

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592815

研究課題名(和文) 神経堤由来細胞を含む間葉 - 上皮 - 間葉三層サンドイッチ培養による歯胚再生技術の構築

研究課題名(英文) A trial approach for tooth regeneration by three-layer sandwich culture using neural crest-derived cells

研究代表者

須澤 徹夫 (SUZAWA, Tetsuo)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：60271285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：成体の神経堤由来細胞(NCDCs)による歯胚再生の基盤研究として、神経堤に由来する細胞でGFPが恒常的に発現する、PO-Cre/CAG-CAT-EGFP成体マウスの口腔粘膜から単離したGFP陽性細胞を解析した。単離したNCDCsは骨芽細胞様細胞などに誘導できる多分化能を有し、3次元培養ではスフェロイド径を増大させた。DNAマイクロアレイの結果からNCDCsはendothelin receptor type Bの発現が高く、リガンドのEndothelin 3によってスフェロイド数が増加した。口腔粘膜は低侵襲に神経堤由来細胞を採取できる組織として、歯胚など硬組織再生へ応用可能なことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neural crest cells in the embryo migrate to reach target sites as neural crest-derived cells (NCDCs) where they differentiate into a variety of derivatives. With the aim of facilitating tooth regeneration by using non-dental-derived cells, we analyzed the characteristics of neural crest-derived cells (NCDCs) in adult tissues. We used PO-Cre/CAG-CAT-EGFP transgenic mice (PO mice), in which NCDCs express green fluorescent protein (GFP). GFP-positive cells separated using flow cytometry expressed a high level of endothelin receptor type B (Ednrb) by DNA microarray. These GFP-positive cells were capable of proliferating into spheres and exist in the oral mucosa. They also were increased by endothelin 3, a ligand of Ednrb. Furthermore, GFP-positive cells had the capability to differentiate into various cell lineages including osteoblast-like cells and adipocyte-like cells. Therefore, adult oral NCDCs may be a useful cell source for regenerative medicine, including tooth regeneration.

研究分野：口腔生化学

キーワード：再生医学 神経堤由来細胞 組織幹細胞 発生・分化 歯胚再生

1. 研究開始当初の背景

神経堤由来細胞は脊椎動物の胎生初期に神経管癒合部から発生し、広く胚内を遊走した後に、定着先の環境で多様に分化する細胞で、歯や顎顔面に存在する間葉系硬組織形成細胞の起源である (Chai Y, *Development*, 127, 2000)。近年、神経堤由来細胞は成体マウスの後根神経節、骨髄や毛包に存在し、試験管内で誘導すると神経細胞などをはじめ種々の細胞系譜へ分化することが報告された (Nagoshi N, *Cell Stem Cell*, 2, 2008)。

2. 研究の目的

低侵襲にアクセス可能な口腔粘膜から、神経堤由来細胞の特異的細胞表面マーカーを同定し、表面マーカーを基に細胞を純化する。神経堤由来細胞の効率的な増殖方法と種々の細胞系譜への分化誘導法を確立する。さらに、神経堤由来細胞と上皮細胞を用いて、積層細胞シート培養した、「間葉 - 上皮 - 間葉三層サンドイッチ培養系」を開発する。上皮 - 間葉相互作用を試験管内で実現可能な歯胚再生技術の基盤を形成する。

3. 研究の方法

低侵襲にアクセス可能な「成体の神経堤由来細胞」による、歯胚再生の可能性を検討するため、神経堤に由来する細胞で GFP が恒常的に発現する P0-Cre/CAG-CAT-EGFP 成体マウスを用い解析した。神経堤由来細胞の口腔組織内の分布は、蛍光実体顕微鏡にて観察した。局在を特定した後に、口腔粘膜組織から単離した細胞をフローサイトメーターで GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞を分離して、それぞれの細胞の増殖能と多分化能について解析した。GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞の DNA マイクロアレイ法による網羅的な遺伝子発現の比較から、GFP 陽性細胞に特徴的に発現する遺伝子を同定した。三層サンドイ

チ培養系から、上皮 - 間葉相互作用と歯胚形成の可能性について検討した。

4. 研究成果

P0 マウスの口腔組織では、口蓋、歯肉、頬粘膜に GFP 陽性細胞が存在した。組織学的解析から、神経的由来細胞は口腔粘膜の真皮に存在するミスネル小体と共在した。成体組織から単離した GFP 陽性細胞は、神経堤関連遺伝子の一つである Sox10 の発現が高値を示した。顎下腺を用いた DNA マイクロアレイ法の結果から、GFP 陰性細胞に比べ GFP 陽性細胞において *G protein-coupled receptor 4 (Gpr4)*、*Endothelin receptor type B (Ednrb)* の発現が高く、*Plate derived growth factor alpha (Pdgfra)* ならびに *beta (Pdgfrb)* の発現が低いことが明らかになった (図 1)。

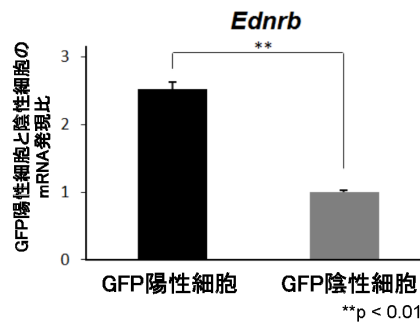


図1) *Endothelin receptor type B (Ednrb)* は神経堤由来細胞で発現が高い

口腔粘膜組織から単離した細胞をフローサイトメーターで GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞を分離して、それぞれの細胞の増殖能と多分化能について解析した。低付着性プレートを用い bFGF を含む無血清培地でスフェロイド培養すると、GFP 陽性細胞は培養経過と共にスフェロイド径が増大したのに対し、GFP 陰性細胞ではスフェロイドの形成が認められなかった。DNA マイクロアレイ法の結果から注目した *Endothelin receptor type B (Ednrb)* のリガンドである *Edn3* を GFP 陽性細胞のスフェロイド培養系に加えるとスフェロイド数が著しく増加したことから、細胞増殖を促進することが示唆された。多分化能を検討す

るため種々の培養条件で誘導すると、GFP 陽性細胞は BMP-2 含有の骨芽細胞分化誘導培地で強い ALP 活性染色と Alizarin red 染色陽性を示す骨芽細胞様細胞へと分化した。一方、GFP 陰性細胞は BMP-2 を添加しても、ALP 活性染色と Alizarin red 染色共に陰性を示した。Insulin 含有の脂肪細胞誘導培地で培養すると、細胞質に Oil Red O 染色陽性の脂肪滴を含む脂肪細胞様細胞へと誘導された。以上の結果から成体口腔粘膜の神経堤由来細胞は、立体的に増殖・培養することが可能であり、骨芽細胞様細胞や脂肪細胞様細胞など誘導できる多分化能を有していた。神経堤由来細胞のシートと、上皮細胞シートによる「間葉 - 上皮 - 間葉三層サンドイッチ培養系」の実現には至らなかったが、それぞれの細胞の増殖速度の違いが原因として考えられる。bFGF と EGF を含む無血清培地で二種の細胞を培養したが、培養液の更なる検討が求められる。また上皮細胞と共存培養で、歯に特有の遺伝子が神経堤由来細胞で上昇することなど検討する必要がある。これら今後の課題も含まれるが、口腔粘膜は低侵襲に神経堤由来細胞を採取できる組織として、歯を含む硬組織再生へ応用可能なことが示唆された。

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 12 件、他 5 件)

- 1) Ikumi N, Suzawa T, Yoshimura K, Kamijo R., Bone Response to static compressive stress at bone-implant interface: The pilot study of critical static compressive stress. *Int J Oral Maxillofac Implants*. doi: 10.11607/jomi.3715. 2015 (in press). (査読有)
- 2) Akiyama T, Miyamoto Y, Yoshimura K, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Hoshino M, Imamura T, Akiyama C, Yasuhara R, Mishima K, Maruyama T, Kohda C, Tanaka K, Potempa J, Yasuda H, Baba K, Kamijo R. Porphyromonas gingivalis-derived lysine gingipain enhances osteoclast differentiation induced by tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β but suppresses that by interleukin-17A: importance of proteolytic degradation of osteoprotegerin by lysine gingipain. *J Biol Chem*. May 30;289(22):15621-15630, doi: 10.1074/jbc.M113.520510. 2014. (査読有)
- 3) Takahashi M, Suzawa T, Yamada A, Yamaguchi T, Mishima K, Osumi N, Maki K, Kamijo R., Identification of gene expression profile of neural crest-derived cells isolated from submandibular glands of adult mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 446(2):481-486, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.130. 2014. (査読有)
- 4) Maruyama T, Miyamoto Y, Yamamoto G, Yamada A, Yoshimura K, Suzawa T, Takami M, Akiyama T, Hoshino M, Iwasa F, Ikumi N, Tachikawa T, Mishima K, Baba K, Kamijo R., Downregulation of carbonic anhydrase IX promotes Coll10a1 expression in chondrocytes. *PLoS One*. 8(2):e56984. doi: 10.1371/journal.pone.0056984. Epub Feb 18. 2013. (査読有)
- 5) Wang X, Suzawa T, Miyauchi T, Zhao B, Yasuhara R, Anada T, Nakamura M, Suzuki O, Kamijo R., Synthetic octacalcium phosphate-enhanced reparative dentine formation via induction of odontoblast differentiation. *J Tissue Eng Regen Med*. doi: 10.1002/term.1669. [Epub ahead of print] Jan 28 2013. (査読有)
- 6) Shibuya I, Yoshimura K, Miyamoto Y, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Suzuki D, Ikumi N, Hiura F, Anada T, Suzuki O, Kamijo R., Octacalcium phosphate suppresses

chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *Cell Tissue Res.* 352(2):401-412, doi: 10.1007/s00441-012-1548-8. 2013. (査読有)

- 7) Suzuki D, Yamada A, Aizawa R, Funato S, Matsumoto T, Suzuki W, Takami M, Miyamoto Y, Suzawa T, Yamamoto M, Baba K, Kamijo R, BMP2 differentially regulates the expression of Gremlin1 and Gremlin2, the negative regulators of BMP function, during osteoblast differentiation. *Calcif Tissue Int.* 91(1):88-96, doi: 10.1007/s00223-012-9614-5. 2012. (査読有)

[学会発表](計 25 件、他 13 件)

- 1) 浦野(森澤)絵里, 高見正道, 須澤徹夫, 大隅典子, 馬場一美, 上條竜太郎: 毛包内神経堤由来細胞は骨芽細胞様細胞への分化能を持ち破骨細胞の分化を支持する。(第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25-27 日)
- 2) 高橋正皓, 須澤徹夫, 山田篤, 山口徹太郎, 榎宏太郎, 上條竜太郎: 成体マウス顎下腺から分離した神経堤由来細胞の解析。(第 51 回日本口腔組織培養学会学術大会, 福岡, 2014 年 11 月 15 日)
- 3) 高橋正皓, 須澤徹夫, 山田 篤, 榎 宏太郎, 上條竜太郎: 成体マウス顎下線から分離した神経堤由来細胞の遺伝子発現解析(第 32 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2014 年 7 月 24-26 日)
- 4) 高橋正皓, 須澤徹夫, 山田篤、山口徹太郎、上條竜太郎、榎宏太郎: 成体組織における神経堤由来細胞の遺伝子発現解析。(第 33 回昭和歯学会例会, 東京, 2013 年 12 月 10 日)
- 5) Takahashi M, Suzawa T, Yamada A, Maki K, Kamijo R. Characteristic gene expression profile of neural crest-derived cells in adult mouse tissues. American Society for Cell Biology 2013 Annual Meeting, New Orleans, USA, 14-18 December 2013
- 6) 高橋正皓, 須澤徹夫, 山田篤、山口徹太郎、上條竜太郎、榎宏太郎: 成体組織に存在する神経堤由来細胞の効率的な分離法を目指した遺伝子発現パターンの解析。(第 72 回日本矯正歯科学会大会, 松本, 2013 年 10 月 7-9 日)
- 7) 森澤絵里, 高見正道, 須澤徹夫, 馬場一美, 大隅典子, 上條竜太郎: 神経堤由来の毛包細胞を用いた骨芽細胞分化誘導。(第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 宇都宮, 2013 年 5 月 7-9 日)
- 8) Matsumoto A, Takami M, Miyamoto A, Tachi K, Suzawa T, Baba K, Kamijo R. LPS inhibits ectopic bone formation induced by BMP-2 plus TGF- β 1 in mice. (The American Society for Bone & Mineral Research 2012 Annual Meeting, Minneapolis, USA, 12-15 October 2012)
- 9) 小野美樹, 高見正道, 須澤徹夫, 綿引淳一, 榎本明子, 南保友樹, 田口智博, 市川雄大, 野瀬佳奈, 上條竜太郎, 榎宏太郎: 口腔粘膜上皮のケラチノサイトの一部は神経堤に由来する。(第 71 回日本矯正歯科学会大会, 盛岡, 2012 年 9 月 26-28 日)
- 10) 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14-16日）

- 11) 森澤絵里，須澤徹夫，宮内知彦，高橋正皓，榎宏太郎，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日）
- 12) 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12-14日）

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Tachikawa T., The New Frontiers in Research for Oral Cancer, MARUZEN PLANET, 2012. 総頁数, 209.

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

昭和大学歯学部口腔生化学講座

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

須澤 徹夫 (SUZAWA, Tetsuo)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号：60271285

(2)研究分担者

上條 竜太郎 (KAMIJO, Ryutaro)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：70233939

(3)連携研究者

大隅 典子 (OSUMI, Noriko)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号：00220343

(4)連携研究者

國貞 隆弘 (KUNISADA Takahiro)
岐阜大学・医学系研究科・教授
研究者番号：30205108