

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月14日現在

機関番号：16401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890126

研究課題名（和文） ヒト歯根膜幹細胞におけるSSEA-4の役割に関する研究

研究課題名（英文） Investigation of the role of SSEA-4 in human periodontal ligament stem cells

研究代表者

村田 智子 (MURATA SATOKO)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00610916

研究成果の概要（和文）：本研究では、SSEA-4合成がヒト歯根膜幹細胞の維持・分化に関わっているかどうかについて検討を行った。その結果、SSEA-4合成にかかわる serine palmitoyltransferase と glucosylceramide synthetase の阻害が、ヒト歯根膜幹細胞の脂肪細胞分化と骨芽細胞分化に影響を及ぼすことが示された。このことから、SSEA-4合成はヒト歯根膜幹細胞の維持・分化に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated whether SSEA-4 synthesis is involved in maintenance and differentiation of human periodontal ligament (PDL) stem cells. Our results demonstrated that the blockade of serine palmitoyltransferase and glucosylceramide synthetase, which are involved in SSEA-4 synthesis, affected adipogenic/osteogenic potential of human PDL stem cells. Hence, SSEA-4 synthesis appears to be involved in maintenance and differentiation of human PDL stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：ヒト歯根膜細胞、Stage-specific embryonic antigen-4、Serine palmitoyltransferase、Glucosylceramide synthetase

1. 研究開始当初の背景

従来は治療が困難であった病気に対する新しい医療として、再生医療への期待が高まってきている。再生医療とは、本来胎生期にしか形成されることのない臓器を、人工的に形成した組織あるいは臓器を用いて機能回復を図る医療である。近年、骨髄をはじめとする様々な組織に幹細胞が存在することが分かってきており、この体性幹細胞を用いた

臓器再生の研究も活発に行われている。

研究代表者は、再生医療に用いる幹細胞の候補として、歯根膜幹細胞に着目した。近年の研究により、歯の細胞の中にも、多分化能をもつ体性幹細胞が存在することが分かっている。歯は他の器官と異なり、矯正治療に伴う便宜抜歯・智歯抜歯・過剰歯抜歯など、治療上やむをえず抜歯される機会が多く、歯根膜細胞はこれらの抜去歯から非侵襲的に

採取でき、また、自己の歯から取り出した幹細胞は、胚性細胞の利用に際して問題となる倫理的・宗教的問題や組織適合性などの問題がないという利点がある。このように、歯の細胞は幹細胞の供給源として非常に魅力的である。

研究代表者らは、過去の報告において、SSEA-4 がヒト歯根膜幹細胞に特異的に発現する表面抗原マーカーであることを初めて報告した (Kawanabe N, et al., 2010)。他にも、SSEA-4 はヒト骨髄間葉系幹細胞の同定・分離マーカーであることも報告されており (Gang EJ, et al., 2007)、未分化な組織幹細胞と SSEA-4 の関連性が示唆されている。SSEA-4 を含む糖脂質代謝が阻害されると、神経幹細胞の増殖が阻害されるという報告や、成熟細胞への分化が抑制されるなどの報告がある (Yanagisawa M, 2010)。このように、幹細胞において SSEA-4 などの糖脂質は重要な役割を持っていることが知られている。

研究代表者は、これらの研究成果を踏まえ、SSEA-4 が歯根膜幹細胞の未分化・分化を制御する何らかの機能を有しているのではないかという着想に至った。

2. 研究の目的

幹細胞を臨床応用するためには、まず、雑多な細胞集団から幹細胞を同定し、分離する技術の確立が必要である。それに加えて、分離した幹細胞を未分化な状態のまま維持し、必要なときに幹細胞を目的の細胞に分化させる技術が求められる。この技術の確立のためには、幹細胞の維持や分化のメカニズムの解明が必要不可欠である。また、過去の報告より、幹細胞において SSEA-4 などの糖脂質は重要な役割を持っていることが知られている。本研究では、申請者らが歯根膜幹細胞の特異的マーカーとして同定した SSEA-4 が、歯根膜幹細胞において幹細胞の維持や分化などにかかわる機能を有しているかどうかについて調べていく。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト歯根膜細胞における SSEA-4 の役割を解明するために、以下の研究を行っていく。

- (1) ヒト歯根膜細胞における SSEA-4 の合成経路を明らかにする。糖脂質合成酵素阻害剤を用いて、培養ヒト歯根膜細胞において SSEA-4 がどのような経路で合成されているかを明らかにする。
- (2) ヒト歯根膜細胞における SSEA-4 の機能を *in vitro* において明らかにする。糖脂質合成酵素阻害剤を用いて SSEA-4 の

発現を抑制し、培養ヒト歯根膜細胞の幹細胞特性 (細胞増殖能・脂肪細胞や骨芽細胞への分化能など) を *in vitro* において調べる。

- (3) ヒト歯根膜細胞における SSEA-4 の機能を *in vivo* において明らかにする。SSEA-4 の発現を抑制する糖脂質合成阻害剤を用いて、*in vivo* における培養ヒト歯根膜細胞の幹細胞特性、特に骨形成能への影響を調べる。

- (1) ヒト歯根膜細胞における SSEA-4 の合成経路を明らかにする。

① 細胞培養

岡山大学病院矯正歯科を受診する患者に対して説明と同意を行った後、治療上抜歯が必要であると診断された抜去歯の歯根膜細胞を実験に使用する。歯根膜細胞の採取・培養の手技は、既に習熟している。

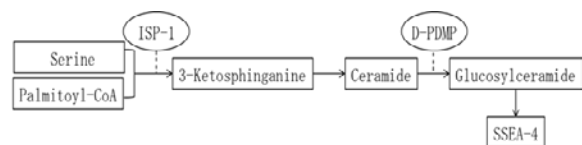
② 糖脂質合成酵素阻害剤を用いた SSEA-4 の合成経路の解明

ヒト歯根膜細胞における SSEA-4 の合成経路の特定のために、本研究では以下の2つの阻害剤を用いる。

- (i) (2S), (3R), (4R), 6E-2-amino-3, 4-dihydroxy-2-hydroxymethyl-14-oxo-6-eicosenoic acid (ISP-1)
- (ii) D-*threo*-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (D-PDMP)

下図に示すように、ISP-1 は 3-ketosphinganine の合成を、D-PDMP は glucosylceramide の合成をそれぞれ阻害することが知られており、これらの阻害剤を用いることにより SSEA-4 の合成が阻害されることが予想される。

これらの阻害剤 (ISP-1 または D-PDMP) を作用させることにより、培養ヒト歯根膜細胞において SSEA-4 がこの経路で合成されるかどうかを調べる。SSEA-4 の発現の変化は、フローサイトメトリー・ウエスタンブロッティング・蛍光免疫細胞化学などの手法によって検出する。



- (2) ヒト歯根膜細胞における SSEA-4 の機能

を *in vitro* において明らかにする。

① SSEA-4 がヒト歯根膜細胞の細胞増殖能およびテロメア長におよぼす影響の評価

ISP-1 または D-PDMP を作用させ SSEA-4 の合成を阻害することにより、細胞増殖能やテロメア長などの幹細胞の特性に変化が生じるかどうかを調べる。細胞増殖能は、96 穴プレートに細胞を播種し、培養一週間後に、MTS 化合物を用いた細胞増殖活性試験を行う。また、テロメア長の測定は、Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry (Dako) を用い、蛍光強度はフローサイトメトリーにて検出する。

② SSEA-4 がヒト歯根膜細胞の分化能におよぼす影響の評価

ISP-1 または D-PDMP を作用させ SSEA-4 の合成を阻害することにより、ヒト歯根膜細胞の脂肪細胞分化および骨芽細胞分化に変化が生じるかどうかを調べる。脂肪細胞および骨芽細胞への分化誘導の方法は、研究代表者らは既に習熟している。脂肪細胞分化は oil red O 染色の定量化により、骨芽細胞分化は沈着カルシウム濃度の定量化により評価する。また、各々の分化マーカーの発現は、RT-PCR にて調べる。

(3) ヒト歯根膜細胞における SSEA-4 の機能を *in vivo* において明らかにする。

① 生体内における硬組織再生能の評価

ISP-1 または D-PDMP を作用させ SSEA-4 の合成を阻害することにより、ヒト歯根膜細胞の生体内における硬組織再生能に変化が生じるかどうかを調べる。阻害剤で処理した歯根膜細胞を β -リン酸三カルシウムとともに免疫不全マウスに移植する。得られた標本から切片を作成し、Hematoxylin-Eosin 染色、および骨芽細胞分化マーカー (Osteocalcin など) の免疫組織化学を行い、骨形成能の評価を行う。

4. 研究成果

本研究では、ヒト歯根膜細胞における糖脂質合成が幹細胞の維持・分化に関わっているかについて検討を行った。歯根膜細胞における SSEA-4 の合成経路を確認するために、ISP-1 および D-PDMP の二つの阻害剤を用いて調べた結果、いずれの阻害剤でも SSEA-4 の発現が低下した。このことから、歯根膜細胞

における SSEA-4 の合成は、ISP-1 によって阻害された serine palmitoyltransferase および D-PDMP によって阻害された glucosylceramide synthetase を介して行われていることが確認できた。また、この結果は、ISP-1 および D-PDMP を用いることによって歯根膜細胞における SSEA-4 の発現を調節し、その役割を解明するために有用であることも示唆された。次に、ISP-1 と D-PDMP を用いて、ヒト歯根膜幹細胞の脂肪細胞分化および骨芽細胞分化に違いが生じるかについて検討を行った。その結果、ISP-1 および D-PDMP 添加によって、脂肪細胞分化および骨芽細胞分化が有意に変化することが示された。このことから、*in vitro* において、SSEA-4 を含む糖脂質合成がヒト歯根膜幹細胞の維持・分化に関わっていることが示唆された。また、ISP-1 と D-PDMP を用いて、ヒト歯根膜幹細胞の *in vivo* における骨芽細胞分化に違いが生じるかについても検討を行った。しかし、*in vitro* の結果と異なり、*in vivo* では ISP-1 および D-PDMP 添加による骨芽細胞分化の有意な変化は認められなかった。これは、*In vivo* では細胞をマウスに移植した後は阻害剤を追加で添加できないため、骨形成の間に十分な阻害剤の濃度が維持されず、有意な変化が認められなかったものと考えられた。

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 1 件)

- ① Fukushima H., Kawanabe N., Murata S., Ishihara Y., Yanagita T., Balam TA., Yamashiro T. SSEA-4 is a marker of human deciduous periodontal ligament stem cells. J Dent Res. 2012 Oct;91(10):955-960. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① Kawanabe N., Fukushima H., Murata S., Ishihara Y., Yanagita T., Balam TA., Yamashiro T. Stage-specific embryonic antigen-4 is a marker of human deciduous periodontal ligament stem cells. The Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. October 12-15, 2012 Minneapolis, MN, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 智子 (MURATA SATOKO)
高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 00610916