広島
- ③ 青沼陽菜, 他4名, ヒト歯嚢由来細胞の骨芽細胞分化における遺伝子発現の検討, 日本口腔化学会, 2009.4.16, 浜松
- ④ 青沼陽菜, 他4名ヒト歯嚢由来細胞の骨芽細胞分化における SLRP family の遺伝子発現変動, 日本口腔外科学会, 2008.10.21, 徳島
- ⑤ 青沼陽菜, 他4名, ヒト歯嚢および骨髄由来未分化間葉系幹細胞の骨芽細胞分化における IGF2, IGFBP2 の遺伝子発現変動, 日本口腔科学会, 2008.4.18, 福岡

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

伊藤 耕 (ITO KO)  
日本大学・松戸歯学部・助手  
研究者番号：20419758

### (3) 研究協力者

近藤壽郎 (KONDOH TOSHIROU)  
日本大学・松戸歯学部・教授  
研究者番号：70178416  
神野良一 (KAMINO YOSHIKAZU)  
日本大学・松戸歯学部・准教授  
研究者番号：60287662  
青沼陽菜 (AONUMA HARUNA)  
日本大学・松戸歯学部・助手(専任扱)  
研究者番号：90548306