

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 31日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890209

研究課題名（和文） 毛包に存在する神経堤由来細胞による上皮-間葉の接触を制御した歯胚再生技術の構築

研究課題名（英文） Construction of regeneration technology of tooth germ utilizing control the contact between epithelial and mesenchymal using neural crest derived cells residing in hair follicle

研究代表者

宮内 知彦 (MIYAUCHI TOMOHIKO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20611502

研究成果の概要（和文）：

神経堤由来細胞は、歯や顎顔面を形成する間葉系細胞の起源として、頭蓋顎顔面部の形態形成に深く関与し、一部は成体になった後も特定の組織中に潜伏することから、再生医療に応用可能な細胞ソースとして期待されている。歯の再生医療に向け、毛包から分離した神経堤由来細胞の分化誘導と、光学リソグラフィーを応用したパターン培養による上皮系細胞の配置・構成の制御によって上皮-間葉スフェロイドを作製する。口腔上皮下への上皮-間葉スフェロイド移植から歯胚形成能についての解析・検討が本研究課題の目的である。

研究成果の概要（英文）：

It is known that the neural crest derived cells contribute to odontoblasts of the tooth and osteoblasts in the craniofacial region. The presence of neural crest-derived cells in the facial skin and whisker pad was reported previously. In addition, some neural crest cells are maintained in an undifferentiated state as neural crest-derived stem cells throughout the life of the animal. Therefore, neural crest cells expected to be applied to regenerative medicine. The morphogenesis of hair follicle as well as tooth initiates from epithelial-mesenchymal interactions. These properties prompted us to manufacture the epithelium - mesenchymal spheroids using pattern culture that control the placement and configuration of the epithelial cells utilizing optical lithography.

The purpose of this study is to analyse the ability of tooth germ formation of epithelium - mesenchymal spheroids towards the regenerative medicine of tooth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：医歯薬学 歯科医用工学 再生歯学

キーワード：再生医学，神経堤由来細胞，歯胚再生，象牙芽細胞，エナメル芽細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯胚再生への期待

日常生活の「咀嚼・嚥下」や「自立歩行」、高齢者の QOL 維持・向上に欠かせないものである。現在、「咀嚼」回復には義歯やインプラントによる歯科治療が施されるが、それに代わる将来の医療として歯や歯槽骨の再生が注目されている。多くの研究機関から一定の研究成果が報告され (Nakao K, Nat Methods, 4, 2007), ヒトへの歯の再生医療に実現の可能性が見えてきた。

(2) 歯胚再生に求められる細胞ソース (素材となる細胞) の条件

歯や歯槽骨の再生が必要な対象患者の多くは中高齢者であることから、歯原性細胞 (矯正治療による抜去歯や萌出前第三臼歯) 以外に細胞ソースを求めなければならない。申請者は歯の再生医療を想定した場合の細胞ソースには、① 歯原性細胞以外で、② 容易にかつ低侵襲に採取でき、③ 歯を喪失するような大人からも得られることが必要条件と考える。

(3) 再生医療における神経堤由来細胞の有用性

神経堤由来細胞は脊椎動物の胎生初期に神経間癒合部から発生し、広く胚内を遊走した後には遊走先の環境で多様に分化する体性幹細胞であり、歯や顎顔面を形成する間葉系硬組織構成細胞の起源であることが知られている (Chai Y, Development, 127, 2000)。近年、一部の神経堤由来細胞が生体マウスの後根神経節、骨髄や毛包に存在し、人為的誘導で神経細胞などの種々の細胞へ分化可能であることが報告された (Nagoshi N, Cell Stem Cell, 2, 2008)。

(4) 再生医療における細胞のパターン培養技術の利用

未分化な細胞を目的とする細胞に分化誘導した後の課題として、細胞の配置や構成を制御して生体組織を作製し体内に移植することである。現在の細胞パターンニング研究は、① 基板側の基材表面加工 (Sasaki D, Biomaterials, 30, 2009) と ② インクジェットなどを用いた直接パターンニング (Nakamura M, Tissue Eng, 11 2005) に大きく分けられ、血管再生の分野で研究が進められている。

申請者はこれまでに、毛包に存在する神経堤由来細胞に着目し、歯胚再生や歯槽骨の再建を目標に成体マウスからの神経堤由来細胞の単離、培養について研究について取り組み、培養条件による細胞増殖や分化誘導について多くの知見ならびに情報の蓄積がある。さらに、二酸化チタン薄層コーティングへの UV 照射の影響についての研究から、光触媒に対する知識や経験も豊富である。

2. 研究の目的

歯の再生医療に向け、大人になっても存在する体性幹細胞の一つ、毛包から分離した神経堤由来細胞の分化誘導と、光学リソグラフィを応用したパターン培養による上皮系細胞の配置・構成の制御によって上皮-間葉スフェロイドを作製する。口腔上皮下への上皮-間葉スフェロイド移植から歯胚形成能についての解析・検討が本研究課題の目的である。

3. 研究の方法

(1) 神経堤由来細胞の毛包からの効率的純化方法の検討と硬組織形成能の検討

申請者らはこれまで神経堤由来細胞を特異的に標識可能な P0-Cre/CAG-CAT-EGFP マウスの毛包から神経堤由来細胞を純化し種々の実験に応用してきたが、細胞回収効率が非常に低かった。そこで種々の酵素処理の作用時間、作用順序、またフィルトレーションの有無などの諸条件の検討を行い、培養後の細胞をフローサイトメーターで比較検討し、神経堤由来細胞の純化効率の良い条件を探索した。

また、純化後の細胞を用いて硬組織系細胞への分化能を検討した。

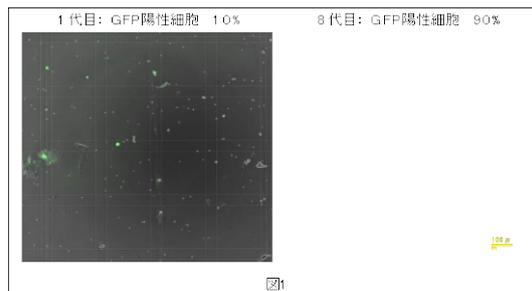
(2) 上皮系細胞と神経堤由来細胞との共存培養

歯胚形成は上皮-間葉細胞の相互作用によって進行することから、毛包の神経堤由来細胞と上皮系細胞 (エナメル芽細胞) との共存培養を行う。上皮系細胞のコロニー上に神経堤由来細胞乗せ、それぞれの細胞が接した状態で培養する。共存培養によって単独培養に比べ細胞分化が促進するか否かについて、免疫蛍光染色ならびに mRNA 発現で評価する。

4. 研究成果

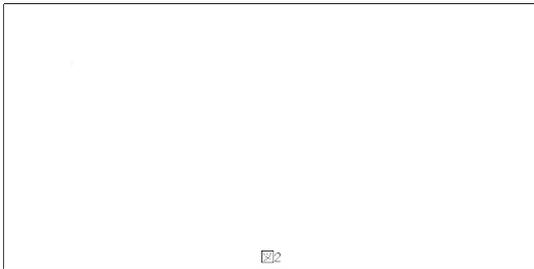
(1) 神経堤由来細胞の毛包からの効率的純化方法の検討と硬組織形成能の検討

毛包をコラゲナーゼ処理後、細胞塊のままコラーゲンゲル上に播種し、3-6 日毎に 8 回継代することで 1 匹のマウスから申請者らのこれまでの細胞回収方法の 100 倍の細胞を回収可能であることを見出した。(図 1)

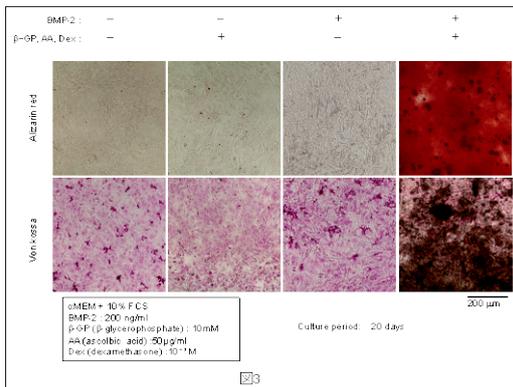


また継代を繰り返した後でも回収された細

胞は P75, Snail, Twist といった 神経堤細胞マーカー遺伝子の発現を認め, 分化誘導により, ALP, OCN, OSX, RUNX2 といった骨芽細胞マーカー遺伝子を発現した. (図 2)

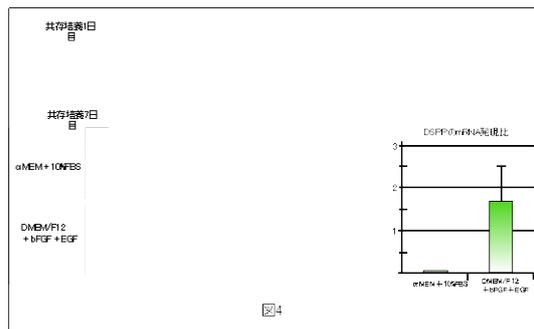


さらに, 石灰化促進培地で培養すると石灰化硬組織を形成した. (図 3)



(2) 上皮系細胞と神経堤由来細胞との共存培養

神経堤由来細胞と上皮系細胞との上皮-間葉相互作用の解析をするためにエナメル芽細胞と神経堤細胞の共存培養を行った. 7 日間培養後の遺伝子発現を解析したところ, 象牙芽細胞マーカー遺伝子である DSPP の発現を認めた. (図 4)



また共存培養細胞の免疫蛍光染色で象牙芽細胞マーカー遺伝子の DSP がエナメル芽細胞と神経堤細胞の接触部で確認された. (図 5) 以上から上皮-間葉の細胞の接触によって神経堤由来細胞が象牙芽細胞様細胞に分化したことが示唆された.



今後は神経堤由来細胞が DSPP, DSP を発現したメカニズムの解析を接着因子も含めた細胞間の情報伝達系を踏まえて検討していく. また並行してエナメル芽細胞と神経堤由来細胞の共存培養によって得られた細胞塊を移植した matri gel を頭蓋骨欠損部や口腔粘膜上皮へ移植し, 組織形成の観察, 組織塊の組織解析, 遺伝子解析も行っていく.

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) Ono M, Suzawa T, Takami M, Miyauchi T, Ogasawara A, Yamada A, Hosono T, Arata S, Miyamoto Y, Baba K, Nakamura M, Osumi N, Maki K, Kamijo R. Identification and isolation of neural crest derived cells in nasal concha. *Jpn J Tissue Cult Dent Res*, 20(2), 29-35, 2011(査読有)

[学会発表] (計 8 件)

(1) 宮内知彦, 須澤徹夫, 小野美樹, 林竜平, 西田幸二, 榎宏太郎, 上條竜太郎, 馬場一美. 毛包から純化した神経堤細胞の象牙芽細胞への分化誘導. 日本補綴歯科学会 第 120 回記念学術大会, 広島, 2011 年 5 月

(2) 小野美樹, 高見正道, 須澤徹夫, 山田篤, 宮内知彦, 馬場一美, 中村雅典, 榎宏太郎, 上條竜太郎. 成体における神経堤由来細胞の分布とそれを用いた骨芽細胞の分化誘導. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2011 年 7 月

(3) 須澤徹夫, 宮内知彦, 小野美樹, 高見正道, 榎宏太郎, 馬場一美, 大隅典子, 上條竜太郎. 口腔・顎顔面部に存在する神経堤由来細胞を用いた硬組織再生法の確立. 第 11 回東京骨関節フォーラム, 東京, 2011 年 8 月

(4) 宮内知彦, 須澤徹夫, 上條竜太郎, 馬場一美. 象牙質再生に向けた毛包神経堤細胞による象牙芽細胞分化誘導. 第 4 1 回日本口腔インプラント学会学術大会, 名古屋, 2011 年 9 月

(5) 宮内知彦, 須澤徹夫, 森澤絵里, 大隅典子, 上條竜太郎, 馬場一美. 再生医療における神経堤細胞の可能性. 口腔先端応用医科学研究会 第 4 回学術会議, 東京, 2012 年 1 月

(6) 森澤絵里, 須澤徹夫, 宮内知彦, 鈴木航,

馬場一美, 上條竜太郎. 成体マウス毛包内の神経堤由来細胞による象牙芽細胞分化誘導. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 郡山, 2012 年 9 月

(7) 森澤絵里, 須澤徹夫, 宮内知彦, 高橋正皓, 槇宏太郎, 馬場一美, 大隅典子, 上條竜太郎. 毛包から採取した神経堤由来細胞による象牙芽細胞分化誘導. 第 46 回日本口腔科学会関東地方部会, 川越, 2012 年 9 月

(8) 森澤絵里, 須澤徹夫, 宮内知彦, 高見正道, 山田篤, 宮本洋一, 林竜平, 西田幸二, 大隅典子, 馬場一美, 上條竜太郎. 毛包内の神経堤由来細胞による象牙芽細胞分化誘導. 第 11 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012 年 6 月

〔図書〕 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 知彦 (MIYAUCHI YOMOHICO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号 : 20611502