

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791942

研究課題名（和文） 歯根膜幹細胞を応用した神経再生誘導法の樹立

研究課題名（英文） The application of periodontal ligament stem cells for the injured neural tissues

研究代表者

友清 淳（TOMOKIYO ATSUSHI）

九州大学・歯学研究院・歯科保存学研究分野・助教

研究者番号：20507777

研究成果の概要（和文）：

ヒト歯根膜幹細胞による神経再生について解析を行うため、多分化能を有し胚性幹細胞関連遺伝子を発現するヒト歯根膜細胞株(1-17細胞株)を用い、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞(PC12)の神経細胞分化、細胞遊走、およびアポトーシスについて検討を行った。その結果、1-17細胞株がPC12の神経細胞分化ならびに細胞遊走を促進し、アポトーシスを抑制したことからヒト歯根膜幹細胞における神経再生能が示唆された。さらに1-17細胞株と、神経細胞への分化能を有さないヒト歯根膜細胞株とのマイクロアレイ及びプロテオミクス解析を行い、現在神経再生を促進する因子について検討を行っている。

研究成果の概要（英文）：

We recently developed a multipotent clonal human periodontal ligament (PDL) cell line, termed cell line 1-17. To clarify the effects of PDL stem cells on neural regeneration remain unclear, we investigated the effects of cell line 1-17 on neurocytic differentiation, migration, and survival of PC12 cells. Cell line 1-17 induced neurocytic differentiation and migration of PC12 cells. Furthermore, this line exerted antiapoptotic effects on differentiated PC12 cells. Thus, PDL stem cells may play a role in peripheral nerve innervation during its regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2100000	630000	2730000
2010年度	1300000	390000	1690000
年度			
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

研究分野：歯科保存学

科研費の分科・細目：若手研究（B）

キーワード：歯学、移植・再生医療、細胞・組織、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経支配が様々な組織の恒常性維持および再生に重要な役割を果たすことが知られており、歯根膜組織においても神経損傷が歯

根膜幅の減少およびアンキローシスを誘導することが報告されている。

(2) 骨髄由来間葉系幹細胞が末梢神経の再生を促進する報告はあるが、歯根膜幹細胞の神経再生能は明らかになっていない。

(3) 歯根膜幹細胞は少数しか存在しないため、分取が非常に困難であり、また幹細胞としての形質を維持したまま細胞数を増加させるのも困難である。

2. 研究の目的

近年、我々は多分化能を有し胚性幹細胞関連遺伝子を発現するヒト歯根膜細胞株(1-17細胞株)を樹立した(Tomokiyo et al., 2008)。本研究ではこの細胞株を用い、ヒト歯根膜幹細胞による神経再生能を明らかにし、その再生因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞分化

ラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞(PC12)は神経栄養因子の存在下にて突起を伸長し、神経細胞としての特徴を示すことが報告されている。このPC12を①1-17細胞株と共培養、②固定した1-17細胞株上にて培養、③1-17細胞株由来の細胞外基質上にて培養、④1-17細胞株培養上清中にて培養し、7日後、形態的に分化を解析した。

(2) 細胞遊走

ポアサイズ8 μ mの膜を有するインサート上にPC12を播種したのち、①培地のみ、②1-17細胞株、③1-17細胞株+NGF中和抗体、④50pg/mL リコンビナントNGF、⑤1-17細胞株+K252aと分離共培養を行った。2日後、膜を通過したPC12を計測した。

(3) アポトーシス

分化誘導後のPC12を無血清培地にて培養すると突起が収縮し、アポトーシスを起こすことが知られている。そこで分化誘導後のPC12を①無血清培地、②無血清の1-17培養上清中にて培養した。24時間後、細胞形態、Annexin-V、および抗アポトーシス遺伝子発現について解析した。

(4) 遺伝子およびタンパク解析

1-17細胞株と神経細胞への分化能をもたないヒト歯根膜細胞株の遺伝子発現量を比較するため、マイクロアレイ法を行った。また2つの細胞株間で発現差のあるタンパクを同定するため、二次元電気泳動法を行った。

4. 研究成果

(1) 1-17細胞株による神経細胞分化誘導

① 共培養

1-17細胞株とPC12の共培養を行ったところ、PC12の神経細胞分化が促進された(図1)。

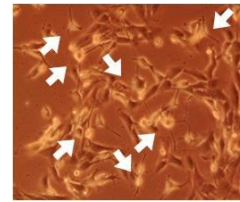


図1 1-17細胞株とPC12の共培養後の位相差顕微鏡像。矢印は分化したPC12を示す。

② 細胞外器質および膜タンパクの検討

固定した1-17細胞株上ならびに1-17細胞株由来の細胞外器質上にPC12を播種したところ、分化したPC12は極めて少数であった。

③ 分泌タンパクの検討

1-17細胞株の培養上清中にてPC12を培養したところ、分化したPC12が多数観察された(図2A)。また、培養上清にNGF中和抗体を加えたもの(図2B)、およびNGFレセプターであるTrkAのチロシンキナーゼ阻害剤であるK252aを添加したもの(図2C)では、PC12の分化は抑制された。さらにELISA法にて1-17細胞株培養上清中に50pg/mLのNGFが含まれることが明らかになったが、同濃度のリコンビナントNGFを加えてもPC12の分化は誘導されなかった(図2D)。

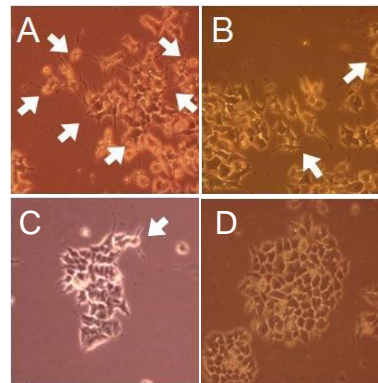


図2 培養後の位相差顕微鏡像 (A)1-17細胞株培養上清 (B)1-17細胞株培養上清+NGF中和抗体 (C)1-17細胞株培養上清+K252a (D)50pg/mL NGF。矢印は分化したPC12を示す。

(2) 1-17細胞株による細胞遊走誘導

培地のみでは遊走するPC12は少数であったが(図3A)、1-17細胞株の存在下では多くのPC12が遊走した(図3B)。一方、1-17細胞株にNGF中和抗体を加えたもの(図3C)、およびK252aを添加したもの(図3D)では、PC12の遊走は抑制された。また50pg/mLリコンビナントNGFを加えても遊走は促進されなかった(図3E)。

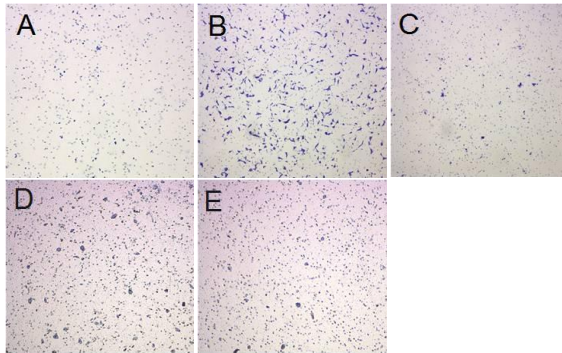


図 3 分離共培養後のトルイジンブルー染色像 (A)培地のみ (B)1-17 細胞株 (C)1-17 細胞株+NGF 中和抗体 (D)1-17 細胞株+K252a (E)50pg/mL NGF。

(3) 1-17 細胞株による抗アポトーシス作用

血清存在下では分化した PC12 の突起は維持されたが(図 4A)、無血清培地で培養すると突起は収縮した(図 4B)。一方、無血清の 1-17 細胞株培養上清では、血清存在下と同様に突起は維持された(図 4C)。また無血清の 1-17 細胞株培養上清で培養を行うと、無血清培地での培養と比較して Annexin-V 発現の減少(図 4D, E)および抗アポトーシス遺伝子 *Bcl-2* ならびに *Bcl-xL* 発現の上昇が認められた。

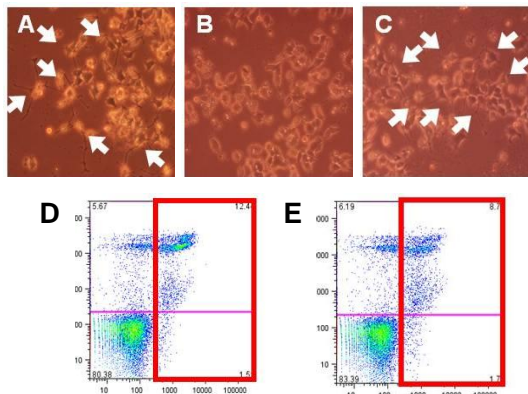


図 4 培養後の位相差顕微鏡像(A-C)ならびに Annexin-V 測定図(D, E) (A)血清含有培地 (B)無血清培地 (C)無血清 1-17 細胞株培養上清。矢印は突起を有する PC12 を示す。(D)無血清培地 (E)無血清 1-17 細胞株培養上清。赤枠内は Annexin-V 陽性領域を示す。

以上の結果より、1-17 細胞株の分泌した NGF が PC12 の神経細胞分化および細胞遊走を誘導し、アポトーシスを抑制することが示唆された。しかしながら、1-17 培養上清に含まれるのと同濃度である 50pg/mL リコンビナント NGF では神経細胞分化および細胞遊走が促進されなかったことから、1-17 細胞株は NGF だけでなく NGF と共力作用をもつタンパクを産生していることが推察された。

(4) 遺伝子およびタンパク解析

1-17 細胞株に由来する NGF と共力作用を持つ因子を同定するため、神経細胞への分化能をもたない細胞株とのマイクロアレイ解析を行った。その結果 1-17 細胞株において 2 倍以上の発現量を示し、Neuroscience に関与する 17 遺伝子を同定した。

また二次元電気泳動により、1-17 細胞株にのみ発現の認められるスポットを認めた。

(5) 今後の展望

本実験より、歯根膜幹細胞の神経再生能が示唆されただけでなく、その再生誘導が歯根膜幹細胞の産生する NGF および共力作用をもつタンパクであることも示唆された。このタンパクを同定することは、効率的に神経再生を行う上で非常に意義のあるものであると考えられる。

現在、複数の遺伝子およびタンパクが候補に挙がっているが、その機能を解析するため以下の実験を予定している。

- ① 1-17 細胞株に siRNA 法を用いてマイクロアレイにより得られた 17 遺伝子の発現抑制を行い、PC12 の神経細胞分化、遊走、およびアポトーシスに及ぼす影響を検討する。
- ② 二次元電気泳動により得られたスポットの解析を行い、タンパクの同定を行う。
- ③ ①によって得られた遺伝子を導入した細胞、または②によって得られたタンパクを神経損傷モデル動物に移植し、治癒効果を検討する。

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 6 件)

- (1) Monnouchi S, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Kono K, Akamine A. The roles of angiotensin II in stretched periodontal ligament cells. J Dent Res. 査読有 2011 Feb;90(2):181-5.
- (2) Maeda H, Tomokiyo A, Koori K, Monnouchi S, Fujii S, Wada N, Kono K, Yamamoto N, Saito T, Akamine A. An in vitro evaluation of two resin-based sealers on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells. Int Endod J. 査読有 2011 May;44(5):425-31.

- (3) Fujii S, Maeda H, Tomokiyo A, Monnouchi S, Hori K, Wada N, Akamine A. Effects of TGF- β 1 on the proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells and a human periodontal ligament stem/progenitor cell line. Cell Tissue Res. 査読有 2010 Nov;342(2):233-42.
- (4) Maeda H, Nakano T, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Hori K, Akamine A. Mineral trioxide aggregate induces bone morphogenetic protein-2 expression and calcification in human periodontal ligament cells. J Endod. 査読有 2010 Apr;36(4):647-52.
- (5) Hashiguchi I, Yoshimine Y, Maeda H, Gotou Y, Fujii S, Tomokiyo A, Yoshida K, Nishigaki S, Monnouchi S, Hori K, Okumura H, Akamine A. An epidemiologic examination on the prevalence of the periodontal diseases and oral pigmentation in Yusho patients in 2008. Fukuoka Igaku Zasshi. 査読有 2009 May;100(5):111-7.
- (6) 前田英史, 友清淳, 藤井慎介, 島一也, 和田尚久, 門野内聡, 堀清美, 中野嗣久, 吉嶺嘉人, 赤峰昭文. Marix trioxide aggregate (MTA) がヒト歯根膜線維芽細胞に及ぼす影響に関する研究. 日本歯科保存学雑誌. 査読有 2009(4):355-62.

[学会発表] (計 13 件)

- (1) 山本直秀, 前田英史, 友清淳, 他 8 名. GDNF がヒト歯根膜細胞の走化性に及ぼす影響について. 第 133 回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2010/10/28. 岐阜.
- (2) 郡勝明, 前田英史, 藤井慎介, 友清淳, 他 7 名. 未分化なヒト歯根膜細胞株の分化に及ぼすカルシウムの影響について. 第 133 回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2010/10/28. 岐阜.
- (3) 河野清美, 前田英史, 和田尚久, 藤井慎介, 友清淳, 他 6 名. bFGF が未分化なヒト歯根膜細胞株の線維芽細胞様分化に及ぼす影響について. 第 133 回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2010/10/28. 岐阜.
- (4) 和田尚久, 前田英史, 藤井慎介, 友清淳, 赤峰昭文. ヒト歯根膜および歯髓細胞の免疫抑制特性に関する研究. 第 133 回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2010/10/28. 岐阜.
- (5) 前田英史, 友清淳, 他 9 名. スーパーボンドシーラーの特性について -ヒト歯根膜細胞の増殖と分化に与える影響-. 第 31 回日本歯内療法学会学術大会. 2010/7/24. 東京.
- (6) Monnouchi S, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, 他 2 名. The roles of angiotensin II in stretched periodontal ligament cells. 88th General Session & Exhibition of the IADR. 2010/7/14. Spain.
- (7) Monnouchi S, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, 他 2 名. Angiotensin II is involved in the loading signal in stretched human PDL cells. 3rd Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry. 2009/11/8. Hiroshima.
- (8) 友清淳, 他 8 名. AhR シグナルがヒト歯根膜細胞のコラーゲン代謝に及ぼす影響. 第 131 回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2009/10/29. 宮城.
- (9) 門野内聡, 前田英史, 藤井慎介, 友清淳, 他名 2 名. 伸展力が負荷されたヒト歯根膜細胞のシグナル伝達には Angiotensin II が関与している. 第 130 回日本歯科保存学会春季学術大会. 2009/6/11. 北海道.
- (10) 藤井慎介, 前田英史, 友清淳, 他名 5 名. TGF- β 1 がヒト歯根膜細胞および前駆細胞の増殖および分化に及ぼす影響. 第 130 回日本歯科保存学会春季学術大会. 2009/6/11. 北海道.
- (11) 友清淳, 他 8 名. AhR シグナルがヒト歯根膜細胞のコラーゲン代謝に及ぼす影響. 全国油症班会議. 2009/6/8. 福岡.
- (12) Maeda H, Tomokiyo A, 他 5 名. MTA stimulates BMP2 expression in human PDL cells. 87th General Session & Exhibition of the IADR/AADR/CADR. 2009/4/1. USA.
- (13) Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, 他 3 名. Expression and effects of

TGF-β1 in periodontal ligament tissue.
87th General Session & Exhibition of
the IADR/AADR/CADR. 2009/4/1. USA.

〔図書〕(計2件)

(1) Hidefumi Maeda, Naohisa Wada,
Shinsuke Fujii, Atsushi Tomokiyo,
Akifumi Akamine. InTech. Stem cells.
Periodontal ligament stem cells. In
press.

(2) Hidefumi Maeda, Atsushi Tomokiyo,
Shinsuke Fujii, Naohisa Wada and
Akifumi Akamine. BioMed Central. The
Stem Cell Research & Therapy. Promise
of periodontal ligament stem cells. In
press.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

友清 淳 (TOMOKIYO ATSUSHI)
九州大学・歯学研究院・歯科保存学研究
分野・助教
研究者番号：20507777

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：