

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592422

研究課題名（和文） 臨床応用を視野に入れた歯髄幹細胞の選択的増殖を目指す無血清培地の開発

研究課題名（英文） Development of the serum-free medium aiming at the selective increase of the pulpal stem cell which clinical application into the field of vision

研究代表者

藤井 理史（MASASHI FUJII）

広島大学・病院・講師

研究者番号：10284217

研究成果の概要（和文）：

歯髄細胞に特異的に高発現するマーカー遺伝子が見出された。これらのマーカー遺伝子は、歯牙発生、歯髄組織の恒常性の維持機構や歯髄細胞の分化メカニズム等の解析に役立つと考えられる。さらに、移植用細胞の品質管理にも有用であると期待される。また、従来の血清含有培地と比較して、STK2は歯髄細胞の安全で効率的な培養に役立つことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Proliferation and osteogenic potential of human dental pulp cells was enhanced by incubation with STK2. However, STK3 did not support osteogenesis of human dental pulp cells, although it did so in bone marrow mesenchymal stem cell cultures. STK2, but not STK3, proved useful for regenerative medicine using dental pulp cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：保存修復学

1. 研究開始当初の背景

再生医療のニーズは年々たかまりつつあり、またそれに応えようとする研究は年々活発化している。ところが、再生医療の現状はES細胞をはじめ、間葉系幹細胞、神経幹細胞、筋肉幹細胞などの臓器・組織形成のための、

細胞探し、と、様々なサイトカインのふりかけによるそれらの分化誘導に終始しており、個体の発生や臓器の形成過程に関する分子シナリオ、すなわち発生に関する時間的・空間的情報が十分にわかっていない感が否めない。さらに、2005年のヒト胚性幹

細胞捏造事件依頼、この分野の研究は頓挫していたかのようにも見えた。しかし、京都大学・再生医科学研究所の山中信弥教授らが、人間の皮膚細胞から人工多能性幹細胞（iPS細胞）を作ること成功したことが報じられ、大きな話題となった。しかし、今後の問題点としては、まず遺伝子をより安全な方法で導入することが考えられる。iPS細胞はレトロウイルスを用いて遺伝子を導入する。レトロウイルスの特徴は細胞の染色体上で場所を選ばず遺伝子を挿入してしまうことである。したがって、大事な遺伝子の間に挿入されてしまうと、その遺伝子は破壊されてしまう。破壊された遺伝子のがん抑制遺伝子であれば、細胞はがん化する可能性がある。また、もともとある遺伝子を破壊しまいで、レトロウイルスの挿入箇所付近の遺伝子の発現の調節を変えてしまう可能性もある。したがって、この問題点を解決しない限り iPS細胞の臨床応用は困難であると考えられる。また、前述したように、これまで様々な組織より組織幹細胞と定義される細胞集団が分離・培養されているが、これらの多くは、培養ディッシュに接着した細胞を継代することによって獲得した細胞を増殖・分化させているが、かならずしも純粋な幹細胞のみとは考えにくい。さらに、組織幹細胞の培養に最適とされる「幹細胞用培地」はこれまでたくさんのメーカーから提供されているが、どれも幹細胞のみを特異的に増殖させるというわけではない。今回の応募者のグループはこれまで骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）を用いて、骨、軟骨および脂肪への分化誘導ならびに、それぞれの組織の形成に成功している。また現在、幹細胞を培養するにあたって、①BSEやエイズなどのウイルスの混入リスク、②MSC増殖効果のロットごとのバラツキ、③異種動物由来蛋白がヒト細胞に非ヒト型糖鎖の合成を誘導すること、④移植用細胞に結合した動物蛋白による免疫応答の惹起など、をなくすことが重要と考えられているが、骨髄由来間葉系幹細胞のみを選択的に増殖させることが可能な無血清培地（STK2）の作製に成功している。この培地は基本生存因子、増殖誘導因子とその他の追加因子から成っており、10%ウシ胎児血清（FBS）添加の通常の培地と比較して、骨髄由来間葉系幹細胞のみを2倍以上増殖させ、線維芽細胞や上皮細胞などの細胞増殖を抑制させることが確認されている。歯髄ならびに歯根膜組織は神経堤由来であり、これらの組織中に存在する幹細胞（歯髄幹細胞ならびに歯根膜幹細胞）は、骨髄由来間葉系幹細胞とは、性質と表現型が異なると考えられるが、これまでの予備的な研究結果より、追加因子を調整することによって、こ

れら神経堤由来の幹細胞のみを選択的に増殖させる培地の作製も可能と考える。口腔領域より比較的容易に採取可能な幹細胞に最適な培地を適応させることにより、歯科領域から再生医療に必要な幹細胞の供給を可能とし、新たな幹細胞治療の開発への足がかりとしたいと考える。

そして、この分野の研究は、再生医療に用いられる移植用細胞として、骨髄や脂肪由来の間葉系幹細胞についての研究が数多く進められているが、歯科では歯髄細胞の移植法が注目されている。しかし、歯髄細胞と間葉系幹細胞との関係は明確ではない。また、歯髄細胞の遺伝子発現の特徴や、特異的マーカーは未だ不明である。一方、細胞移植治療において、細胞培養系での血清の使用は移植用幹細胞の性質を変化させる可能性があり、その上血清からの病原体の感染リスクがある。そこで、本研究ではDNAマイクロアレイを用いて、歯髄細胞と骨髄、脂肪、滑膜由来の間葉系幹細胞および線維芽細胞を比較することにより、歯髄細胞のマーカー遺伝子を追求した。更に、歯髄細胞の無血清培養を試みた。

## 2. 研究の目的

現在、幹細胞移植治療の普及にはまだいくつかの臨床的課題があると考えられている。①患者によっては幹細胞の大量増幅が困難であること。②人手がかかり、煩雑で高コストであること、③細胞の品質にはバラツキがあること、④再生効果にバラツキがあることなどである。これらの課題を解決・克服することで、無血清培地の作製は極めて有用であると考えられる。今回は神経堤由来幹細胞に最適な無血清培地の作製を試み計画した。これは再生治療を現実的なものとするための課題をクリアしていく上で、避けて通ることのできない重要な課題である。にもかかわらず、これまで、幹細胞のみを選択的に未分化な状態を維持したまま増殖させる培地の作製は国内外を通じて報告がない。この培地が作製できれば、神経堤由来幹細胞を簡便かつ安全に培養することが可能となり、歯科領域から幹細胞移植治療を確立するという究極の目標に近づけることができる。さらに、歯科領域にとどまらず他領域における再生医療のさらなる発展にも貢献できる。

歯髄ならびに歯根膜から採取した細胞を超密度培養後、シングルコロニーを回収し、増殖活性が維持されている細胞株を採取する。これらの細胞株をそれぞれの誘導培地にて培養することによって、骨、軟骨、脂肪などへ分化能を確認し、これらの細胞株の中により幹細胞と非幹細胞を区別することを目

的とし、次いで、まず、骨髓由来間葉系幹細胞用の無血清培地（STK2）を用いて細胞を培養し、幹細胞株と非幹細胞の増殖活性の違いを検討する。このデータを基準としてさらに培地中の追加因子を調整することによって、神経堤由来の幹細胞である歯髄幹細胞ならびに歯根膜幹細胞の増殖と分化能維持に最適な無血清培地を調整あるいは作製することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 歯髄および歯根膜からの幹細胞の単離、培養

① 抜歯した歯牙より歯髄および歯根膜を無菌的に採取し、酵素処理にて細胞を単離

② 超低密度で細胞を播種し培養することでシングルコロニーを形成させる。

③ コロニーを回収

④ 細胞株を未分化のまま増殖させ、その中から増殖能が維持されている株を選択、回収。

(2) 採取した細胞株の継代後の骨、軟骨への分化誘導。

(3) 形成能の検討

(4) 分化誘導可能な細胞株の増殖活性の検討、培地の調整

① 多分化能を有する細胞株、線維芽細胞、分化不可能な細胞株を無血清培地あるいは通常の10%FBS含有DMEMを用いて、MTT assayにて細胞増殖活性を比較検討する。

② 無血清培地により回収した細胞株が幹細胞であるか否かをスクリーニングできることを確認する。このステップにより、今後、骨、軟骨、および脂肪誘導を行わずに、回収したシングルコロニーが幹細胞であるか否かが判定可能となる。

### 4. 研究成果

歯髄細胞に対して各間葉系幹細胞および線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルは高い相関係数を示した。クラスター解析では、骨髓、脂肪、滑膜由来間葉系幹細胞は相互に近接したが、歯髄細胞はこれらの間葉系細胞や線維芽細胞から遠い関係に位置付けられた。歯髄細胞に特異的に発現する遺伝子を見出した、そのうち、STK2の培養系でも歯髄細胞で高レベルに発現していた遺伝子はMSX1、PDE5A、および、ENTPD1であった。STK2は10%FBS含有DMEMと比較して歯髄細胞の遺伝子発現プロファイルを大きく変化させることなく増殖を促進した。STK2で前培養した歯髄細胞は10%FBS含有DMEMで前培養したも

のと比較して、石灰化誘導後に高レベルのALP活性と石灰化能を示した。以上の結果から、歯髄細胞に特異的高発現するマーカー遺伝子を見出し、これらのマーカー遺伝子は、歯牙発生、歯髄組織の恒常性の維持機構や歯髄細胞の分化メカニズム等の解析に役立つと考えられる。さらに、移植用細胞の品質管理にも有用であると期待される。また、従来の血清培地と比較して、STK2は歯髄細胞の安全で効率的な培養に役立つことが示唆された。

### 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2件)

1 河田俊嗣, 神谷貴志, 白井憲一, 加来真人, 国松亮, 上田宏, 栗原英実, 岡崎正之, 西村英紀, 藤井理史, 丹根一夫  
歯牙歯冠移植—その可能性と課題—  
歯界展望 第115巻6号 査読あり  
2010, p1104-1108

2 河田俊嗣, 神谷貴志, 加来真人, 国松亮, 上田宏, 栗原英実, 岡崎正之, 西村英紀, 白井憲一, 藤井理史, 内田隆, 丹根一夫  
新たな審美修復材料—歯の銀行の役割—  
広島大学歯学雑誌, 第41巻2号  
査読あり 2009,p121-125

[学会発表] (計2件)

1 藤井紗貴子, 藤本勝巳, 尾田良, 西村英紀, 加藤幸夫  
無血清培地STK2によるヒト歯髄細胞の増殖および石灰化能の亢進  
日本歯科保存学会 2010 6月4日  
崇城大学市民ホール (熊本市)

2 畠山智子, 峯岡茜, 本山直世, 藤井紗貴子, 矢野加奈子, 荒川真, 白井憲一, 藤井理史  
酸蝕症の進行度と賛成飲食物の摂取傾向  
日本歯科保存学会 2011 6月9日  
東京ベイ舞浜ホテル クラブリゾート (浦安市)

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 理史 (FUJII MASASHI)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号：10284217

(2) 研究分担者

加藤 幸夫 (KATO YUKIO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
教授  
研究者番号：10112062

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：