

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791515
 研究課題名（和文） 骨髄幹細胞の歯牙構成細胞への分化誘導
 研究課題名（英文） Differentiation induction of bone marrow stem cells into tooth component cells
 研究代表者
 辻極 秀次（TSUJIGIWA HIDETSUGU）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：70335628

研究成果の概要（和文）：本研究では骨髄幹細胞を用いた歯牙再生医療の臨床応用を目指す為、骨髄幹細胞の歯牙構成細胞への分化誘導制御に関する基礎的研究を行った。その結果、骨髄幹細胞は歯や歯周組織を構成する様々な細胞への分化能を有していることが証明された。また歯髄中に存在する幹細胞の解析から、骨髄幹細胞の歯牙構成細胞への分化誘導の可能性が示唆された。以上の結果は、将来の歯科再生医療において、骨髄に含まれる細胞から歯を形成できる可能性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：This research was performed as a fundamental study for the clinical application of tooth regenerative medicine. In this research, we explored the possibility of guided differentiation induction of tooth component cells from bone marrow stem cells. The results revealed that bone marrow stem cells might possess differentiation capacity into tooth component cells and periodontal ligament. Moreover, stem cells in the dental pulp might bear similar characteristics with bone marrow stem cells. All the results demonstrated that the possible utilization of bone marrow stem cells in the prospective tooth regeneration medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：再生医学、骨髄幹細胞、歯、GFP、歯、分化

1. 研究開始当初の背景

近年、ES・体性幹細胞の多分化能が明らかになり、さまざまな臓器において幹細胞を用いた再生医療に関する研究が報告がされている。心筋梗塞等、一部の疾患では実際に骨髄幹細胞を用いた臨床研究が行われており、新しい治療法として期待されている。

歯科分野では歯髄や歯胚を用いた歯牙再生医療に関する研究報告がなされている。歯髄を用いる方法では、智歯および乳歯歯髄から得られた歯髄細胞を用いて、象牙芽細胞や神経系細胞の分化誘導に成功している。歯胚を用いた研究では、マウス歯胚から得られた上皮および間葉系細胞からエナメル質を含むほぼ完全な歯牙構築に成功している。これらの研究は歯科分野における再生医療研究を躍進させた大きな功績であると思われる。

しかしながら歯髄および歯胚を用いる方法は、自身の健康な生活歯、あるいは発生段階にある他家歯胚を用いる必要性があり、健全な歯の損失、材料の入手方法、免疫原性等、様々な問題点があり、実際に再生医療に用いることは困難であると考えられる。

2. 研究の目的

申請者は現在までに骨髄幹細胞の多分化能に関する研究を行っており、GFP マウス由来骨髄細胞を X 線照射後の野生型マウスに移植する事により、骨髄幹細胞が、神経組織支配下にある嗅上皮感覚細胞等、様々な細胞に分化可能であることを明らかにしている。歯牙組織に関しては、同様の GFP マウス由来骨髄細胞の移植実験系において、GFP 陽性細胞が歯根膜組織の一部、および歯髄組織に多数認められることを確認している。また、申請者らは成長因子を用いて、硬組織関連幹細胞

の細胞分化制御に関する研究も行ってきている。

そこで申請者は現在までに習得した骨髄幹細胞に関する技術・知識を応用し従来不可能であった、骨髄幹細胞からの歯の形成を可能とする、骨髄幹細胞を用いた歯科再生医療の新規技術の開発を試みる。そのため本研究では、骨髄幹細胞の歯牙構成細胞への分化誘導制御に関する基礎的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) GFP マウス由来骨髄細胞の移植

GFP トランスジェニックマウス・ラットは組織を構成する細胞の全てが GFP 蛋白を発現している。樹立した細胞の移植実験では、移植した細胞がどのような細胞に分化しても GFP 蛋白を有する為、分化誘導した細胞の追跡が可能である。

①GFP マウス・ラット由来骨髄細胞の調整

GFP トランスジェニック動物をエーテル麻酔下にて屠殺し、大腿骨から骨髄細胞を回収する。

②細胞移植

GFP マウス及びラットと同系の 6 週齢（雌）に X 線照射（5 Gray×2 Total 10Gray）を行った後、尾静脈から 1×10^7 個の細胞を移植する。

(2) 組織学的解析

歯牙構成細胞に分化した骨髄由来 GFP 陽性細胞の同定を行う為、HE 染色、免疫組織化学的染色、蛍光免疫二重染色を行う。

①免疫組織化学的染色

骨髄幹細胞移植後経時的に下顎部組織を摘出、4%paraformaldehyde にて固定する。固定後 EDTA にて脱灰、定法にてパラフィンブロックを作成し、骨関連抗体および抗 GFP 抗体

用いた蛍光免疫二重染色を行う。

(3) GFP 陽性細胞の樹立

歯髄組織中に存在する GFP 陽性細胞の同定、詳細な解析を行う為、骨髄幹細胞移植後のラットから歯髄組織を摘出、初代培養を行う。

①歯髄組織からの初代培養

切歯を含む上下顎部を無菌的に摘出、滅菌 PBS で洗浄し歯髄組織を回収し培養する。

細胞増殖後 FACS、Cell sorter にて GFP 陽性細胞を選択し細胞の樹立化を行う。

(4) 生化学的解析

石灰化能、各種硬組織関連蛋白質および遺伝子発現に関する解析を行い、象牙芽細胞への分化能を立証する。

①Von Kossa 染色

培養細胞を石灰化培地にて長期間培養、石灰化顆粒もしくは石灰化ノジュールを Von Kossa 染色にて検出、細胞の石灰化能について検討する。

②Western Blotting

培養細胞に BMP-2 を添加後、経時的に細胞を回収、SDS-PAGE を行った後、抗 GFP, DSP, ALP 抗体を用いて象牙芽細胞、石灰化関連蛋白質の検出を行う。

③RT-PCR

Western Blotting ELISA で検索した蛋白質について、遺伝子発現レベルでの検出も行う。

(5) 動物実験

樹立した歯髄組織中の GFP 陽性細胞が、生体内でどのような組織を形成するのか、動物に移植して組織学的に検討する。

細胞移植

コンフルエントに達した細胞を SCID マウス背部皮下に、試料を移植する。移植後 2, 4 週目に試料を摘出、組織学的に観察する。

4. 研究成果

骨髄幹細胞の歯牙構成細胞への分化能に関する研究では、GFP トランスジェニックマ

ウス・ラット由来の骨髄細胞を用い、(1) GFP 骨髄細胞移植動物の作成と同動物の組織学的解析、(2) 歯髄組織中に存在する GFP 陽性細胞の樹立を試みた。また骨髄幹細胞の歯牙構成細胞への分化誘導を行う上で、象牙芽細胞の解析を行うことは重要である。そこで歯髄細胞の分化過程の詳細を解析するため (3) GFP トランスジェニックラットより歯髄幹細胞の樹立を試みた。

(1)、免疫組織化学的解析では、歯髄組織中に骨髄由来の GFP 陽性細胞が多数認められた。歯髄組織中の GFP 陽性細胞は神経、血管等のマーカー陰性で、現在までに同定されていない細胞である可能性が示唆された。

また、GFP 陽性細胞は歯根膜組織等の歯周組織にも認められ、骨髄幹細胞が歯牙構成組織に深く関わっていると考えられた。

(2)、歯髄組織中の GFP 陽性細胞を培養したところ、数代の経代で細胞数は激減した。

(3)、ラット歯髄から樹立した歯髄幹細胞を、硬組織分化培地で培養した結果、高度な石灰化を生じた。また同細胞を免疫不全マウスに移植したところ、象牙質様の硬組織形成を認めた。歯髄組織から樹立した細胞の解析では、歯髄幹細胞は経代 60 代を経過しても高い増殖能を保持していた。また、同細胞を硬組織分化培地で誘導したところ、細胞外に多量の基質を産生した。電子顕微鏡による観察では産生された基質は線維状を呈しており規則な周期構造が認められたことから、基質の主体はコラーゲンであると考えられた。コラーゲン基質には針状結晶状の沈着が認められる箇所も存在しており、アリザリン染色に強陽性を示したところから、高度に石灰化していると考えられた。歯髄幹細胞をオスフェリオン・マトリゲルと共に免疫不全マウスに皮下に移植したところ、象牙質様の硬組織ならびに歯髄様の組織が認められた。硬組織およ

び隣接する細胞に抗 DSP 抗体陽性を認めたことから、樹立した細胞は象牙芽幹細胞の性格を有すると考えられた。

以上の結果から、骨髄幹細胞は歯や歯周組織を構成する様々な細胞への分化能を有していることが証明された。また歯髄中に存在する幹細胞の解析から、骨髄幹細胞の歯牙構成細胞への分化誘導の可能性が示唆された。本研究から、骨髄に含まれる幹細胞から歯を形成できる可能性を導き出され、今後の歯科再生医療への貢献が望まれる。

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 15 件)

- ①Rodriguez AP, Tsujigiwa H, Gunduz M, Cengiz B, Nagai N, Tamamura R, Borkosky SS, Takagi T, Inoue M, Nagatsuka H. Influence of the microenvironment on gene and protein expression of odontogenic-like and osteogenic-like cells. *Biozell*. 33(1):39-47. 2009. 査読有
- ②Orita S, Yoshinobu J, Orita Y, Tsujigiwa H, Kakiuchi M, Nagatsuka H, Nomiya S, Nagai N, Nishizaki K. Prolactin may stimulate proliferation in the olfactory epithelium of the female mouse. *Am J Rhinol Allergy*. 23(2):135-8. 2009. 査読有
- ③Sathi GA, Inoue M, Harada H, Rodriguez AP, Tamamura R, Tsujigiwa H, Borkosky SS, Gunduz M, Nagatsuka H. Secreted frizzled related protein (sFRP)-2 inhibits bone formation and promotes cell proliferation in ameloblastoma. *Oral Oncol*. 45(10):856-860. 2009. 査読有
- ④Takeuchi A, Tsujigiwa H, Murakami J, Kawasaki A, Takeda Y, Fukushima K, Rodriguez AP, Nagatsuka H, Yamada M, Nishizaki K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2/atelocollagen composite as a new material for ossicular reconstruction. *J Biomed Mater Res A*. 89(1):36-45. 2009. 査読有
- ⑤Orita Y, Tsujigiwa H, Nishizaki K, Teshima T, Yoshinobu J, Orita S, Takeuchi A, Takeda Y, Nagatsuka H, Nagai N. The engraftment of transplanted bone marrow-derived cells into the inner ear. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 266(1):59-63. 2009. 査読有
- ⑥Yamachika E, Tsujigiwa H, Shirasu N, Ueno T, Sakata Y, Fukunaga J, Mizukawa N, Yamada M, Sugahara T. Immobilized recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances the phosphorylation of receptor-activated Smads. *J Biomed Mater Res A*. 88(3):599-607. 2009. 査読有
- ⑦Yamamoto M, Okano M, Fujiwara T, Kariya S, Higaki T, Nagatsuka H, Tsujigiwa H, Yamada M, Yoshino T, Urade Y, Nishizaki K. Expression and Characterization of PGD(2) Receptors in Chronic Rhinosinusitis: Modulation of DP and CRTH2 by PGD(2). *Int Arch Allergy Immunol*. 148(2):127-136. 2009. 査読有
- ⑧Nagatsuka H, Katase N, Han PP, Tsujigiwa H, Siar CH, Nakajima M, Naomoto Y, Tamamura R, Kawakami T, Gunduz M. Heparanase and its related molecules in odontogenic tumors. *Oral Med Pathol*. 13(3):81-89. 2009. 査読有
- ⑨Borkosky SS, Nagatsuka H, Orita Y, Tsujigiwa H, Yoshinobu J, Gunduz M, Rodriguez AP, Missana LR, Nishizaki K, Nagai N. Sequential expressions of Notch1, Jagged2 and Math1 in molar tooth germ of

mouse. *Biozell*. 32(3):251-258. 2008. 査読有

⑩ Nakano K, Siar CH, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N, Kawakami T. Notch signaling in benign and malignant ameloblastic neoplasms. *Eur J Med Res*. 13(10):476-480. 2008. 査読有

⑪ Rivera RS, Nagatsuka H, Siar CH, Gunduz M, Tsujigiwa H, Han PP, Katase N, Tamamura R, Ng KH, Naomoto Y, Nakajima M, Nagai N. Heparanase and vascular endothelial growth factor expression in the progression of oral mucosal melanoma. *Oncol Rep*. 19(3):657-661. 2008. 査読有

⑫ Shimizu T, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nakano K, Okafuji N, Kurihara S, Nagai N, Kawakami T. Gene expression of jagged2 in mandibular condylar cartilage development. *Eur J Med Res*. 13(1):1-3. 2008. 査読有

⑬ Rivera RS, Nagatsuka H, Gunduz M, Cengiz B, Gunduz E, Siar CH, Tsujigiwa H, Tamamura R, Han KN, Nagai N. C-kit protein expression correlated with activating mutations in KIT gene in oral mucosal melanoma. *Virchows Arch*. 452(1):27-32. 2008. 査読有

⑭ Nakano K, Nagatsuka H, Tsujigiwa H, Gunduz M, Katase N, Siar CH, Kawakami T. Immunohistochemical Characteristics of Odontogenic Neoplasms and Their Physiological Counterparts. *J. Hard Tissue Biol*. 17(3):79-90. 2008. 査読有

⑮ Inoue M, Nagatsuka H, Tamamura R, Siar CH, Tsujigiwa H, Borkosky S, Fujii M, Nagai N, Setsu K. Localization of Oxytalan fiber, Type III Collagen and BMP Family in Conventional and Desmoplastic Ameloblastoma. *J. Hard Tissue Biol*.

17(1):23-30. 2008. 査読有

[学会発表] (計8件)

① 辻極秀次、片瀬直樹、山近英樹、長塚 仁 アンドレア ロドリゲス、原田英光、山田雅夫 ; in vitro条件下において細胞外基質を産生する象牙芽幹細胞、第18回硬組織再生生物学会学術大会・総会 2009年9月5日、札幌

② 辻極秀次、吉田まり子、山田雅夫 ; 骨髄由来間葉系幹細胞とヘルペスウイルス、第24回中国四国ウイルス研究科、2009年7月4-5日、岡山

③ Inoue M, LeGeros R Z, Nagatsuka H, Inoue M, Tsujigiwa H, Rodriguez A P, Nagai N ; Osteoblast-like and odontoblast-like cell response in vitro and rat bone activity in vivo: Effect of F-substituted apatites. The 4th International Symposium on Apatites and Correlative Biomaterials. 2008年9月10日-9月13日, Manila, Philippines

④ Rodriguez A P, Inoue M, Tsujigiwa H, Hailong H, Kishimoto E, Gunduz M, Nagatsuka H, Akao M, Nagai N ; Characterization of CaTiO₃-aC Prepared by Modified Thermal Decomposition Method. The 4th International Symposium on Apatites and Correlative Biomaterials. 2008年9月10日-9月13日, Manila, Philippines

⑤ Yamachika E, Tsujigiwa H, Matsubara M, Kaneda Y, Shirasu N, Ueno T, Mizukawa N ; Bone formation with immobilized rhBMP-2. XIX Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. 2008年9月9日-12日, Bologna, USA

⑥ 辻極秀次、武田靖志、長塚仁、アンドレア ロドリゲス、片瀬直樹、西崎和則、山田雅夫 ; 耳小骨再建材料としてのrhBMP-2/アテロコ

ラーゲン複合体、第 17 回硬組織再生生物学会学術大会・総会、2008 年 8 月 30 日、徳島
⑦Rodriguez A P, Tamamura R, Borkosky S S, Inoue M, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Sathi Gul S A, Kidhimoto Etsuo, Akao M, Nagai N ; A peliminary comparative study of CaTiO₃ prepared by different methods. 第 17 回硬組織再生生物学会学術大会・総会、2008 年 8 月 30 日、徳島

⑧ Silvia Susana Borkosky, Hitoshi Nagatsuka, Mehmet Gunduz, Hidetsugu Tsujigiwa, Ryo Tamamura, Naoki Katase, Masae Fujii, Gul SanAra Sathi, Noriyuki Nagai ; Microsatellite analysis of ING tumor suppressor genes in ameloblastoma. 第 17 回硬組織再生生物学会学術大会・総会、2008 年 8 月 30 日、徳島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA HIDETSUGU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号 : 70335628

(2) 研究協力者

長塚 仁 (NAGATUSKA HITOSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 70237535

山田 雅夫 (YAMADA MASAO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 40166731