

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21792072

研究課題名（和文） 幹細胞から象牙芽細胞、エナメル芽細胞分化の位置情報付与法の確立

研究課題名（英文） Exploring the way to make a correct induction from stem cells to odontoblast and ameloblasts.

研究代表者

黒坂 寛 (KUROSAKA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20509369

研究成果の概要（和文）：再構成歯胚の発生可能なステージは、再構成歯胚を作製する際の歯源性間葉細胞の数と ES 細胞の数の比率に大きな影響を受ける事を見出した。ラットの歯髄細胞を In vivo で象牙芽細胞へと分化させる方法を確立した。

研究成果の概要（英文）：We found that reconstructed artificial tooth can develop when proper cell ratio of mesenchymal cells and ES cells supplied. Also we found the way to induce odontoblasts from stem cells which exists in rat dental pulp.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |
| 2010 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：矯正・小児系歯学

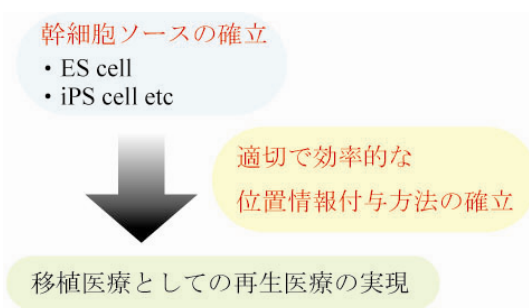
科研費の分科・細目：歯科・矯正・小児系歯学

1. 研究開始当初の背景

歯の再生治療は歯科矯正学のみならず歯科における最重要課題の一つである。皮膚等では幹細胞の移植による欠損部の再建も実際に臨床応用されつつあるが、単一細胞種か

らなる皮膚組織とは違い、上皮間葉相互作用で形成される歯の再生医療を実現する為には、より複雑かつ正確な幹細胞から分化細胞への誘導方法の確立が必要不可欠となる。現在、歯の再生医療分野において未分化な幹細胞

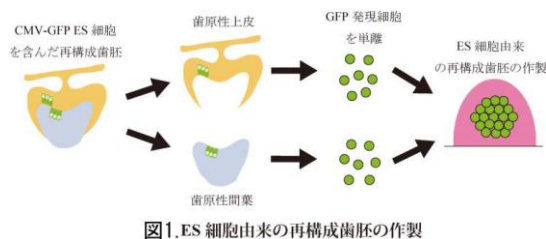
胞をエナメル芽細胞や象牙芽細胞に分化させる試みが数多くなされており、一定の成果を挙げている。しかしながら、その分化の指標は細胞分化マーカーに頼る部分が多く、形態学的、機能的な評価は少ない。また、近年 iPS 細胞を始めとした様々な幹細胞ソースの開発が進んでいるが、それぞれの幹細胞に対する適切な分化誘導方法は確立されていない場合が多い。



2. 研究の目的

歯の再生治療を実現させるに、未分化な幹細胞をエナメル芽細胞や象牙芽細胞といった歯の基質を産生する細胞へ効率的に分化させる方法を確立する事を目的とする。

また、最終的には単一細胞から一つの器官である歯を形成させる事を目的とする (図 1)



3. 研究の方法

既に Nakao らによって確立された、in vitro での歯胚再構成法 (Nakao et al. Nat Methods. 2007 Mar;4(3):227-30.) を用いて実験を行った。胎生 14.5 日のマウス胎児の

下顎第一大臼歯を摘出後、ディスパーゼを用いて歯原性上皮と間葉に分離し、単一細胞レベルまで解離し、専用の細胞培養皿にて再構成を行う。その際、CMV プロモーター下で GFP を発現している ES 細胞を歯原性間葉または歯原性上皮に混合し、再構成歯胚を作製した。その後、再構成歯胚に取り込まれた、ES 細胞の 3 次元的な形態解析を共焦点レーザー顕微鏡で行った。

4. 研究成果

ES 細胞を撒種した再構成歯胚の発生可能なステージは、再構成歯胚を作製する際の歯原性間葉細胞の数と ES 細胞の数の比率に大きな影響を受ける事を見出した。具体的には歯原性間葉細胞 10^6 個に対して、ES 細胞 2000 個以下であれば成熟した再構成歯胚が発生するが、ES 細胞がそれ以上であると再構成歯胚の発生が途中で停止してしまう事が解った (図 2 白破線が発生した再構成歯胚)。しかし、成熟した再構成歯胚においても ES 細胞が象牙質やエナメル質に分化している像は認められなかった。そこで、現在は ES 細胞の様な完全に未分化な細胞 (胚性幹細胞) ではなく、歯髓等に存在するある程度分化した体性幹細胞を象牙芽細胞に分化させる新たな試みを始めており、過去の我々の研究で象牙芽細胞の分化誘導に重要な役割を果たす事が解っている、Wnt signaling を人工的にラット歯髓の幹細胞において亢進させることにより、象牙質新生を促進する事に成功している (図 3 白破線が象牙質、赤破線が再生象牙質)

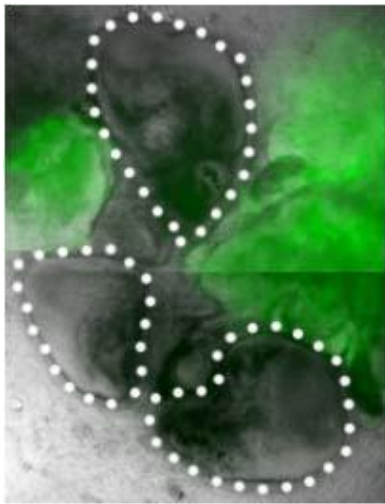


図2 再構成歯胚

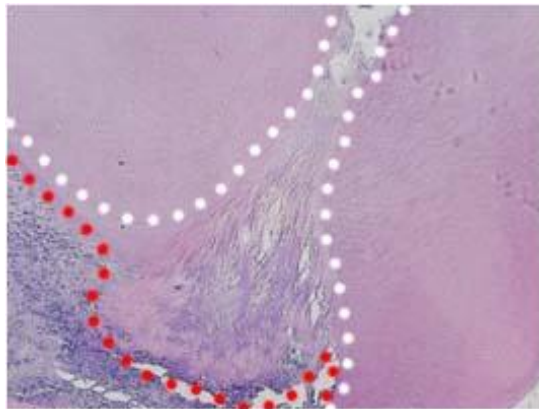


図3 誘導された象牙質

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 1 件)

- ① Kawanabe N, Murata S, Murakami K, Ishihara Y, Hayano S, Kurosaka H, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. **Differentiation**. 2010 Feb;79(2):74-83. Epub 2009 Nov 27

〔学会発表〕 (計 4 件)

- ① Hiroshi Kurosaka, Satoru Hayano, Koh-ichi Kuremoto, Hidemitsu Harada, Islam Nurul, Ichiro Taniuchi and Takashi Yamashiro. Exploring the roles of core-binding factor β (CBFB) in tooth development and ameloblast physiology. The 17th international RUNX workshop (Hiroshima, Japan) July11-14. 2010
- ② Hiroshi Kurosaka, Satoru Hayano, Koh-ichi Kuremoto, Hidemitsu Harada, Islam Nurul, Ichiro Taniuchi and Takashi Yamashiro. Exploring the roles of core-binding factor β (CBFB) in tooth development and ameloblast physiology. Gordon conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration (Lucca, Barga) April 11-16, 2010.
- ③ Satoru Hayano, Hiroshi Kurosaka, Ina Kalus, Thomas Dierks, Takashi Yamashiro. The role of heparan sulfate 6-O-endosulfatases Sulf1 and Sulf2 during tooth development. Gordon conference Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration (Lucca, Barga) April 11-16, 2010.
- ④ Satoru Hayano, Hiroshi Kurosaka, Ina Kalus, Thomas Dierks, Takashi

Yamashiro. The role of heparan sulfate
6-O-endosulfatases Sulf1 and Sulf2
during tooth development Gordon
conference Bones & Teeth. (Biddeford,
ME) July 12-17, 2009

○出願状況 (計 1 件)

名称：歯髄細胞から象牙芽細胞への分化誘導
方法

発明者：山城 隆、川邊 紀章、黒坂 寛

権利者：同上

種類：特願 2009

番号：262378

出願年月日：2009. 11. 17

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒坂 寛 (KUROSAKA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20509369

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし