

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792299

研究課題名(和文) マイクロインジェクション法を応用した歯の形態誘導プロトコルの確立

研究課題名(英文) Development of microinjection method of forming at initiation stage of tooth.

研究代表者

筒井 健夫 (Tsutsui, Takeo)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：70366764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロインジェクションによるタンパク導入を行うため、歯髄幹細胞と口腔粘膜上皮幹細胞を細胞シートとして温度応答性培養皿から分離し、コラーゲンを添加し凝固しておいた培養用ディッシュ上で3次元培養を行った。タンパクの注入は積層培養部位を切り出し、オリエンテーションを変えて行った。組織学的検査では、口腔粘膜上皮幹細胞より作製した細胞シートの基底細胞層に細胞の集積が見られ、歯髄幹細胞との間に上皮細胞の侵入様組織像が観察された。当該課題で研究した歯髄幹細胞と口腔粘膜上皮細胞の3次元培養法により、上皮系細胞と間葉系細胞における相互作用が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dental pulp stem cells and oral epithelial stem cells cultured in temperature dependent dish for form cell sheet. The cell sheets removed to collagen gel on culture dish for a three dimensional culture. Three dimensional culture prepared for microinjection. Histological analysis showed cells accumulation on basal cells layer of oral epithelial cells. The cells accumulation occurred contacted with dental pulp stem cells that observed epithelial cells invasion-like histology. Three dimensional culture method of dental pulp stem cells and oral epithelial cells may indicated that interaction of epithelial cells and mesenchymal cells.

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 マイクロインジェクション 口腔粘膜上皮

1. 研究開始当初の背景

本研究は、マイクロインジェクション法によるタンパク導入により、歯の形態誘導が可能であるという仮説をたて、(1) 歯の形態誘導のためには、口腔粘膜上皮幹細胞を温度応答性培養皿に播種後、細胞シートを構成し、また歯髄幹細胞はコラーゲンゲル内で培養を行い、細胞シートとコラーゲンゲルを重ねた三次元培養システムを構築する必要がある。(2) 上皮陥入の誘導は、歯胚上皮細胞へ歯の発生期に重要な Shh を蛍光標識タンパクとして導入し、歯の形態形成を誘導する。歯の形態誘導プロトコールはこれらの解析より樹立する。

マイクロインジェクション法を用いた上皮細胞の形態誘導は、導入タンパクとして Shh を用いた報告がある (Bruse et al., 1998)。しかし、マイクロインジェクション法による歯の形態形成誘導の報告はされていない。

温度応答性培養皿を使用した細胞シートの構成は、ヒト口腔粘膜上皮細胞を用いた角膜の再生のために行われた (Nishida et al., 2004)。また、マウスでは、歯胚上皮と歯胚間葉を Dispasell とコラーゲナーゼ処理等で単離した細胞による、コラーゲンゲルを用いた歯の再構築が報告された (Nakao et al., 2007)。

上皮陥入期に重要な上皮間葉相互作用は、歯胚上皮における Shh の発現と歯胚間葉における受容体 Patched1 (Ptch1) のシグナル伝達である。また、蓄状期には歯乳頭で Bmp4 が発現し、エナメル上皮で Msx2 発現が誘導され形態形成が進む (Peters et al., 1999)。本プロトコールによる歯の形態誘導は、これらシグナル伝達をタンパク導入により誘導し解析する。

ヒト口腔粘膜上皮細胞による歯の形態誘導能は、マウス胎児歯乳頭細胞との腎被膜下移植により歯冠が形成され明らかとなった (Wang et al., 2010)。ヒトでは、永久歯や乳歯の歯髄から歯髄幹細胞が分離され (Gronthos et al., 2000; Mimura et al., 2003)、歯乳頭由来幹細胞では、処置後のヒト歯根に挿入しヌードマウスへ皮下移植を行い歯根歯髄の再生が報告された (Huang et al., 2010)。これら報告から、本研究ではマウスの口腔粘膜上皮幹細胞と歯髄幹細胞から歯の形態誘導を試みる。

2. 研究の目的

本研究は、歯の発生に上皮間葉相互作用によるシグナル伝達が必須であることに着目し、マイクロインジェクション法を用いて、三次元培養下の口腔粘膜上皮幹細胞と歯髄幹細胞にタンパクを導入し歯の形態形成の

誘導を行い、歯の形態誘導プロトコールを確立することが目的である。タンパクには蛍光標識を行い、上皮陥入期から蓄状期にかけて重要なシグナルである Sonic hedgehog (Shh) を導入し分子生物学的解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 本研究は日本歯科大学生命歯学部動物実験委員会の承認を得て行われた。

(2) 導入タンパクの標識

マイクロインジェクション用のタンパク (Shh) への蛍光色素標識は、Alexa Fluor® タンパク質標識キットを使用する。導入タンパクへの蛍光標識は、ソニックヘッジホッグ (Shh) タンパクへ Alexa Fluor® 488 を用いて標識を行っている。標識の際は、Shh の分子量が小さいため Zeba Micro Spin Desalting Columns を使用し、精製を行った。

(3) マウス歯髄幹細胞の培養

マウス歯髄幹細胞は、マウスの下顎より歯牙を取り出し、メスを用いて歯根膜や結合組織を除去後、歯髄の採取を行った。歯髄は、コラーゲナーゼ処理を行い遠心後、細胞懸濁液を作製し、 α -minimum essential medium (α -MEM) に 20% FBS と 100 μ M L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate、2mM L-glutamin、100units/ml ペニシリン 100IU/ml ストレプトマイシンを用いて、70 μ m のナイロンセルストレイナーを通過させ培養を行った。

(4) マウス口腔粘膜上皮幹細胞の培養

マウス口腔粘膜上皮幹細胞の培養は、マウス口腔粘膜組織を採取し、洗浄後トリプシン処理を行った。トリプシン処理後に、ピンセットを用いて上皮組織と結合組織の剥離を行った。得られた上皮組織を細断し細胞懸濁液の作製を行った。細胞懸濁液は遠心後、ケラチノサイトグロースメディウムを培養液として培養を行った。フィダー細胞は、マウス歯髄幹細胞を用いた。用いたマウス歯髄幹細胞は、マイトマイシン処理を行った。マイトマイシン処理は、マウス歯髄幹細胞を播種後に、マイトマイシンを 10 μ g/ml で 3 時間処理し洗浄後にマウス口腔粘膜上皮幹細胞の播種を行った。

(5) 細胞シートの作製

マウス歯髄幹細胞とマウス口腔粘膜上皮幹細胞は温度応答性培養皿を用いて細胞シートの作製を行った。マウス歯髄幹細胞は温度応答性培養皿に播種し、細胞がコンフルエント後にセルシフターを用いて細胞シートを作製した。マウス口腔粘膜上皮幹細胞はマウス歯髄幹細胞をフィダー細胞としてマイトマイシン処理を行った後に、播種した。細胞がコンフルエント後にセルシフターを用いて細胞シートを作製した。

(6) コラーゲンゲルを用いた三次元培養システム

コラーゲンゲルを用いた三次元培養には、細胞培養ディッシュもしくはセルカルチャーインサートを用いた。マウス歯髄幹細胞からの細胞塊の作製は、フラスコを用いたマウス歯髄幹細胞を培養し、細胞を剥離後遠心機でペレット状にし、コラーゲンゲル内にマイクロチップを用いて細胞塊として注入し培養を行った。温度応答性培養皿で作製されたマウス口腔粘膜上皮幹細胞の細胞シートとマウス歯髄幹細胞の細胞シートおよび細胞塊よりコラーゲンゲルを用いて三次元培養を行った。

(7) マウス歯髄幹細胞の磁気ビーズを用いた細胞分離とフローサイトメトリー

マウス歯髄幹細胞は間葉系幹細胞マーカーである CD105 抗体を用いた磁気ビーズにより CD105 陽性細胞の分離を行った。また、フローサイトメトリーにより、CD105 抗体陽性細胞の解析を行った。

(8) マイクロインジェクション

コラーゲンゲルを用いて、マウス歯髄幹細胞の細胞シートと細胞塊、およびマウス口腔粘膜上皮幹細胞の細胞シートを三次元培養した三次元構築体を矢状断し、オリエンテーションを変え、マイクロインジェクションのニードルが挿入できる角度をつくる(図1)。

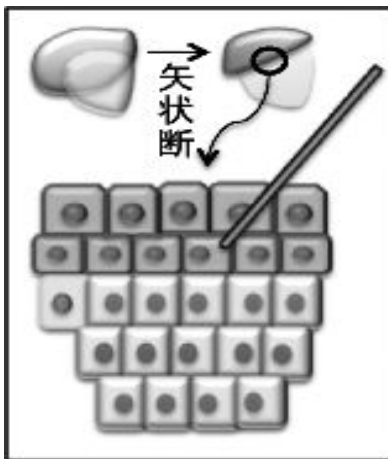


図1は三次元培養とマイクロインジェクション法の模式図を示す。上部がマウス口腔粘膜上皮幹細胞の細胞シートで下部がマウス歯髄幹細胞の細胞シートである。) マイクロインジェクションには設備備品費として計上した一次元油圧マイクロマニピュレーター (MM0-220A) を使用し、マイクロインジェクションを行った。

(9) 組織学的検査と免疫化学染色

マウスの口腔粘膜上皮幹細胞を観察するため、マウスから口腔粘膜を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋を行い、ヘマトキシリン-エオジン

(H-E) 染色を行った。また、上皮幹細胞マーカーである p63 抗体を用いて免疫化学染色を行った。三次元構築体においても同様に4%パラホルムアルデヒドで固定後、解析を行った。

4. 研究成果

(1) 導入タンパクへの蛍光標識については、ソニックヘッジホッグ(Shh)タンパクを Zeba Micro Spin Desalting Columns を用いて精製し、Alexa Fluor 488 にて蛍光標識を行った。その際、標識の際は、Shh の分子量が小さいため Zeba Micro Spin Desalting Columns を用いた。

(2) 成体マウスの歯髄より細胞を採取し、初代培養および継代培養を行った。歯髄より採取した細胞は、間葉系幹細胞マーカーである CD105 の磁気ビーズを用いて細胞分離を行った。CD105 抗体を用いたフローサイトメーターによる解析では82.06%の CD105 陽性細胞が確認され、細胞膜抗原においても採取した細胞に幹細胞様の特性があることが観察された。

(3) 成体マウスの口腔粘膜上皮組織を採取し組織学的検査のため H-E 染色を行った。H-E 染色像より基底細胞層が確認され、口腔粘膜上皮細胞のマーカーである p63 抗体を用いた免疫染色より陽性像も観察された。マウスの口腔粘膜上皮組織より細胞の採取するためトリプシンを用いて細胞単離を行い、マイトマイシン処理を行った歯髄幹細胞をフィダー細胞として初代培養および継代培養を行った。また、マイトマイシン処理に使用する細胞は歯髄幹細胞もしくは、歯髄より採取した歯髄細胞の継代培養を継続している際に不死化(継代数 100 を超えた)が考慮される細胞を用いて行った。

(4) 口腔粘膜上皮幹細胞は温度応答性培養皿にてフィダー細胞を播種後、マイトマイシン処理し培養を行いコンフルエントになるまで培養を行った。同様に歯髄幹細胞においても、温度応答性培養皿にてコンフルエントになるまで培養を行った。コンフルエントになった歯髄幹細胞は、細胞シートとして温度応答性培養皿から分離し、あらかじめコラーゲンゲルを添加し凝固しておいた培養用ディッシュ上にのせ培養を行った。また、培養用フラスコにて培養を行った歯髄幹細胞を回収し、遠心後にペレット状の歯髄幹細胞にマイクロピペットを用いて吸引し、歯髄幹細胞の細胞シート上に細胞塊として播種を行った。さらに、歯髄幹細胞塊に口腔粘膜上皮細胞の細胞シートをのせ三次元培養を行った。形成された三次元構築体に Shh タンパクを注入するため、三次元構築体を切り出し、オリエンテーションを 90 度変え培養を行っ

た。歯髄幹細胞に CD105 陽性歯髄幹細胞を用いて、Shh タンパクを注入し培養後に固定を行った結果は、口腔粘膜上皮幹細胞より作製した細胞シートの基底細胞層に細胞の集積がみられ、歯髄幹細胞との間に上皮が侵入した組織像が観察された。歯の形態形成の初期にあたる上皮間葉相互作用に関して、当該課題で研究した歯髄幹細胞と口腔粘膜上皮幹細胞の3次元培養法により、上皮系細胞と間葉系細胞における相互作用が示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

筒井健夫 (TSUTSUI Takeo)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号: 70366764

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: