

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K21055

研究課題名（和文）レポーター遺伝子導入マウスを用いた間葉系幹細胞の由来の違いによる歯胚再生能力解明

研究課題名（英文）Comparative odontogenic potential of mesenchymal stem cells derived from different origins

研究代表者

大堀 悠美 (Ohori, Yumi)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：70908441

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は天然歯と同等の構造・機能回復を目指す歯胚再生療法の確立を目的とし、成体から採取する骨髄由来間葉系幹細胞（BMSC）を用いた歯胚再生を試みた。当研究グループが開発した浮遊振盪培養法で形成した特殊な三次元MSC細胞塊（スフェア）は、歯胚再生実験にて一部歯胚様構造を認めたことから、歯胚再生能力があることを報告した。次に神経堤由来BMSCとそれ以外のBMSCを用いて細胞の発生由来の違いが歯胚再生能力解明へ与える影響の解析を試みたが、同様の方法ではスフェア形成が困難であった。静置条件下での浮遊培養でのスフェアは形成できたことから、今後はこの新しいスフェアを用いて実験を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯胚を形成する歯原性細胞は胎生期にのみ存在し、歯胚再生に利用することは倫理的に困難なため、成体幹細胞の応用が求められている。しかしながらBMSCを用いた歯胚再生は再生効率が低いことが課題となっていた。当研究グループが開発したMSCスフェアは、従来の培養法よりも神経堤様の性質が高い神経堤様MSCスフェアであることから、神経堤由来細胞である歯原性細胞としての能力が向上し、歯胚再生効率が向上するとの仮説を立てた。本研究では再生効率向上までは実現できなかったがMSCスフェアの歯胚再生能力を示したことにより、歯胚再生療法確立へ一歩前進した。

研究成果の概要（英文）： This study aimed to establish a tooth regeneration method using adult stem cells. Our group developed a novel shaking culture method to fabricate bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMSC) spheroids with neural crest stem cell phenotype (Neu-sph). Since dental mesenchyme is derived from the neural crest, we hypothesized that Neu-sph would enhance the odontogenic potential of BMSCs. They showed the presence of tooth structures when associated with dental epithelium. However, the regeneration efficiency was less than expected, indicating the need to optimize the culture method in the future study. We attempted to isolate neural crest-derived BMSCs from PO-cre/CAG-CAT-EGFP mice, which label neural crest cell lineages, and compare their odontogenic potential with conventional BMSCs. However, we failed to generate Neu-sph from these cells. Thus, we fabricated neural crest-derived Neu-sph by modifying the culture method, and will proceed with our experiments using these new spheroids.

研究分野：歯科再生医療

キーワード：歯胚再生 間葉系幹細胞（MSC） 神経堤 器官原基法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、天然歯と同等の構造・機能回復を目指す歯胚再生療法が歯の欠損に対する新たな治療法として注目されている。歯胚は、歯原性上皮と歯原性間葉という2つの組織の相互作用により形成される。この細胞は胎生期にのみ存在するため、歯胚再生に利用することは倫理的に困難であった。成体から採取した幹細胞を用いた歯胚再生が試みられたが、その一つである骨髄間葉系幹細胞(BMSC)は歯胚再生効率が低いことが課題となっている。一方でBMSCは古くから採取方法が確立しており、様々な疾患に対する幹細胞療法に用いられている汎用性が高い細胞であることから、当研究グループはBMSCを用いた歯胚再生の効率化を目指した。当研究グループはBMSCを一定条件下で浮遊培養することにより、従来の培養法よりも神経堤様の性質が高い神経堤様MSC細胞塊(スフェア)の形成に成功している。歯原性間葉が神経堤由来の細胞であることから、神経堤様MSCスフェアが従来のBMSCよりも歯胚形成効率が向上するとの仮説を立てた。

さらに、発生由来が歯胚再生に与える影響を解析するため、神経堤由来細胞を永続的にトレース可能なP0-cre/CAG-CAT-EGFPマウスを用いた。このマウスからP0陽性神経堤由来BMSCを分取することで、歯原性間葉と発生を同じくする神経堤由来BMSCを用いた歯胚再生効率の向上を期待し、実験を行った。

2. 研究の目的

本研究は、浮遊振盪培養法で形成した神経堤様MSCスフェアを応用し、歯胚再生効率の向上を目指した。さらにP0-cre/CAG-CAT-EGFPマウスから採取した発生由来が明らかな神経堤由来BMSCを解析することで、細胞の発生由来が歯胚再生能力に及ぼす影響を明らかにし、効率的な歯胚再生法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経堤様MSCスフェアを用いた歯胚再生実験

マウス由来BMSCを浮遊振盪下にて培養することにより、神経堤様MSCスフェアを形成した。歯胚再生実験は器官原基を再構築する「器官原基法」を応用した。従来の歯胚再生の器官原基法は、マウス胎仔から歯原性上皮と歯原性間葉をそれぞれ採取し、人為的に再結合させることで歯胚再生を実現している。本研究では、胎生14日のマウス胎仔から歯原性上皮を採取し、神経堤様MSCスフェアと結合し、コラーゲンゲル内で三次元的に培養することで、BMSCスフェアの歯原性間葉としての能力を明らかにした。

(2) P0-cre/CAG-CAT-EGFPマウスを用いた歯胚再生実験

神経堤由来細胞が蛍光発光するP0-cre/CAG-CAT-EGFPマウスを用いて、神経堤由来BMSCを採取した。マウス四肢骨髄から細胞を採取し、蛍光細胞を分取するフローサイトメーター(FACS)を用いて蛍光発色するP0陽性神経堤由来BMSCとそれ以外のP0陰性BMSCを分取した(実験1)と同様の条件でそれぞれの細胞を浮遊振盪培養にて神経堤様MSCスフェアの形成を試み、由来が異なるBMSCが歯胚再生に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 神経堤様MSCスフェアを用いた歯胚再生

マウス由来BMSCを用いて浮遊振盪培養を行い、神経堤様MSCスフェアを形成した。形成されたスフェアは直径800~1500µmであり、接着培養にて培養したBMSCよりも神経堤の遺伝子マーカー*nestin*などが高発現していた。さらに分化能解析で、神経系細胞への分化はスフェアで亢進していたことから、形成したMSCスフェアは神経堤様の性質を呈していることが示唆された。形成した神経堤様MSCスフェアとマウス胎仔から採取した歯原性上皮を結合させ、歯胚再生を試みた。形態学的解析による組織染色では、角化組織や毛包様構造を認めた一方、一部で歯胚様構造を呈していたことから、神経堤様MSCスフェアは歯原性間葉としての性質を有することが示唆された。しかしながら歯胚再生効率は想定よりも向上しなかったため、今後は培養条件の検討と培養法の改良を行う予定である。

(2) P0-cre/CAG-CAT-EGFPマウス由来BMSCを用いた神経堤様MSCスフェアの形成

蛍光に発色することで神経堤由来細胞を追跡可能なP0-cre/CAG-CAT-EGFPマウスからBMSCを採取し、浮遊振盪培養による神経堤様MSCスフェア形成を試みた。蛍光発色するP0陽性神経堤

由来 BMSC は骨髄細胞中の 0.01% 以下しか存在していなかったため、FACS による蛍光細胞分取の後接着培養にて増殖させ、一定数の細胞数が得られるようになるまで 3 継代が必要となった。これらの細胞を浮遊振盪培養にてスフェア形成を試みたが、スフェア形成を認めなかった。本実験は FACS で細胞を分取するため、分取した際の圧力などによる細胞ダメージも看過できない。事実、分取した細胞は一部死滅しており、さらに従来使用していた市販の MSC と比較して分取した MSC の細胞増殖スピードは劣っていた。この違いが今までの実験で実現していた浮遊振盪培養によるスフェア形成が失敗した原因であると考えられる。一方で、振盪刺激を与えない静置状態というマイルドな環境で浮遊培養を行ったところ、細胞のスフェア形成を認めた。今後の実験ではこの静置状態のスフェアも神経堤様の性質を呈するのかを解析し、さらに歯胚再生実験へ応用することで、歯胚再生における細胞起源が与える影響を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大堀悠美, 新部邦透, 江草 宏
2. 発表標題 新規振盪培養法により作製したマウス骨髄由来神経堤様細胞塊の性状解析
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------