

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 15 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592435

研究課題名（和文） 上皮幹細胞マーカーに反応する歯根膜内上皮系細胞の分離と解析

研究課題名（英文） Isolation and analyzing of epithelial like cells in the PDL reacted Stem cells marker

研究代表者

北島 佳代子 (KITAJIMA KAYOKO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：00177841

研究成果の概要（和文）：

歯根膜組織から得られた上皮細胞を CD44 と CD31 でマーキングし、FACS 解析を行ったところ、細胞数が全体の 5%以下である side population(SP)分画が確認された。この細胞を用いて三次元再構成気相培養を行った結果、歯肉上皮の分化や角化様式とは異なり、歯根嚢胞にみられる非角化性組織が観察された。このことから、以下のことが明らかとなった。(1)歯根膜周囲組織には上皮系幹細胞が存在する。(2)その細胞は FACS 分析にて分取することが可能である。(3)分取した SP 分画細胞は、歯根嚢胞の上皮形成に関与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

FACS analyses were performed using epithelial cells derived from periodontal ligaments after treated with CD44 and CD31 markers. The results showed the existence of the side population (SP) fragments that the population was less than 5 percentages. In the three-dimensional air/medium interface culture (3DC) using the SP fragments cells, the differentiation and keratinization were not similar to gingival epithelial, and the non-keratinized tissues correspond with radicular cysts were observed. (1)The existence of epithelial stem cells was confirmed in the periodontal ligaments. (2) The isolations of the epithelial stem cells were possible by FACS analyses. (3)The isolated SP fragments cells have potentiality to participate in the epithelial formation of radicular cysts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
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：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯根膜、上皮幹細胞、識別マーカー、FACS 解析、SP 分画、マラッセ上皮残渣、ヘルトウィッチ上皮鞘、三次元再構成培養

1. 研究開始当初の背景

歯胚の内外エナメル上皮が癒合して形成されたヘルトウィッチ上皮鞘は、歯根形成の誘導的役割を果たすと考えられている (Avery1991)。一方、歯根嚢胞の形成には上皮組織が関与することが知られており (Avery1991, Walton ら 1996, 須田ら 2004)、歯根形成の役割を終えたヘルトウィッチ上皮鞘がマラッセ上皮残遺として歯根膜内に島状に残存し、何らかの刺激を受けて増殖し歯根嚢胞の嚢胞上皮を形成すると考えられる。

歯根嚢胞は嚢胞内壁を上皮が構成するため治療が困難になりやすい。そこで上皮の分化増殖や、嚢胞形成のメカニズムを細胞レベルでの解明することは、治療上多大な効果が期待できる。

一方、正常上皮細胞の細胞分裂には、基底細胞部にみられる幹細胞が関与することが知られている (池田ら 1997)。研究分担者の五十嵐は、1997年に Michigan 大学の Ian C. Mackenzie 教授とともに、皮膚と歯肉についてケラチンをマーカーとした正常組織の分化増殖に関する検討を行っている。

さらに研究代表者の北島は、2007年より、London 大学で Ian C. Mackenzie 教授とともに、頭頸部悪性腫瘍の上皮系幹細胞を用いてコロニーパターンを検討し、幹細胞の増殖パターンと各種マーカーに対する反応について研究した。

最近の研究では、一度分化した細胞の脱分化が起こることや、マラッセ上皮残遺細胞がエナメル質形成能を有することも報告されている。

すなわち、歯根形成誘導に関与する一方で歯根嚢胞の形成にも関わるヘルトウィッチやマラッセなどの上皮系細胞は多能性を有

する細胞とも考えられ、その性質を詳細に検討することは、歯根形成のメカニズムと根尖性歯周疾患、特に歯根嚢胞の成立メカニズム解明ならびにその治療法確立において大きな意義を有し、さらには組織再生療法にも多大な効果をもたらすことが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、歯根形成や根尖性歯周疾患の成立に関係し、多能性を有する可能性のある歯根膜内の上皮系細胞を上皮幹細胞識別マーカーを用いて分離し、さらに三次元再構成培養法を用いた組織再構成を行い、細胞特性を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト歯根膜からの細胞を用いたが、初代培養からの派生が得られず細胞数の確保が困難であった。そこでカニクイザルおよびブタの歯根膜から細胞を回収し、培養実験を行った結果、ブタからのみ本研究に用いるのに十分な細胞数が確保できた。そこで本実験では、ブタ歯根膜からの細胞を用いることとし、それに伴って用いる抗体や試薬を変更し実施した。

(1) 生後約6か月のブタ下顎骨から第1、第2乳臼歯を抜去し、4℃のFAD (DMEMとHam's F12の3:1混合液、Penicillin 100units/ml、Streptomycin 100 μg/ml、Hydrocortisone 400ng/ml、Epithelial Growth Factor 10ng/ml、Cholera toxin 8.4ng/ml、Bovine insulin 5 μg/ml、Adenin 18.2 μg/ml、FBS10% (V/V) 含有) 中に投入保存した。ついで4℃ PBS (Penicillin 200units/ml、Streptomycin 200

μ g/ml、Amphotericin B 5 μ g/ml 含有) で洗淨後、実体顕微鏡下で歯根中央 1/3 の歯根膜を別削採取し、37°C、CO₂ 下で初代培養を行った。

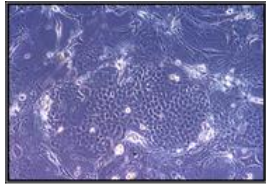


図 1. 島状コロニーを形成した上皮細胞

派生した細胞から Trypsin を用いて線維芽細胞様細胞を除去した後、Trypsin-EDTA を用いて特有の島状コロニーを形成する上皮細胞 (図 1) を剥離、回収し、上皮細胞用培養液 FAD を用いて数代の継代培養を行った。この際 mitomycin C 処理を施した 3T3 細胞 (ATCC #CCL92) を feeder layer として同時に播種した。一方、線維芽細胞の培養には FBS10% (V/V) を添加した DMEM-FBS を用いた。コラーゲンゲル内培養には 4~5 継代の線維芽細胞を用い、コラーゲン液に DMEM を添加後 1N-NaOH で中和し、10% (V/V) FBS と線維芽細胞 0.3×10^5 /ml を加えた。37°C、CO₂ 下で 20 分間インキュベートし、2~3 継代の上皮細胞を 0.8×10^5 /ml でゲル表面に播種した。コラーゲンゲルをナイロンメッシュ上に移し、表面を空気に暴露した air-medium interface (気相) で培養を継続した。

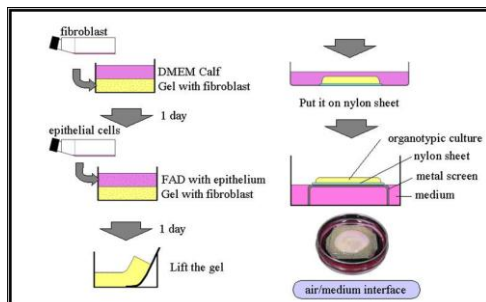


図 2. 三次元再構成培養 (3DC)

1、2、3、4 週時に標本を取り出して OCT コンパウンドで凍結包埋し凍結切片を作製

するとともに、中性ホルマリン浸漬固定を行い、厚さ 6 μ m の連続パラフィン切片を作製した (図 2)。標本は一般染色として HE 重染色、Azan 染色、Masson Trichrome (MT) 染色、Van Gieson (VG) 染色のほか、CD44、CD133、CK 5+14 (LH 8)、Pan CK、CK19、Involcrin、E-Cadherin、Vimentin に対する免疫染色を行い光顕にて観察し、同一個体のブタ歯肉上皮と比較観察した。

(2) 生後約 6 か月のブタ下顎骨から第 1、第 2 乳臼歯を抜去し、歯頸部 1/3、根中央部 1/3、根尖部 1/3 から歯根膜細胞を回収し、同様に初代培養後、派生した細胞から上皮細胞のコロニーを剥離、回収し、数代の継代培養を行った後、HBSS (+ 2% FBS, 10mL Hepes) に 1×10^6 cell/ml となるよう再懸濁し、FACS 解析に供した。FACS 解析には BD Vantage™ SE (日本 BD 社製) を用いた。解析にあたり、CD44 と CD31 によるマーキングを行い、CD44⁺/CD31⁺、D44⁺/CD31⁻、CD44⁻/CD31⁺、CD44⁻/CD31⁻ の 4 群に分離した。さらに D44⁺/CD31⁻ 細胞群については mitomycinC 処理した 3T3 を feeder として添加した FAD を用いて継代培養し、形成されたコロニーの形態を観察した。

(3) CD44 と CD31 でマーキングし、FACS でソートして得られた D44⁺/CD31⁻ population の SP 分画細胞を用いて同様の方法で三次元再構成培養を行った。標本は、PAN CK、CK19、Involucrin、Integrin α 6、Integrin β 4 を用いて免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 歯肉上皮では基底細胞層から有棘細胞層、顆粒細胞層へと細胞の形態は次第に扁平化し、最表層では HE、Azan、MT に強染する角化層がみられた。免疫染色では、これらの上皮層とその下層の結合組織層はともに CD44 に反応を示し、強く染まる細胞がところどころに散在していた。上皮層は CD133 には反応せず、結合組織層の特に上皮層直下に強い反応がみられた。LH 8 は結合組織層に強い反応がみられ、角化層直下の顆粒層にも弱い反応がみられた。上皮層全層にわたり Pan CK の発現がみられたが、CK19 は基底層にのみ弱い反応を示した。Involcurin は基底層から上層に向かって発現が増加したが、E-Cadherin の発現はみられず、Vimentin は結合組織層に限局して発現した。

歯根膜由来の上皮細胞播種を行った 3 DC では、コラーゲンゲル上の全層に Pan CK が発現した。1 週では数層の厚みを持った上皮層が観察されたが、2 週では上皮細胞は散在する様相を呈した。CK19 は、1 週では弱い発現がみられたが、2 週では明らかな反応はみられなかった。Involcurin の発現は、基底層から上方に向かって変化せず、E-Cadherin は明かな発現はみられなかった (図 3, 4)。

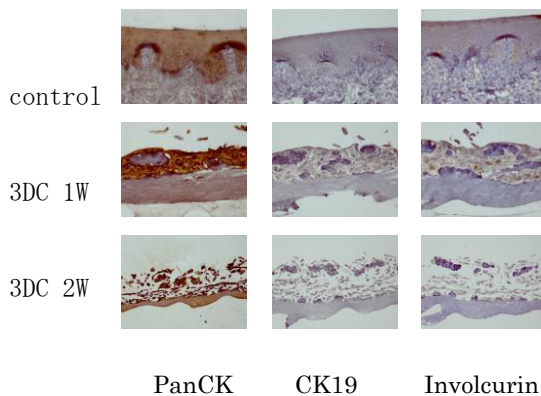


図 3. PanCK, CK19, Involcurin の免疫染色

(2) 上皮細胞播種を行った 3 DC では、1 週例で表層に扁平な細胞層を含む厚みを持った数層の上皮細胞層が観察された。2 週例では上皮細胞層の厚みを増したが細胞間に空隙の発現がみられ、3 週以降では上皮細胞が散在する様相を呈した。

上皮細胞播種の 3 DC 1 週例では、CD44 は上皮細胞層に強い反応を示し、2 週例では CD44 陽性の上皮細胞層の厚みが増したが、3、4 週例では上皮細胞は散在した。CD133 の 1 週例では、上皮細胞層の中に CD133 陽性細胞の集塊がみられ、コラーゲンゲル最上層の上皮細胞直下一層の強染色部が観察された。2 週例では菲薄化したコラーゲンゲルの直上に CD133 陽性の厚みのある層がみられた。3、4 週例ではその層はコラーゲンゲルから離れ、一部は上皮細胞層の上面にも観察された。

LH 8 もコラーゲンゲル最上層に強い反応がみられ、上皮細胞層の中に LH8 陽性細胞の集塊がみられた。3 週ではこの LH 8 陽性細胞はコラーゲンゲル直上と上皮細胞層の中間付近にも観察され、経時的に表層側で観察されるようになった。

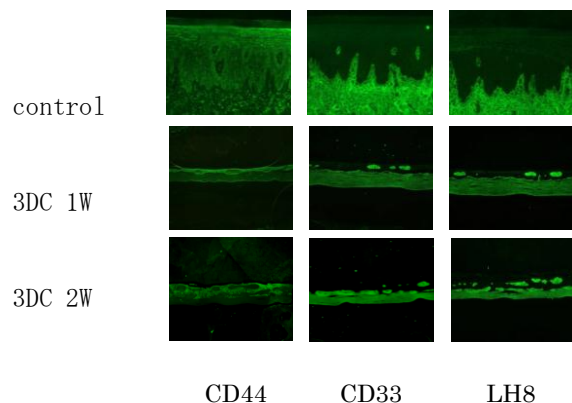


図 4. CD44, CD33, LH8 の免疫染色

(3) 歯根膜から得た上皮様細胞を CD44 と CD31 でマーキングして FACS にてソートし、得られた CD44⁺/CD31⁻の細胞群において、歯頸側 1/3、根中央 1/3、根尖 1/3 の 3 群ともに高い幹細胞活性をもつとされる Side Population (SP) 分画が確認された (図 5)。

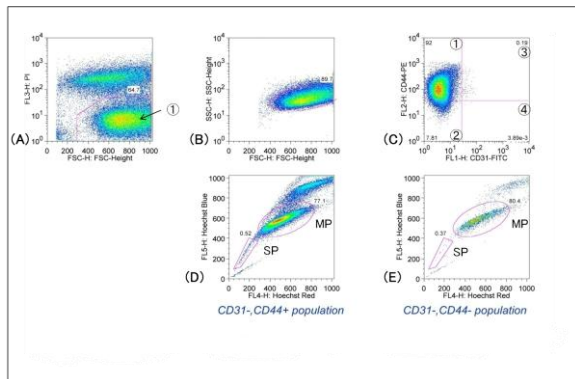


図 5. 根尖部 1/3 の歯根膜組織から得られた細胞の FACS 解析による SP 分画

各部位における細胞総数に対する Main Population (MP) 分画の比率は 44.5~77.1 と高かったが、SP 分画の細胞数の比率は、歯頸部 1/3 で 5.17%、根中央部 1/3 で 0.17%、根尖部 1/3 で 0.52% といずれも 5% 台以下と少なかった。

得られた CD44⁺/CD31⁻細胞群の継代培養では、通常の上皮細胞の敷石状形態とは異なる網状のコロニーが観察され (図 6)、特徴的な球状構造を伴っていた (図 7)。

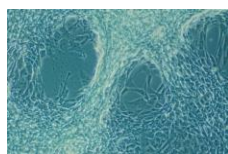


図 6. CD44⁺/CD31⁻細胞の網状コロニー

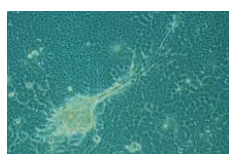


図 7. 球状構造

得られた SP 分画細胞の三次元再構成気相培養では、数層の細胞からなる上皮様構造が確認され、表層部では細胞は扁平化し、角化傾向が認められた。基底部から表層におよぶ上

皮組織全体に PanCK の強い発現が認められた。InVolucrin は、1 週例で細胞質内に点状に散在もしくは局在して発現し、経時的に細胞質内全体に広く発現が認められるようになった。CK19 は弱い発現がみられ、integrin6、integrin8 はごく弱い発現がみられた。

以上のことからコラーゲンゲルに歯根膜周囲組織から採取した上皮細胞を播種した 3 DC では、厚い角化上皮を伴う重層扁平上皮からなる皮膚や歯肉上皮の細胞分化様式とは異なることが明らかとなり、歯根膜周囲組織内の上皮系細胞は歯肉上皮を形成する細胞とは異なることが考えられる。

3 DC 1 週、2 週のコラーゲンゲル上に PanCK の発現が確認されたことにより、歯根膜由来の上皮細胞播種を行った 3 DC から得られた培養細胞は上皮細胞であることは明らかである。歯肉上皮における非角化層の基底細胞層に発現した CK19 は 3 DC の 1 週で確認されたが、2 週では明らかではなく、また、角化傾向の強い上層で増加した Involucrin も、3 DC では上層での増加傾向はみられなかった。これらの動態は、歯根膜由来の上皮細胞播種を行った 3 DC で、角化層を形成せず、上皮細胞が散在する様相を呈したことに関係すると考えられる。これは厚い角化上皮を伴う重層扁平上皮からなる皮膚や歯肉上皮の細胞分化様式とは異なり、角化層を形成しない歯根嚢胞壁の上皮にみられる反応に類似していると考えられる。すなわち、歯根膜周囲細胞のうち SP 分画を構成する幹細胞特性を有する細胞が、角化層を有しない歯根嚢胞上皮様組織を構成する可能性が示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計6件)

- (1) Kitajima Kayoko, Arai Kyoko, Igarashi Masaru: Histochemical observations of the 3DC using epithelial cells and fibroblasts derived from PDL, Japan China Dental Conference 2012, April 27th, 2012, West China College of Stomatology, Sichuan University.
- (2) Kitajima Kayoko, Arai Kyoko, Igarashi Masaru: Isolation of stem cell marker positive epithelial like cells derived from PDL and observation of morphologic character after cell culture, The 10th JEA-KAE joint Scientific Meeting, Mar 24-25th, 2012, Seoul, SETEC.
- (3) 北島佳代子、新井恭子、山田理絵、松田浩一郎、五十嵐 勝; 歯根膜から得た上皮様細胞の FACS を用いた幹細胞マーカー陽性細胞の分離とその細胞培養後の形態観察、日本歯科保存学会 2010 年度秋季保存学会学術大会 (第 133 回) プログラムおよび講演抄録集, 167, 10月 28-29, 2010 年, 長良川国際会議場、岐阜.
- (4) 北島佳代子、松田浩一郎、山田理絵、新井恭子、五十嵐 勝; 歯根膜から得た上皮細胞と線維芽細胞を用いた三次元培養の keratinization に関する免疫組織学的観察、日本歯科保存学会 2010 年度春季保存学会学術大会 (第 132 回) プログラムおよび講演抄録集, 142, 6月 4-5 日, 2010 年, 崇城大学市民ホール、熊本.
- (5) Kayoko Kitajima, Kyoko Arai, Koichiro

Matsuda, Rie Yamada, Masaru Igarashi: Histochemical observations of the three-dimensional cultures using epithelial cells and fibroblasts derived from periodontal ligament; プログラムおよび抄録集 vol.11、No.1、42-43、8th JEA & KAE Joint Endodontic Meeting, 2010, March 27-28, BEXCO, Busan, Korea.

- (6) 北島佳代子、新井恭子、長谷川有紀、松田浩一郎、山田理絵、五十嵐 勝: 歯根膜から得た上皮細胞と線維芽細胞を用いた三次元培養に対する組織学的観察、日本歯科保存学雑誌, 秋季学術大会 (第 131 回) プログラム及び講演抄録集, 211, 10月 29-30 日、2009 年、仙台国際センター、仙台.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 佳代子 (KITAJIMA KAYOKO)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授
研究者番号: 00177841

(2) 研究分担者

五十嵐 勝 (IGARASHI MASARU)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授
研究者番号: 90168104

新井 恭子 (ARAI KYOKO)
日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師
研究者番号: 10434143