

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659848

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞は歯牙再植時の歯周組織再生の細胞源となりうるか？

研究課題名(英文) Could human dental pulp stem cell be an alternative cell source for periodontal tissue regeneration of reimplanted tooth?

研究代表者

和田 尚久 (Wada, Naohisa)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：60380466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト歯髄幹細胞(hDPSC)が歯根膜細胞様細胞への分化能を有するか否かを検討した。ヒト歯髄組織には間葉系幹細胞マーカーを発現し、多分化能を有するhDPSCが存在することが確認できた。hDPSCは歯周組織を模した歯槽骨に接すると歯根膜関連マーカーの発現が上昇し、また歯根膜線維形成に関与しているTGF- β 1で刺激すると同様に歯根膜関連マーカーの発現が上昇することが明らかになった。hDPSCは歯周組織再生の移植細胞源になる可能性が考えられ、さらにTGF- β 1を組み合わせることで効率よく歯根膜組織再生誘導し、新たな歯周組織再生法開発につなげていける可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized that human dental pulp stem cells (hDPSC) could possess the potential to convert to periodontal ligament cell-like cells. We isolated the cell population, which showed the expression of mesenchymal stem cell markers and multipotency to differentiate into various cell types, from human dental pulp tissue. We investigated the PDL-related gene expression in this cell population, which could be hDPSC, cultivated on bone slices or with recombinant TGF- β 1 addition. hDPSC cultured on bone slices for 2 weeks enhanced gene expression of Periostin, Col-1, α -SMA at the levels similar to PDLSC. Moreover, TGF- β 1 addition also upregulated these gene expression in hDPSC. These findings suggested that DPSCs contacting to bone tissue and stimulated with TGF- β 1 could convert to PDL-like cells. Although further studies are required to clarify the precise differentiation potential, hDPSC can be alternative cell source to regenerate PDL tissue efficiently.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：歯髄幹細胞 歯周組織 歯根膜組織 組織再生

1. 研究開始当初の背景

現在、根破折歯の保存的治療法として、抜去した破折歯根を口腔外で接着し抜歯窩に再固定する意図的再植法が確立されているが、感染による歯根膜組織のダメージが大きい場合は、歯周組織の再生が困難であり生着しないケースが少なくない。最近、歯根膜組織には多分化能を有する歯根膜幹細胞(PDLSC)が存在することから、PDLSCを用いた歯周組織再生法の確立が期待されている。しかしながら臨床応用を想定した場合、PDLSCは抜去歯牙の歯根表面から採取した歯根膜組織より分離しなければならないため、十分な量の細胞数を獲得することが困難なケースがある。一方、歯髄幹細胞(DPSC)は、通常は抜去後廃棄される乳歯や智歯の歯髄組織から比較的簡便で確実に単離、獲得する方法が確立されており(Gronthos S, et al, Proc Natl Acad Sci USA 97:13625-13630, 2000) また他の組織から間葉系幹細胞を得る方法と比較して、患者の負担も少なく採取する機会も比較的多いという利点があり、近年、組織再生医療の新たな細胞源として注目されている。そこで、DPSCを用いた移植によって歯根膜組織を再生し再植歯を生着させる方法が可能であるかを検討することを研究計画とした。

2. 研究の目的

(1) ヒト歯髄幹細胞のキャラクタライゼーションを行った。

(2) ヒト歯髄幹細胞の歯根膜細胞への分化能を検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞

ヒト第一大臼歯から獲得した歯髄組織および歯根膜組織を酵素処理した後、培養皿に播種、培養し出現してきた各細胞をヒト歯髄細胞(HDPC)およびヒト歯根膜細胞(HPDLC)として実験に用いた。また、single-colony selection法を用いて両細胞の単一コロニーを分離し両細胞のクローンを単離した。これらの細胞は、10%牛胎児血清含有α-MEMにて培養、維持された。

(2) HDPCクローンおよびHPDLCクローンのキャラクタライゼーション

歯根膜関連遺伝子の発現解析: HDPCおよびHPDLC両クローンにおける歯根膜関連遺伝子の発現を定量的RT-PCR法にて解析した。

間葉系幹細胞表面抗原マーカーの発現解析: 各クローンにおける間葉系幹細胞表面抗原マーカーの発現をフローサイトメトリー分析法にて解析した。

細胞分化アッセイ: 各細胞クローンを骨芽細胞系細胞分化誘導、脂肪細胞分化誘導および軟骨細胞分化誘導各培地にて培養し、各種染

色法にて検討した。

(3) 骨スライスとの細胞培養

HDPCクローンおよびHPDLCクローンをブタ歯槽骨スライス上あるいは接する条件で培養し、歯根膜関連マーカーの発現を定量的RT-PCR法および免疫細胞化学的染色法にて解析した。

(4) 免疫組織化学的解析

マウス上顎臼歯部歯周組織におけるTGF-β1の発現を抗TGF-β1抗体を用いて免疫組織化学的染色を行い、観察した

4. 研究成果

(1) ヒト歯髄細胞クローンのキャラクタライゼーション

初代培養のHDPCおよびHPDLCにおける歯根膜関連マーカー(perioestin, collagen-1およびα-SMA)の発現を定量的RT-PCR法にて解析したところ、3人の異なる提供者から得たHPDLC全てにおいてHDPCと比較して発現量が有意に高かった(図1)。また、single-colony selection法にて分離した自己増殖能の高いHDPCクローンとHPDLCクローン3種類ずつ(HDPC4A-4, 4A-7, 4A-9およびHPDLC4A-1, 4A-2, 4A-4)を用いて、同様に歯根膜関連マーカー発現を検討したところ、いずれもHPDLCクローンにおいて発現が有意に高かった(図2)。以上の結果より、歯髄細胞は歯根膜細胞とは異なる特徴を有する細胞であることが示唆された。

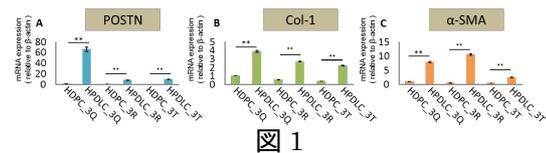


図1

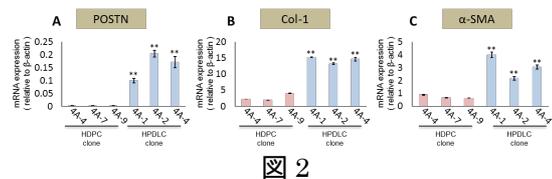


図2

次に、各細胞クローンにおける間葉系幹細胞マーカー(CD73, CD90, CD105, CD146およびCD166)の発現をフローサイトメトリー分析法にて解析したところ、HDPCクローンはHPDLCクローンと同レベルの陽性発現を示した。また、分化能について検討したところ、骨芽細胞、脂肪細胞および軟骨細胞分化を示したことから、多分化能を有していることが明らかになった(図3)。以上の結果、自己増殖能の高いHDPCクローン(HDPC4A-4, 4A-7, 4A-9)は歯髄幹細胞(DPSC)である可能性が示唆された。

(2) ヒト歯髄幹細胞の歯根膜細胞様細胞へ

の分化能の検討

HDPC クローン(HDPC4A-4, 4A-7, 4A-9)をブタ歯槽骨スライス上で 2 週間培養して periostin, collagen-1 および α -SMA の mRNA 発現を検討したところ、HPDLC クローン (HPDLC4A-1, 4A-2, 4A-4)と同等レベルまでその発現が上昇した(図 4)。また、HDPC クローン 4A-7 を骨スライスと接する状態で培養したところ、骨スライス周囲の HDPC4A-7 における periostin タンパク発現が増強した。以上の結果より、骨組織と接触した HDPC クローン(DPSC)は growth factor 非存在下であっても歯根膜細胞様細胞に分化する可能性が示唆された。

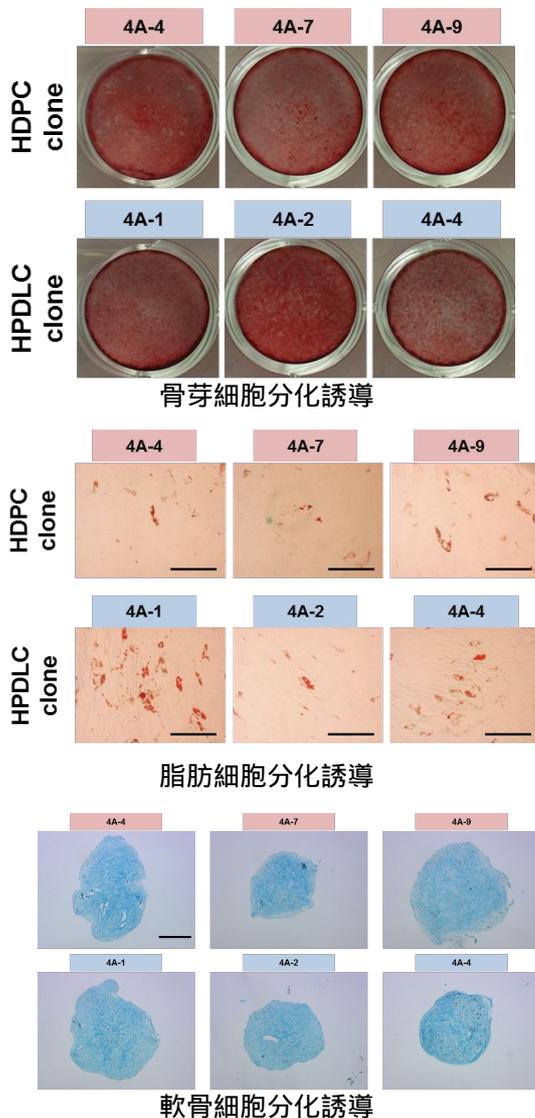


図 3

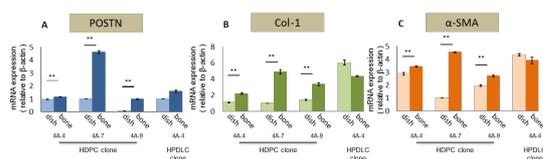


図 4

次に歯根膜組織において線維形成に関与していることが知られている TGF- β 1 の発現を、マウス上顎臼歯部歯周組織のサンプルを用いて免疫組織化学的に検討した。その結果、歯根膜組織においては強発現していたが、歯髓組織では象牙質に接した象牙芽細胞は陽性であったが、それ以外の歯髓組織においてほとんど発現は認められなかった。また、HDPC クローン 4A-7 と HPDLC クローン 4A-2 における TGF- β 1 の発現を定量的 RT-PCR 法にて検討したところ、HPDLC クローン 4A-2 において発現が有意に高かった。そこで、TGF- β 1 刺激により hDPSC の歯根膜細胞様細胞分化に影響があるか検討した。3 種類の培養 HDPC クローン (HDPC4A-4, 4A-7, 4A-9) をリコンビナント TGF- β 1 (1ng/ml) にて 24 時間刺激すると、歯根膜関連マーカーである periostin, collagen-1 および α -SMA の発現が有意に上昇した(図 5)。HDPC クローンにおいて、TGF- β 受容体 (T β R1, T β R2) mRNA の発現が認められたことから、TGF- β 1 刺激により、hDPSC が歯根膜細胞様細胞に分化する可能性が示唆された。

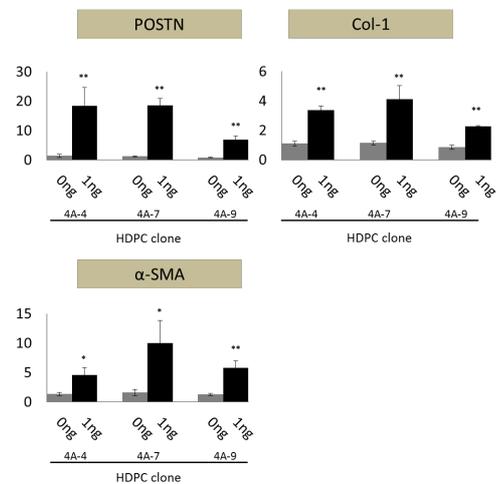


図 5

本研究において、ヒト歯髓組織には多分化能を有する歯髓幹細胞(hDPSC)が存在し、hDPSC は歯周組織を模した歯槽骨に接すると歯根膜関連マーカーの発現が上昇し、また歯根膜線維形成に関与している TGF- β 1 で刺激すると同様に歯根膜関連マーカーの発現が上昇することが明らかになった。さらなる詳細な検討が必要であるが、比較的手に入れやすい歯髓幹細胞および TGF- β 1 を組み合わせて用いることで歯根膜組織再生誘導し、新たな歯周組織再生法開発につなげていける可能性が示唆された。

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 5件)

Wada N, Maeda H, Hasegawa D, Gronthos S, Bartold PM, Menicanin D, Fujii S, Yoshida S, Tomokiyo A, Monnouchi S, Akamine A. Semaphorin 3A induces mesenchymal stem-like properties in human periodontal ligament cells. *Stem Cells Dev.* 2014 Feb 10. [Epub ahead of print], <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2013.0405>

Maeda H, Tomokiyo A, Wada N, Koori K, Kawachi G, Akamine A. Regeneration of the periodontium for preservation of the damaged tooth. *Histol Histopathol.* 2014 Apr 28. [Epub ahead of print] <http://www.hh.um.es/Reviews-proofs/11-489-manuscript.pdf>

Kono K, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo A, Yamamoto N, Wada N, Monnouchi S, Teramatsu Y, Hamano S, Koori K, Akamine A. Exposure to transforming growth factor- β 1 after basic fibroblast growth factor promotes the fibroblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cell lines. *Cell Tissue Res.* 352(2):249-63, 2013. doi: 10.1007/s00441-012-1543-0.

Wada N, Gronthos S, Bartold PM. Immunomodulatory Effects of Stem Cells. *Periodontol* 2000. 63(1):198-216, 2013. doi: 10.1111/prd.12024.

Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Monnouchi S, Akamine A. Prospective Potency of TGF- β 1 on Maintenance and Regeneration of Periodontal Tissue. *Int Rev Cell Mol Biol.* 304:283-367, 2013. doi:10.1016/B978-0-12-407696-9.00006-3.

〔学会発表〕(計 2件)

吉田晋一郎、和田尚久、前田英史、門野内聡、長谷川大学、御手洗裕美、濱野さゆり、祐田明香、杉井英樹、赤峰昭文. Semaphorin3A がヒト歯髄幹細胞による硬組織形成に及ぼす影響. 第140回日本歯科保存学会春季学術大会、滋賀県立芸術劇場(大津市) 2014年6月19、20日

Yoshida S, Wada N, Maeda H, Hasegawa D, Sato H, Monnouchi S, Akamine A. Dental pulp stem cells on bone tissue express periodontal ligament-related gene. The 9th World Endodontic Congress, Tokyo International Forum, Tokyo, Japan, 2013.5.23-26 (5.26).

〔図書〕(計 1件)

Maeda H, Fujii S, Monnouchi S, Wada N, Akamine A. Differentiation of Periodontal Ligament Stem /Progenitor Cells: Roles of TGF- β 1. In: *Stem Cells and Cancer Stem Cells, volume 4, Therapeutic Applications in Disease and Injury.* Hayat MA (ed). Springer, Heidelberg, Germany: Chapter 5, 51-58, 2012.

〔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

和田 尚久 (WADA, Naohisa)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 60380466

(2)研究分担者

赤峰 昭文 (AKAMINE, Akifumi)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号: 117053

前田 英史 (MAEDA, Hidefumi)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 10284514

門野内 聡 (MONNOUCHI, Satoshi)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号: 30609558

(3)連携研究者

()

研究者番号: