

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659918

研究課題名（和文） 歯科再生工学のための無血清培養液の開発

研究課題名（英文） Serum-free medium for dental regenerative tissue engineering

研究代表者 加藤 幸夫 (KATO YUKIO)
広島大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10112062

研究成果の概要（和文）：

歯の再生工学には、歯上皮細胞と歯間葉系細胞の体外増幅と分化能の亢進が必要である。そこで、無血清培養液の開発を目指して実験を重ねた結果、無血清での歯科再生学の進展に有用な知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

Ex vivo expansion and differentiation of dental epithelial cells and dental mesenchymal cells are required for tooth regeneration. We developed serum-free medium of dental pulp cells, and this many facillital development of dental tissue engineering.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：血清、幹細胞、無血清培地、歯、再生

1. 研究開始当初の背景

マウス歯胚より分離した上皮と間葉系細胞の凝集塊を短期間培養した後に、抜歯部に移植すると機能的な歯が形成された (Ikeda-E et al. PNAS 2009)。しかし、少数の細胞を大量増幅して機能的な歯 (bio-tooth) をつくる再生医療技術には至っていない。

本研究では、1) 無血清培養液 2) 上皮-間葉相互作用を利用して、少数の細胞から bio-tooth をつくるための基礎となる培養技術を築く。1) 血清は多数の物質を含み

不安定であるため、実験結果（増殖、分化）がバラツキやすい。さらに血清中には増殖抑制因子や蛋白分解酵素が存在する。また血清は、病原体を含みうるので、無血清培養液の開発が必要である。2) 歯の発生での上皮：間葉系相互作用についてはすでに多くの研究がある (Tummers&Thesleff J Exp Zool 310B. 2009)。これらの成果を無血清培養液に利用する。

2. 研究の目的

エナメル上皮細胞と歯髄間葉系細胞を効率良く増殖／分化させる新培養液を開発す

る。我々はすでに、ヒト骨髄間葉系幹細胞の増殖／分化用の各種無血清培養液（STK1-4）を開発しているため、無血清培養液開発の経験やSTK成分を活用して、歯由来細胞用の無血清培養液を作製できる。さらにエナメル上皮細胞と歯髄間葉系細胞の無血清のconditioned mediumを使用するので互いの分化を著しく促進できる。上皮-間葉相互作用を組み込んだ無血清培養液の開発により、歯由来細胞の増殖／分化能を従来法に比べて格段に高める。

3. 研究の方法

[1] ヒト歯髄細胞の石灰化誘導培地

無血清上皮-CMを基礎無血清培養液に添加して分化、歯髄石灰化への影響を検討する（alizarin red 染色、alkaline phosphatase/DSPPなどの定量的RT-PCR）。またDNA microarray（Affimetrix社）や成長因子抗体などを用いて、上皮-CM中の石灰化促進因子の同定を試みる。

ヒト歯髄細胞の石灰化を促進する低分子化合物と成長因子をスクリーニングする。

[2] ヒト歯髄細胞の増殖培地

STK2を基本にして組成を一部変更し、ヒト歯髄細胞の増殖に最適な組成とする。

[3] エナメル上皮細胞の石灰化誘導培地

無血清歯髄-CMの影響を検討する（alizarin red 染色法、amelogeninなどの定量的RT-PCR）。またDNA microarrayや成長因子抗体などを用いて、歯髄-CM中の石灰化促進因子の同定を試みる。

[4] エナメル上皮細胞の増殖用無血清培養液 STK共通成分を基本組成とする。また上皮細胞に有効な成長因子を追加する。さらに低カルシウム濃度(0.2 mM)とする。

4. 研究成果

・ヒト歯髄幹細胞をoutgrowth法あるいは

コラゲナーゼ法にて分離して無血清培地で培養した。初代はSTK1が、植え継ぎ後はSTK2が10%血清培地よりも増殖を促進した。さらにSTK2で増幅したヒト歯髄幹細胞は従来法よりも高い石灰化能を示した（Fujii-S, Kato-Y.投稿準備中-A）。

・ヒト歯髄幹細胞をヒトMSCの石灰化を促進するSTK3とインキュベートしたが、石灰化を誘導しなかった。現在、各種追加因子の影響を検討している。

・ヒト歯髄幹細胞のマーカー遺伝子を明らかにした。これらのマーカー遺伝子は線維芽細胞、歯根膜細胞、間葉系幹細胞で発現せず、無血清培地で増幅した歯髄幹細胞で発現していた（Fujii-S, Kato-Y.投稿準備中-B）。

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 10 件）

- ① Wu Y, Sato F, Sato H, Jin D, Bhawal UK, Wu Y, Noshiro M, Kawamoto T, Fujimoto K, Seino H, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. BHLH transcription factor DEC2 regulates pro-apoptotic factor Bim in human oral cancer HSC-3 cells. Biomedical Research, 33(2), in press 2012. 査読あり
- ② Sato F, Sato H, Jin D, Bhawal UK, Wu Y, Noshiro M, Kawamoto T, Fujimoto K, Seino H, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. Smad3 and Snail show circadian expression in human gingival fibroblasts, human mesenchymal stem cell, and in mouse liver Corresponding. BBRC, 2012 Mar 9;419(2):441-6. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.076 査読あり

- ③ Yokoi M, Hattori K, Narikawa K, Ohgushi H, Tadokoro M, Hoshi K, Takato T, Myoui A, Nanno K, Kato Y, Kanawa M, Sugawara K, Kobo T, Ushida T. Feasibility and limitations of the round robin test for assessment of in vitro chondrogenesis evaluation protocol in a tissue-engineered medical product. *J Tissue Eng Regen Med.*, Article first published online: 2 AUG 2011. DOI: 10.1002/term.460 査読あり
- ④ Ozaki N, Noshiro M, Kawamoto T, Nakashima A, Honda K, Fukuzaki-Dohi U, Honma S, Fujimoto K, Tanimoto K, Tanne K, Kato Y. Regulation of basic helix-loop-helix transcription factors Dec1 and Dec2 by ROR α and their roles in adipogenesis(+). *Genes to Cells.* 17,109-121,2012. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01574.x 査読あり
- ⑤ Kawai T, Anada T, Masuda T, Honda Y., Sakai Y., Kato Y., Kamakura S., Echigo S., Suzuki O. The effect of synthetic octacalcium phosphate in a collagen scaffold on the osteogenicity of mesenchymal stem cells. *European Cells and Materials*, 22,124-136,2011. DOI: なし 査読あり
- ⑥ Suehiro F, Nishimura M, Kawamoto T, Kanawa M, Yoshizawa Y, Murata H, Kato Y. Impact of Zinc Fingers and Homeoboxes 3 (ZHX3) on the Regulation of Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation. *Stem Cells Dev.* Sep;20(9):1539-47,2011. DOI: 10.1089/scd.2010.0279 査読あり
- ⑦ Kaku M, Tai M, Kawata T, Fujita T, Motokawa M, Ohtani J, Sakai Y, Kato Y, Tanne K. Mesenchymal stem cell-induced cranial suture-like gap in rats. *Plast Reconstr Surg.* 2011 Jan;127(1):69-77. DOI: 10.1097/PRS.0b013e3181f95849 査読あり
- ⑧ Sato F, Wu Y, Bhawal UK, Liu Y, Imaizumi T, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. PERIOD1 (PER1) has anti-apoptotic effects, and PER3 has pro-apoptotic effects during cisplatin (CDDP) treatment in human gingival cancer CA9-22 cells. *Eur J Cancer.* 2011 Jul;47(11):1747-58. DOI :10.1016/j.ejca.2011.02.025 査読あり
- ⑨ Wu Y, Sato F, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Morohashi S, Kato Y, Kijima H. Basic helix-loop-helix transcription factors DEC1 and DEC2 regulate the paclitaxel-induced apoptotic pathway of MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Mol Med.* 2011 Apr;27(4):491-5. Doi: 10.3892/ijmm.2011.617 査読あり
- ⑩ Bhawal UK, Sato F, Arakawa Y, Fujimoto K, Kawamoto T, Tanimoto K, Ito Y, Sasahira T, Sakurai T, Kobayashi M, Kashima I, Kijima H, Kuniyasu H, Abiko Y, Kato Y, Sato S. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 negatively regulates cyclin D1. *J Pathol.* 2011 Jul;224(3):420-9. DOI: 10.1002/path.2878 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- ① Yukio Kato Serum-Free Cultures for

Human Mesenchymal Stem Cells using Defined Culture Surfaces. 1st Meeting of Surabaya Regenerative Medicine and Stem Cell Centre (SRMSC), 2nd Meeting of Indonesia Association of Tissue Bank (IATB), SYMPOSIUM, Sep.22-23, 2011, Surabaya, Indonesia

- ② 鎌田浩一、藤本勝巳、西村正宏、末廣史雄、貞森紳丞、赤川安正、加藤幸夫 細胞表面抗原を指標とした口腔内からの骨前駆細胞の分取 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 2011 年 5 月 13～14 日 広島市
- ③ 笹本智子、藤本勝巳、金輪真佐美、河本健、能城光秀、道田将彦、尾崎徳継、丹根一夫、加藤幸夫 間葉系幹細胞の軟骨分化における DEC2 の役割 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 2011 年 5 月 13～14 日 広島市
- ④ 道田将彦、河本健、能城光秀、藤本勝巳、金輪真佐美、尾崎徳継、笹本智子、丹根一夫、加藤幸夫 間葉系幹細胞の増殖・分化ならびにインテグリン発現に対する転写因子 GATA6 の作用 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 2011 年 5 月 13～14 日 広島市
- ⑤ 尾崎徳継、能城光秀、河本健、福崎麗、藤本勝巳、丹根一夫、加藤幸夫 核内受容体 ROR α による時計遺伝子 DEC1,DEC2 の発現調節と脂肪分化 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会 2011 年 5 月 13～14 日 広島市

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：動物細胞培養キット、動物細胞の培養方法及び動物細胞の選択培養方法
発明者：加藤幸夫、平田伊佐雄、金輪真佐美

権利者：広島大学

種類：特許

番号：特願 2011-084119

出願年月日：平成 23 年 4 月 5 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：間葉系幹細胞の均質性識別方法、その方法を利用して得られる均質間葉系幹細胞
発明者：加藤幸夫、金輪真佐美、五十嵐晃、原真依子、辻紘一郎

権利者：広島大学、(株) ツーセル

種類：特許

番号：特許第 4958094 号

取得年月日：平成 24 年 3 月 30 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 幸夫 (KATO YUKIO)

広島大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10112062

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：