

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592875

研究課題名(和文) バイオ再生歯実現への優れたエナメル質形成幹細胞を獲得する

研究課題名(英文) Acquisition of amelogenic stem/progenitor cells for bio-engineered tooth

研究代表者

呉本 晃一 (Kuremoto, Koh-ichi)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：90319583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はバイオ再生歯実現への優れたエナメル質形成幹細胞を獲得することを目的として、エナメル質を作り出すヒト口腔上皮由来幹細胞(DESCs)の単離・培養についての探索、DESCsの分化を誘導するシグナル分子の解明を行った。

本課題の結果から、口腔上皮由来幹細胞の単離は、酵素分解法が有用であり、培養には、コラーゲンIを培養皿にコーティングし、培地は、MCDB153培地にEGFを添加することが最適であることが明らかとなった。しかしながら、長期間、大量培養を行うことは困難であることも明らかとなった。今後、培養環境のさらなる検討が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to acquire the amelogenic stem/progenitor cells for the bio-engineered tooth regeneration. This study might be the basis for the study of enamel regeneration using the dental epithelial stem cells (DESCs) and contribute greatly to the development and clinical application of the bio-engineered tooth.

We used rodent incisors which regenerate throughout the animal lifetime as a result of the continuous deposition of enamel by ameloblasts. Putative dental epithelial stem cells (DESCs) were isolated from the base of the incisors in a structure called the cervical loop (CL). We demonstrated that the enzyme dissociation method was quite helpful in the isolation of DESCs from the CL and collagen I coating on the surface of the culture plate and MCDB153 medium with mEGF were quite useful for DESCs culture.

In the future, it will be important to further characterize DESCs for the optimum culture condition.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：口腔上皮 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞の発見以来、国民の再生医療に対する関心と要望は非常に高い。従来の歯科医療では、歯周組織再生療法やインプラント治療が日常の歯科臨床の場で多く取り入れられて久しい。しかし両治療法とも、他家由来のタンパク質や、無機物の材料を利用するために、失われた歯や歯周組織による機能を完全に回復させるまでには至っていない。

マウスでは胎仔未分化の幹細胞を用いて歯全体を組織工学的に再生する方法が報告され^{1,2)}、バイオ再生歯実現へ大きく歩み出している。既にヒト歯髄/歯根膜由来組織幹細胞を用いた象牙質・歯髄・セメント質・歯根膜再生が技術的に可能となっている³⁻⁵⁾。

2. 研究の目的

エナメル質を作り出すヒト口腔上皮由来幹細胞 (Dental Epithelial Stem Cells; 以下 DESCs) に関する研究成果は、国外・国内問わず未だ報告されていない。バイオ再生歯を実現させるためには、DESCs の単離・培養についての詳細な探索、DESCs の分化を誘導するシグナル分子の解明は、必要不可欠である。そこで本研究は、バイオ再生歯実現への優れたエナメル質形成幹細胞を獲得することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究には、口腔上皮特異的に遺伝子を発現するマウス (K14Cre マウス)^{6, 7)}を用いた。

(1) DESCs の単離・培養の検討

実験モデル作製

K14Cre マウスと R26R マウスを交配させ、口腔上皮特異的に β -galactosidase 活性が発現する [K14CrexR26R] マウスを作製した。

DESCs の単離法の検討

マウスの切歯は生涯を通して伸長を継続する。切歯先端部には cervical loop と呼ばれる DESCs を存在・保持し続ける組織塊が存在する (Fig.1)。

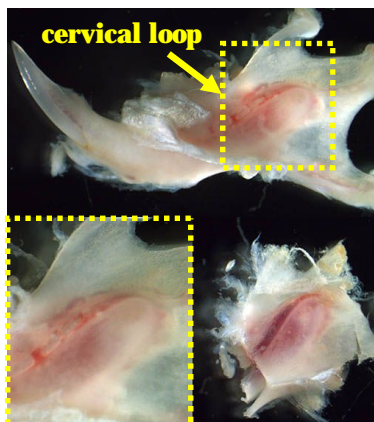


Fig.1 マウス下顎切歯の cervical loop

DESCs は、4 週齢の [K14CrexR26R] マウスの下顎切歯 cervical loop から採取した。

DESCs の単離は、outgrowth 法と酵素分解法の 2 種類を試みた。outgrowth 法では、顕微鏡下で、cervical loop を採取し、培養皿に付着させ培養を行った。酵素分解法では、outgrowth 法と同様に、cervical loop を採取し、0.04% trypsin (Sigma)を用いて、室温下で一晩、酵素処理し、DESCs を単離した⁸⁾。上皮由来の細胞については、LacZ 染色によって確認した。

DESCs の培養条件

DESCs の培養は、岡本ら⁹⁾、佐藤ら¹⁰⁾の方法を参考に、培養皿にはコラーゲン I コーティング (Cellmatrix、新田ゼラチン) を施した。培地は、MCDB153 培地に N2 supplement (Invitrogen)、B27 supplement (Invitrogen)、オレイン酸を添加した。Growth Factor として、mEGF と mFGF (Invitrogen)、2 種類を添加する条件を設定し、増殖能を検討した。

(2) DESCs 分化を誘導するシグナル分子の探索

これまでの研究において、FGFR2b シグナルノックダウンは、cervical loop に存在する DESCs のエナメル芽細胞への分化を抑制するものの、DESCs の生存・維持には影響しないことを明らかにした¹¹⁾。そこで、本研究において、DESCs からエナメル芽細胞への分化過程における、さらなる分子機構を解明するために、FGFR2b シグナルの下流遺伝子とされる core-binding factor (Cbfb) 遺伝子を口腔上皮由来組織においてノックアウトした変異マウス [K14Cre x Cbfb^{lox/lox}] を作製、解析を行った。

変異マウスとコントロールマウスの Micro CT 撮影を行い硬組織の形態比較を行った。また、両マウスの組織切片を作製し、歯の形態比較及び細胞増殖数の比較を行った。さらに、in situ hybridization 法を用いてそれぞれのマウスの歯胚発生時における遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) DESCs の単離・培養法の最適化

DESCs の単離法は、酵素分解法が有効であることが明らかとなった。これは、outgrowth 法では、培養細胞が、mix population となり、口腔上皮由来の DESCs のみを単離することは不可能であった。これに対し、酵素分解法では、播種した細胞は、単一細胞 (Fig.2) に由来する細胞集団 (コロニー) を形成し、幹細胞の特性が確認された (Fig.3)。

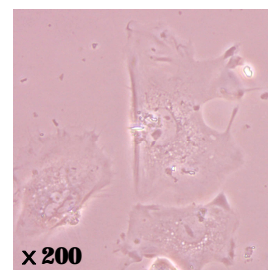


Fig.2 DESC の単一細胞

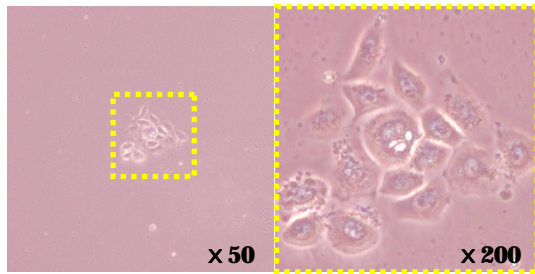


Fig.3 DESC の単一細胞に由来するコロニー

成長因子が DESCs 増殖能に及ぼす影響については、EGF 添加が、FGF 添加に比べて、細胞増殖能が向上すると考えられたが、コロニー形成解析では有意な差は認められなかった。DESCs は、本研究で最適化された培養法を用いることで、初代培養が行えることが明らかとなったが、その特徴・特性を幹細胞学的に検討するための、継代培養による長期間・大量培養を行うことは、現段階では困難であることも明らかとなった。今後、さらなる培養環境の検討(培養条件、成長因子など)の検討が必要であることが示唆された。

(2) DESCs 分化への FGF シグナルによる影響

Micro CT の所見から変異マウスの切歯では著しい歯根の短小化が認められた。また、組織切片より、変異マウスの切歯のエナメル芽細胞は極性が消失しており、cervical loop 部における増殖細胞は著しく減少していた。さらに、変異マウス切歯ではエナメル質分化マーカー及び、幹細胞増殖、維持に必要な Fgf3 及び Fgf10 の発現が減少していた。以上のことから、DESCs における Cbfb は Fgf シグナリングを介して、切歯の伸長及びエナメル質分化に非常に重要な役割を果たしている事が示唆された (Fig. 4)。

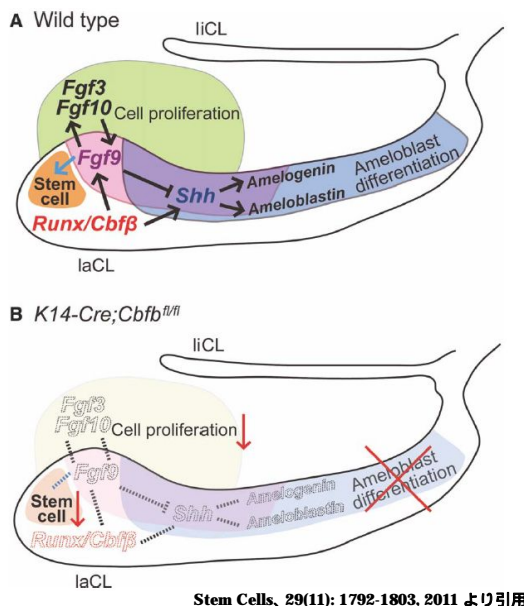


Fig.4 DESC における FGF シグナルの役割

今後、DESCs の培養環境を最適化し、幹細胞学的検討を加えることによる、DESCs マーカーの同定、DESCs を分化誘導するシグナル分子の更なる探索は、口腔上皮由来幹細胞を利用したエナメル質再生の基盤となり、バイオ再生歯の開発 / 臨床応用に多大な貢献をもたらすと考えられる。

<参考文献>

1. Nakao K et al. Nature Methods. 4, 227-130, 2007.
2. Ikeda E et al. PNAS 106(32):13475-13480, 2009.
3. Gronthos S et al. PNAS 5;97(25):13625-30, 2000.
4. Seo B-M et al. The Lancet 364:149-155, 2004.
5. Sonoyama W et al. PLoS ONE 1:e79, 2006.
6. Andl T et al. Development 131(10):2257-68, 2004.
7. Xu X et al. Dev. Cell.15(2):322-9, 2008.
8. Izumi T et al. J Dent Res 86(4):341-346, 2007.
9. Okamoto T et al. Tiss. Cult. Res. Commun.23:149-158, 2004.
10. Sao T et al. Nature 459: 262-265, 2009.
11. Parsa S, Kuremoto K et al. Development 137, 3743-3752, 2010.

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. Makino Y, 他 9 名, Yamaza T 10 番目、Immune Therapeutic Potential of Stem Cells from Human Supernumerary Teeth. J Dent Res、査読有、92(7):609-15, 2013. doi: 10.1177/0022034513490732.
2. Ma L, 他 9 名, Yamaza T 10 番目、Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. PLoS One、査読有、7:e51777, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0051777.
3. Kurosaka H, Islam MN, Kuremoto K 他、Core binding factor beta functions in the maintenance of stem cells and orchestrates continuous proliferation and differentiation in mouse incisors. Stem Cells、査読有、29(11): 1792-1803, 2011. doi: 10.1002/stem.722.

〔学会発表〕(計7件)

1. Kaga K, Sekino T, Nishida H, Honda Y, Kuremoto K 他、
Nano-architecture Formation on the Surface of Ti based Metals by Solution Chemical Processing、
The 5th International Symposium Functional Materials、
2012年12月20日(Perth, Australia).
2. 呉本晃一 他、
インプラントを併用した新しい部分床義歯治療のための支台装置の開発、
第22回日本歯科医学会総会、
2012年11月10日(大阪市).
3. 加賀晃樹, 関野 徹, 田中俊一郎, 西田尚敬, 呉本晃二、
溶液化学反応場による Ti 合金表面の低次元酸化物ナノ構造の形成、
日本セラミックス協会 第25回秋季シンポジウム、
2012年9月20日(名古屋市).
4. Sekino T, Kaga K, Nishida H, Kuremoto K 他、
Low-dimensional Oxide Nanostructures Formation on Metal Surface via Low-temperature Eco-processing、
International Union of Materials Research Society-International Conference in Asia、
2012年8月29日(Busan, South Korea).
5. 加賀晃樹, 関野 徹, 西田尚敬, 呉本晃二 他、
常温での溶液化学反応場による金属表面の低次元ナノ構造構築、
社団法人 日本金属学会 2012年春期(第150回)大会、
2012年3月29日(横浜市).
6. 加賀晃樹, 関野 徹, 西田尚敬, 呉本晃二 他、
常温での溶液化学反応場による Ti 合金表面の低次元ナノ構造構築、
公益社団法人日本セラミックス協会 2012年年会、
2012年3月21日(京都市).
7. 呉本晃一 他、
線維芽細胞増殖因子が口腔上皮由来幹細胞の機能と分化を制御する、
日本補綴歯科学会第120回記念学術大会、
2011年5月22日(広島市).

〔図書〕(計1件)

呉本晃一 他、
インプラントを併用した新しい部分床義歯治療のための支台装置の開発、
医歯薬出版株式会社(東京) 歯界展望、
2013 特別号, 282, 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者

呉本 晃一 (KUREMOTO KOH-ICHI)
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：90319583

(2) 研究分担者

(3)連携研究者

山座 孝義 (YAMAZA TAKAYOSHI)
九州大学・歯学研究院・講師
研究者番号：80304814