

機関番号：34417

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791958

研究課題名 (和文) 歯髄由来 CD45 陰性、Sca-1 および CXCR4 陽性幹細胞移植による組織修復

研究課題名 (英文) An investigation of tissue regeneration therapy using dental pulp-derived CD45(-), Sca-1(+) and CXCR4(+) cells transplantation.

研究代表者

中塚 隆介 (NAKATSUKA RYUSUKE)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：90454561

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、骨髄間葉系幹細胞 (MSC) マーカーを用いたセルソーティングによる DPSC の予期的分離を試みた。さらに、DPSC の特性を検証するため、フローサイトメトリー解析、免疫組織化学、分化誘導実験を行った。その結果、マウス DPSC を予期的に分離する手法が確立された。また、DPSC が MSC と同様の多分化能を示すこと、歯を構成する細胞の niche と考えられる歯の形成端に存在することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we investigated whether these DPSCs can be prospectively isolated by FACS using bone marrow-derived mesenchymal stem cell (MSC) markers. Furthermore, characteristics of these DPSCs have been extensively investigated using FACS, immunostaining, and in vitro tissue-oriented differentiation cultures. This study developed a novel method to prospectively isolate the dental pulp-derived mouse DPSCs and revealed that the identified DPSCs possess the potential to differentiate into multiple lineages similar to the MSCs, and these cells exist in the niche for tooth forming cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯髄幹細胞、分化可塑性

1. 研究開始当初の背景

DPSC の存在はこれまで多くの研究により示唆されてきた。DPSC は、*in vivo* で象牙芽細胞前駆細胞を供給していると考えられているが、DPSC が歯のどこの領域に存在し、機能しているのかは不明である。過去、*in vitro*

の研究では、DPSC は MSC に類似した分化能 (骨、軟骨、脂肪) を示すことが明らかにされている。これらの発見された DPSC の多くは、細胞の接着性によって選択された細胞群であり、実際これらの細胞は単一の細胞群ではなく、性質に差を持つさまざまな細胞種が含まれていると考えられている。これまで、さま

さまざまな方法で確立された DPSC の細胞表面マーカーが解析されている。しかし、これまで歯髄中の DPSC を予期的に分離する手法はこれまでに国内外で報告されていない。そこで、本研究では MSC が持つ細胞表面マーカーを指標として MSC と同様の性質を持つ DPSC を予期的に純化し、DPSC を用いた組織修復に利用することが可能ではないかと考えられた。

2. 研究の目的

歯髄に存在すると考えられる幹細胞を予期的に純化し、その特性を明らかにすることを目的として、FACS を用いて DPSC を MSC が持つ細胞表面マーカーにより同定・純化し、さらに分離した DPSC の多分化能や増殖などの機能を解析する。また、げっ歯類において、常生歯形成端には、高い増殖能力を有し、伸び続ける歯を構成する様々な細胞に分化することができる幹細胞の存在が示唆されていることから、同定されたマウス切歯由来 DPSC の生体内における局在を調べ、生体での役割についても解析を行う目的で研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 歯髄細胞の単離 と FACS による DPSC の純化

マウス下顎切歯より分離した歯髄をコラゲナーゼ、ディスパーゼによる酵素処理後多分化能を有する細胞を MSC 特異的な表面抗原 (Sca-1、PDGFR α) を指標とした FACS を用いて DPSC を予期的に純化した。さらに、この DPSC について、Sca-1、PDGFR α 以外の MSC マーカーなどの発現についても解析した。

(2) 純化 DPSC の形態と細胞増殖能の評価

FACS によって予期的に純化された DPSC を培養ディッシュ上に播種し、初代培養細胞の形態を顕微鏡下で観察した。さらに、細胞増殖能を調べるため、生細胞を Calcein-AM によって染色し、蛍光値を測定することで定量的に細胞増殖能を評価した。

(3) 分化誘導培地による細胞分化の評価

純化された DPSC の多分化能を解析するため、脂肪、骨、軟骨の分化能について解析した。培養された DPSC を各分化誘導条件の培地に置換し、培養後それぞれの分化条件について分化マーカーの発現を免疫蛍光染色により解析した。

(4) マウス切歯 DPSC の局在と *in vivo* に

おける細胞増殖能の解析

過去の研究から、常生歯形成端には増殖能の盛んな細胞が存在することが明らかにされている。そこで、マウス切歯由来 DPSC が常生歯形成端に存在するかを、Sca-1、PDGFR α の免疫組織蛍光染色により解析した。また、BrdU を *in vivo* 投与したマウス切歯由来 DPSC における BrdU 陽性細胞を FCM により解析し、*in vivo* における DPSC の細胞増殖能を調べた。

4. 研究成果

歯髄には繊維芽細胞様の多分化能を示す細胞が存在することが示唆されている。マウス切歯歯髄より酵素処理によって分離した歯髄細胞から間葉系幹細胞の純化に有効とされる幹細胞マーカーを用いた FACS により幹細胞の解析、ソーティングを行った。骨髄 MSC 同様歯髄には Sca-1、PDGFR α 陽性細胞が存在することが明らかとなった (図 1)。

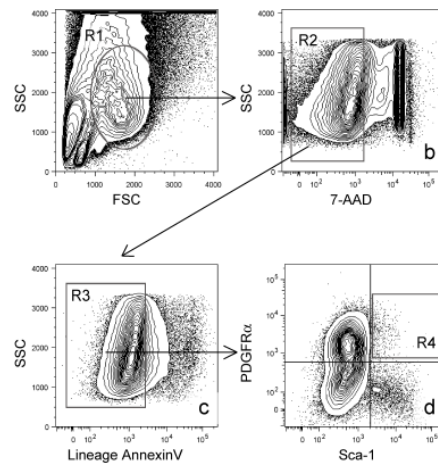


図 1 Sca-1 と PDGFR α 共陽性 DPSC の FACS 解析

さらに、Sca-1、PDGFR α 陽性細胞はこれまでに報告されている MSC マーカーを発現していた (図 2)。

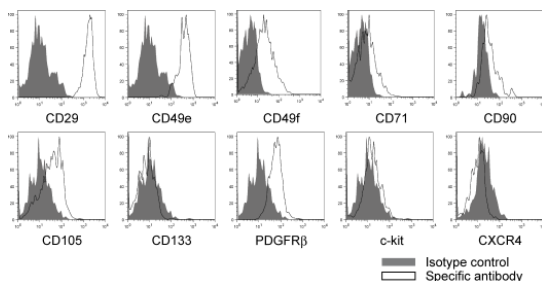


図 2 Sca-1 と PDGFR α 共陽性 DPSC における MSC マーカー (CD29、CD49e、CD49f、CD71、CD90、CD105、PDGFR β) および幹細胞マーカー (CD133)、造血幹細胞マーカー (c-kit、CXCR4) の FACS 解析。MSC マーカーの発現が見られた。

歯髄より分離した Sca-1、PDGFR α 陽性の細胞は付着性の細胞であり、高い増殖活性を示した (図3)。

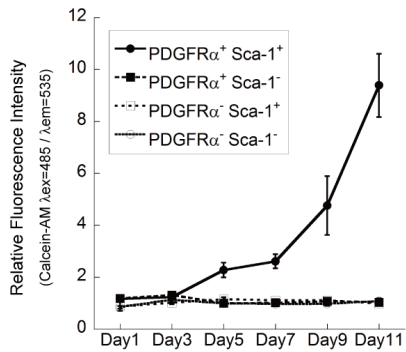


図3 DPSCの細胞増殖能。Sca-1、PDGFR α の発現により4分画された細胞についてそれぞれ増殖能を評価した。

*In vitro*での増殖後の細胞が幹細胞マーカーの発現を保持しているかどうかをFCMにより解析した。2週間の培養後であってもSca-1、PDGFR α の発現が保持されていることが示された (図4)。

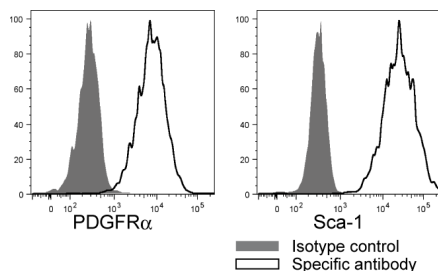


図4 2週間培養後のSca-1、PDGFR α 陽性細胞におけるSca-1、PDGFR α の発現。

歯髄由来のSca-1、PDGFR α 陽性細胞がMSCと同様の分化特性を保有しているかを調べた。分取後の細胞を*in vitro*で脂肪、骨、軟骨分化誘導を試みたところ、それぞれの分化マーカーの発現 (Fatty acid binding protein 4 (FABP4)、Osteopontin、2型コラーゲン (collagen II)) を示し、これらの細胞は間葉系幹細胞としての特性を持っていることが示唆された (図5)。

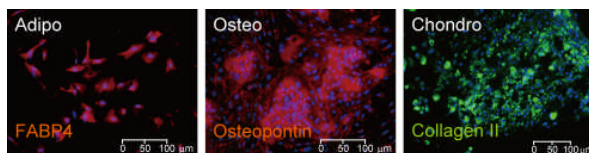


図5 Sca-1とPDGFR α 共陽性DPSCの骨・脂肪・軟骨分化能

マウス下顎切歯は常生歯形成端のcervical loop領域から供給される未分化細胞により生涯にわたり成長を続けるといわれている。単離した細胞が未分化性を有していることが示唆されたため、この細胞が切歯cervical loop領域に存在する可能性を蛍光免疫組織化学により確かめた。Sca-1、PDGFR α 共に陽性の細胞はcervical loop周囲に集合して存在していることが明らかとなった (図6)。

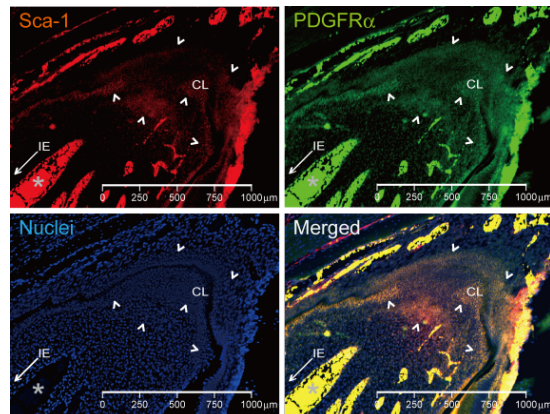


図6 マウス下顎切歯におけるSca-1、PDGFR α の免疫組織蛍光染色。

*In vivo*でのBrdU投与実験では、マウス下顎切歯由来Sca-1、PDGFR α 陽性細胞はBrdU強陽性であり、*in vivo*において高い増殖能を有していることが明らかになった (図7)。

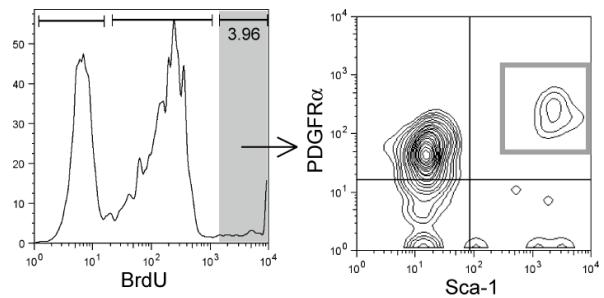


図7 BrdUを*in vivo*投与したマウスの切歯由来Sca-1、PDGFR α 陽性DPSCにおけるBrdU陽性細胞のFCM解析。

以上の結果から、Sca-1、PDGFR α 共陽性のDPSCがマウス切歯における幹細胞ニッチと考えられている常生歯形成端に存在し、高い増殖能、分化能を有することが示唆された。

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8件)

- ① Ishii M, Matsuoka Y, Sasaki Y, Nakatsuka R, Takahashi M, Nakamoto T, Yasuda K, Matsui K, Asano H, Uemura Y, Tsuji T, Fukuhara S, Sonoda Y. Development of a High Resolution Purification Method for Precise Functional Characterization of Primitive Human Cord Blood-derived CD34-negative SCID-repopulating Cells. *Experimental hematology*. 査読有, 39(2):203-213.e1, 2011.
- ② Kimura T, Kohno H, Matsuoka Y, Murakami M, Nakatsuka R, Hase M, Yasuda K, Uemura Y, Sasaki Y, Fukuhara S, Sonoda Y. CXCL8 enhances the angiogenic activity of umbilical cord blood-derived outgrowth endothelial cells in vitro. *Cell biology international*. 査読有, 35(3):201-208, 2011.
- ③ Kimura T, Kohno H, Matsuoka Y, Nakatsuka R, Sasaki Y, Fukuhara S, Sonoda Y. CD16 antigen is a positive marker of peripheral blood-derived early endothelial progenitor cells. *International journal of hematology*. 査読有, 2011(1):123-125, 2011.
- ④ Nakatsuka R, Nozaki T, Shinohara M, Ohura K. Dilazep Decreases Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide and TNF- α Synthesis in RAW 264 Cells. *Journal of pharmacological sciences*. 査読有, 113(3):271-275, 2010.
- ⑤ Nakatsuka R, Nozaki T, Uemura Y, Matsuoka Y, Sasaki Y, Shinohara M, Ohura K, Sonoda Y. 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment induces skeletal myogenic differentiation of mouse dental pulp stem cells. *Archives of Oral Biology*. 査読有, 55(5):350-357, 2010.
- ⑥ Kimura T, Matsuoka Y, Murakami M, Kimura T, Takahashi M, Nakamoto T, Yasuda K, Matsui K, Kobayashi K, Imai S, Asano H, Nakatsuka R, Uemura Y, Sasaki Y, Sonoda Y. In vivo dynamics of human cord blood-derived CD34(-) SCID-repopulating cells using intra-bone marrow injection. *Leukemia*. 査読有, 24(1):162-168, 2010.
- ⑦ Sasaki Y, Matsuoka Y, Hase M, Toyohara T, Murakami M, Takahashi M, Nakatsuka R, Uemura Y, Sonoda Y. Marginal expression of CXCR4 on c-kit+Sca-1+Lineage- hematopoietic stem/progenitor cells. *International Journal of Hematology*. 査読有, 90(5):553-560, 2009.
- ⑧ Uemura Y, Liu TY, Narita Y, Suzuki M, Nakatsuka R, Araki T, Matsumoto M, Iwai LK, Hirose N, Matsuoka Y, Murakami M, Kimura T, Hase M, Kohno H, Sasaki Y, Ichihara Y, Ishihara O, Kikuchi H, Sakamoto Y, Jiao SC, Senju S, Sonoda Y. Cytokine-dependent modification of IL-12p70 and IL-23 balance in dendritic cells by ligand activation of Valpha24 invariant NKT cells. *Journal of Immunology*. 査読有, 183(1):201-208, 2009.

〔学会発表〕(計4件)

- ① 中塚隆介、Prospective isolation of mouse Sca-1⁺PDGFR α ⁺ dental pulp stem cells (DPSCs) existing in the tooth forming niche. 第9回幹細胞シンポジウム、2010年5月13日、兵庫県、淡路夢舞台国際会議場
- ② 中塚隆介、Sca-1陽性、PDGFR α 陽性マウス歯髄幹細胞の予期的分取と特性の解析、第9回日本再生医療学会総会、2010年3月19日、広島県、広島国際会議場
- ③ 中塚隆介、Multipotent mouse Sca-1 and PDGFR α double positive DPSCs exist in the tooth forming niche. 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月12日、神奈川県、パシフィコ横浜
- ④ 中塚隆介、Prospective isolation of mouse Sca-1⁺PDGFR α ⁺ dental pulp stem cells (DPSCs) existing in the tooth forming niche. 第8回幹細胞シンポジウム、2009年5月15日、東京都、泉ガーデンギャラリー

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中塚 隆介 (NAKATSUKA RYUSUKE)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：90454561