

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792164

研究課題名(和文) 同種移植による歯髄再生を目指した歯髄幹細胞の免疫制御因子の同定

研究課題名(英文) Identification of immunomodulatory factors of dental pulp stem cells aiming at the pulp regeneration by allogeneic transplantation

研究代表者

村上 真史 (Murakami, Masashi)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・再生歯科医療研究部・研究員

研究者番号：30614531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄幹細胞は免疫制御因子を放出しており、骨髄、脂肪幹細胞と比較して、その量が多いことが示唆された。この差を利用して免疫制御に関わる因子を探索したところ、Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)が挙げられた。MCP-1は、歯髄幹細胞培養上清中に他の因子と比較して、非常に多く含まれており、MCP-1の添加によって、IFN- γ 、LPS刺激によるin vitro炎症反応の抑制が見られたことから、歯髄幹細胞が放出する免疫制御因子の1つとしてMCP1が挙げられることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The conditioned medium (CM) of dental pulp stem cells (DPSCs) was found to be the most effective in immunomodulation compared to the CM of bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose stem cells (ADSCs). We investigated the immunomodulatory factors present in the CM of DPSCs compared to those of BMSCs and ADSCs using microarray data of pulp, BM, and adipose CD31- SP cells. The highest expressed factors in pulp CD31- SP cells compared to BM and adipose CD31- SP cells were further investigated using Real-time RT-PCR and Milliplex analysis.

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) level was higher in DPSCs CM than any other chemokine or cytokine. Moreover, MCP-1 suppressed the inflammatory response induced by IFN- γ and LPS in vitro. All these results suggested that MCP-1 was involved in the immunomodulatory effect of the CM of DPSCs.

研究分野：再生医療

キーワード：歯髄幹細胞 歯髄幹細胞培養上清 混合リンパ球培養反応

1. 研究開始当初の背景

近年、日本は超高齢化社会の一途をたどっており、全身の健康維持のため、また QOL 向上のために歯の健康を保つことは必須である。したがって、当研究室では、深い齲による露髄や歯髄炎が起こった場合でも歯髄を極力残し、歯を長持ちさせることが必要と考え、歯髄幹細胞を用いた歯髄再生による新しい、抜髄・感染根管治療法の開発を行ってきた。近年、イヌの根完成歯の抜髄後の根管に歯髄由来 CD31⁻ SP 細胞あるいは CD105⁺細胞を自家移植し、完全に歯髄を再生することに成功し、歯髄幹細胞の自家移植の有効性を明らかにした^{1), 2), 3)}。

しかし、臨床において抜髄される年齢のピークは 40 歳代後半であるため、自家の歯髄組織の供給には限界があり、歯髄幹細胞の安全性と品質を保証するためには自家幹細胞は高価となる。

歯髄幹細胞を用いた歯髄再生を臨床に普及するためには、治療時の需要に応じて安全で高品質、さらに安価な製品として歯髄幹細胞を供給できることが望ましく、形質を維持したまま増幅が可能であれば、ドナー由来の歯髄幹細胞を増幅させて、安全性と品質を確保し、多くの患者に供給する同種移植による歯髄再生が望まれる。

これまで、間葉系組織幹細胞では、MHC class II の発現が低いことにより、免疫特権を持ち、T 細胞の増殖を起こさないことが知られている^{4), 5)}。また、近年、間葉系幹細胞が T 細胞の増殖、生存、活性化を促進するサイトカインである IL-2 の受容体を分解する因子を放出しており、それによって T 細胞の活性化が抑制され、免疫反応が抑制されると報告された⁶⁾。in vivo の実験において、皮下移植した組織幹細胞が長期間拒絶反応を示さないことも報告されている⁴⁾。さらに、歯髄幹細胞に関しては、免疫制御機能を持つことが示唆されている⁷⁾。

しかしながら、歯髄幹細胞から放出される免疫制御因子は未だ明らかにされておらず、また、歯髄幹細胞の免疫制御メカニズムも明らかではない。我々の予備的実験の結果、歯髄幹細胞(CD31⁻ SP 細胞)の培養上清が末梢血単核球(PMBC)の増殖を抑制し、免疫制御機能を持つことが示唆された。そこで、我々は同種移植による歯髄再生を目指して、歯髄幹細胞の免疫制御因子を明らかにし、その因子を利用した同種移植の可能性を検索するという着想に至った。

- 1) Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, et al. Tissue Eng Part A 2011; 17(15-16):1911-1920.
- 2) Nakashima M, Iohara K. Adv Dent Res.2011; 23(3):313-319.
- 3) Iohara K, Zhen L, Ito M, et al.

Regen Med. 2009; 4(3): 377-385.

- 4) Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Exp Hematol. 2002; 30(1):42-48.
- 5) Li L, Baroja ML, Majumdar A, et al. Stem Cells 2004; 22: 448-456.
- 6) Park MJ, Shin JS, Kim YH, et al. Stem Cell Rev. 2011; 7: 381-393.
- 7) Wada N, Menicanin D, Shi S, et al. J Cell Physiol. 2009; 219(3): 667-676.

2. 研究の目的

本研究は、歯髄幹細胞から放出される免疫制御因子を同定し、その因子を利用した同種移植の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト歯髄幹細胞分取

同意を得た後に智歯より歯髄組織を摘出し、酵素消化後、歯髄細胞を分離し、培養した (DPSCs)。この細胞から、G-CSF の遊走能を利用した、膜遊走分取法によって、膜分取歯髄幹細胞 (MDPSCs) を分取し、培養した。

ブタ歯髄、骨髓、脂肪 CD31⁻ SP 細胞分取

ブタ歯髄、骨髓、及び脂肪組織から細胞を酵素消化法にて分離後、フローサイトメーターにて Hoechst33342 を強く排出する SP (side population)画分中の CD31⁻細胞を分取し、培養した。

(2) リンパ球混合培養反応(mixed lymphocyte reaction: MLR)

同意を得た後、採血し、Lymphoprep Tube (Axis-Shield)にて、単核球 (PBMC)を比重遠心によって分離した。stimulator となる同種 PBMC を Mitomycin C (100µg/ml)で 1 時間、前処理し、細胞増殖を停止させ、培養上清を添加して、Cell Counting Kit-8 にて細胞増殖能を調べた。

歯髄、骨髓、脂肪幹細胞培養上清は、回収後、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (3K)を使用して約 70 倍に濃縮し、Bradford 法にてタンパク濃度を測定した。濃縮した培養上清を 5µg/ml になるように添加して MLR を行った。

(3) 培養上清中の免疫制御因子の探索

Real-time RT-PCR

ブタ歯髄、骨髓、脂肪 CD31⁻ SP 細胞から Trizol にて total RNA を抽出し、cDNA を合成した。Micro array の結果から、歯髄で発現量が高い遺伝子について、プライマーを設計し、Light Cycler (Roche)にて Real-time RT-PCR を行った。

Western Blotting

ブタ歯髄、骨髓、脂肪 CD31⁻ SP 細胞から、タンパクを抽出し、12%TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit (BIO-RAD)を使用して、電気泳動し、セミドライプロットング装置にて PVDF メンブレンにプロットを行った。1 次

抗体として、抗 MCP-1 抗体 (abcam) を使用した。

サイトカイン/ケモカイン定量

歯髄幹細胞培養上清濃縮液中のサイトカイン/ケモカインをタンパク質多項目同時測定システム (Millipore) を用い、MILLIPLEX[®] MAG Kit (Millipore) を使用して測定した。

(4) *in vitro* における炎症反応に対する制御能

ヒト歯髄幹細胞に IFN- γ (20ng/ml) + LPS (1 μ g/ml) を添加し、培養上清濃縮液、あるいは、MCP-1 (R&D systems) (100ng/ml) を添加し、22 時間培養した。同様に、ヒト急性単球性白血球細胞株 THP-1 細胞を PMA10⁻⁸M にて 2 日間マクロファージ様細胞に分化誘導し、IFN- γ (20ng/ml) + LPS (100ng/ml) を添加し、そこへ培養上清濃縮液、あるいは、MCP-1 (R&D systems) (100ng/ml) を添加し、46 時間培養した。培養後、total RNA を抽出し、cDNA を合成後、Applied Biosystems 7500 Real-time PCR systems にて Real-time RT-PCR を行った。

4. 研究成果

これまで、イヌ歯髄組織からフローサイトメトリーにて CD31⁺ SP 細胞や CD105⁺ 細胞を分取し、自家移植することで、歯髄組織が再生することを示してきた¹⁾⁻³⁾。しかし、歯髄再生療法を臨床応用するにあたり、これらの細胞は、フローサイトメトリーを使用するため、安全性に問題がある。そこで、歯髄幹細胞の G-CSF に対する遊走能を利用した、膜遊走分取法を開発した(文献 2)。この膜分取歯髄幹細胞 (MDPSCs) の免疫制御能について解析した。

フローサイトメトリーにて各種細胞表面マーカーを解析したところ、いずれも MHC class I については、陽性だが、CD40、CD80、CD86、MHC class II は発現が低く、ほぼ陰性であった(表 1)。このことから、歯髄幹細胞においても、骨髄、脂肪由来間葉系幹細胞と同様に、移植しても、宿主側の T 細胞等からの攻撃を受けにくいことが示唆された。

表 1 幹細胞表面マーカー陽性率

| | MDPSCs | DPSCs |
|--------------|----------------|----------------|
| | 陽性率 (%) | 陽性率 (%) |
| CD29 | 97.5 \pm 0.6 | 96.3 \pm 1.4 |
| CD31 | 0.0 \pm 0.0 | 0.6 \pm 0.6 |
| CD44 | 97.4 \pm 2.6 | 97.5 \pm 1.9 |
| CD73 | 97.9 \pm 1.4 | 97.4 \pm 1.4 |
| CD90 | 98.2 \pm 1.7 | 96.0 \pm 3.0 |
| CD105 | 97.8 \pm 0.4 | 55.6 \pm 8.7 |
| CXCR4 | 18.2 \pm 2.3 | 5.7 \pm 1.0 |
| G-CSFR | 58.9 \pm 6.2 | 10.6 \pm 1.8 |
| CD45 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 |
| CD40 | 0.0 \pm 0.0 | 0.3 \pm 0.0 |
| CD80 | 2.3 \pm 0.6 | 7.0 \pm 1.3 |
| CD86 | 0.8 \pm 0.3 | 0.6 \pm 0.2 |
| MHC class I | 97.9 \pm 1.3 | 95.2 \pm 0.2 |
| MHC class II | 0.3 \pm 0.2 | 1.0 \pm 0.4 |

次に、自己 PBMC とマイトマイシン C (MMC) 処理を行った他者 PBMC を混和し、そこへ各歯髄幹細胞培養上清を添加して、MLR を行った。その結果、歯髄幹細胞培養上清を添加することで、自己 PBMC の増殖が抑制された(図 1)。さらに、間葉系幹細胞の由来する組織による違いを比較するため、ブタ歯髄、骨髄、脂肪 CD31⁺ SP 細胞の培養上清を用いた MLR を行ったところ、歯髄 CD31⁺ SP 細胞培養上清添加時に最も自己 PBMC 増殖を抑制した(図 2)。

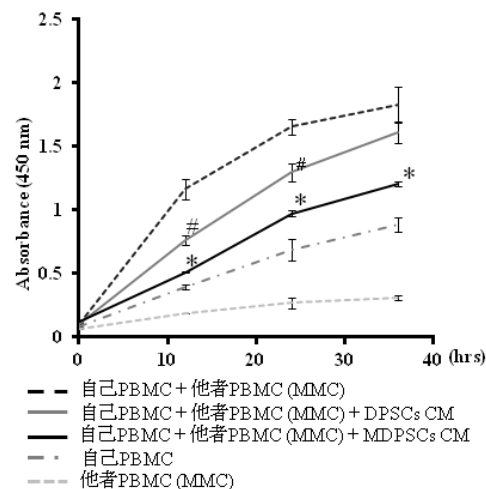


図 1 ヒト歯髄幹細胞培養上清を用いた MLR

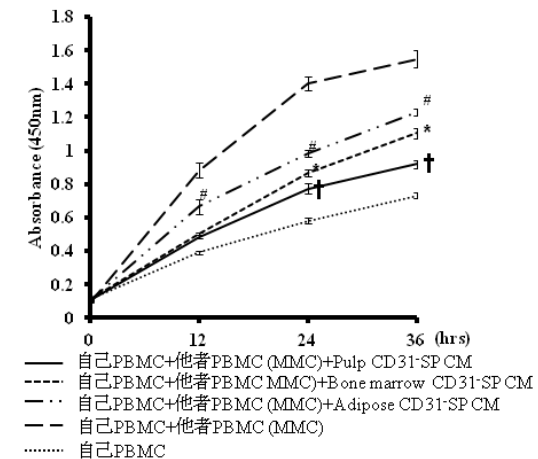


図 2 ブタ歯髄、骨髄、脂肪 CD31⁺ SP 細胞培養上清を用いた MLR

図 2 の結果を受けて、歯髄 CD31⁺ SP 細胞において、骨髄、脂肪 CD31⁺ SP 細胞と比較して発現が高い遺伝子をマイクロアレイにて解析し、それらの遺伝子について、さらに Real-time RT-PCR を行ったところ、下表の結果であった(表 2)。

表 2 ブタ歯髄、骨髄、脂肪 CD31⁺ SP 細胞における各種遺伝子発現

| Gene name | 歯髄/骨髄 | 歯髄/脂肪 |
|-----------|-------|-------|
| NOV/CCN3 | 0.1 | 0.7 |
| GM-CSF | 0.2 | 0.1 |
| NPY | 1.8 | 35.7 |
| MCPI | 2.0 | 4.3 |

また、ヒト歯髄幹細胞培養上清中のサイトカイン/ケモカインを定量したところ、MCP-1が他と比較して、非常に多く含まれていることがわかった(図3)。

さらに、ブタ歯髄、骨髄、脂肪 CD31⁺ SP細胞における MCP-1 タンパク発現を Western Blotting にて調べ、歯髄 CD31⁺ SP において最も高いことを確認した(図4)。

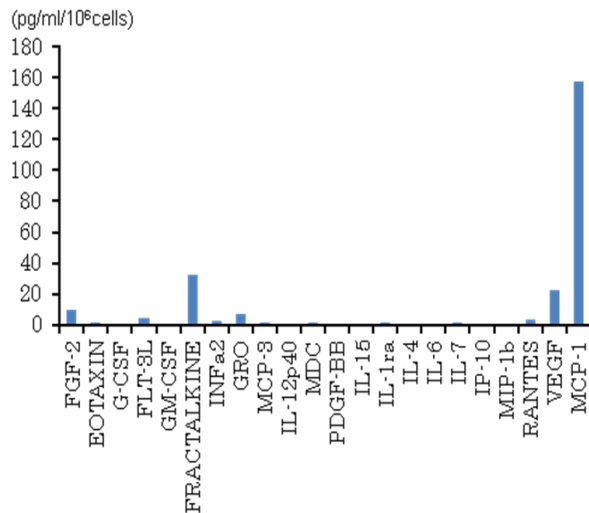


図3 歯髄幹細胞培養上清のサイトカイン/ケモカイン定量

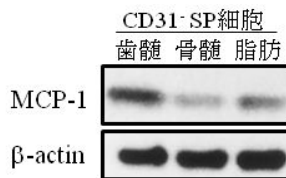


図4 ブタ歯髄、骨髄、脂肪 CD31⁺ SP細胞における MCP-1 タンパク発現の比較

これまでの報告から、MCP-1は、主に単球やT細胞等の組織浸潤等に関与していることが知られているが、免疫調節能(Zisman D.A., et al. J. Clin. Invest.1997)、また、ラット脊髄損傷モデルにおいて、組織修復、抗炎症反応に関与する M2 マクロファージの誘導に関与していることが報告されている (Matsubara K., et al. J. Neurosci. 2015)。

そこで、探索した結果、歯髄幹細胞培養上清に多く含まれ、骨髄、脂肪と比較して高発現であることから、MCP-1 リコンビナントタンパクを添加し、炎症性サイトカイン mRNA 発現を調べた。

ヒト歯髄幹細胞を IFN-γ と LPS にて刺激し、歯髄幹細胞培養上清、MCP-1 リコンビナントタンパク添加によって、免疫抑制に関与する *IDO*、*TGF-β* mRNA 発現が上昇した(図5A, B)。

マクロファージ様細胞に分化誘導した THP-1 細胞を IFN-γ と LPS にて刺激し、歯髄幹細胞培養上清、MCP-1 リコンビナントタンパク添加によって、炎症に関わる *IL-1β*、*TNF-α* mRNA 発現が低下し(図6A, B)、免疫

抑制に関わる *IL-10* mRNA 発現が上昇した(図6C)。以上の結果から、MCP-1 が歯髄幹細胞の免疫制御能に関わる因子の一つとして考えられることが示唆された。

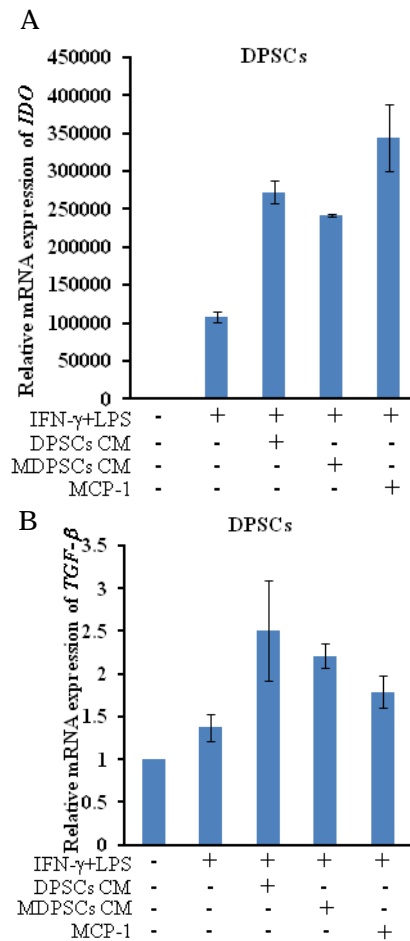
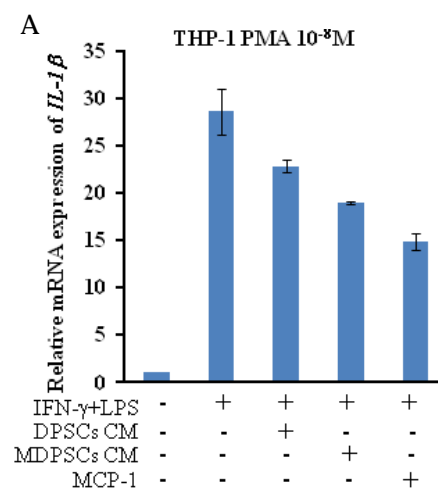


図5 IFN-γ、LPS 刺激した歯髄幹細胞における *IDO*、*TGF-β* mRNA 発現変化



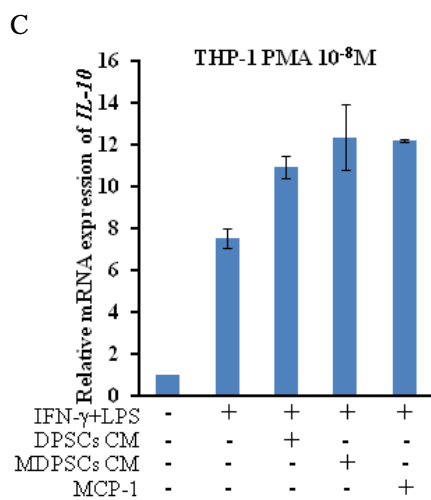
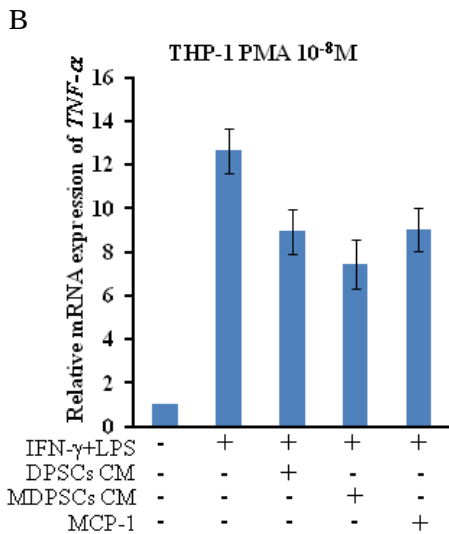


図6 IFN- γ とLPSにて刺激したマクロファージ様分化誘導 THP-1 細胞における *IL-1 β* 、*TNF- α* 、*IL-10*mRNA 発現変化

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 3 件)

1. Murakami M., Hayashi Y., Iohara K., Osako Y., Hirose Y., Nakashima M.: Trophic effects and regenerative potential of mobilized mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue as alternative cell sources for pulp/dentin regeneration. *Cell Transplant.* 査読有、2014, in press.

2. Murakami M., Horibe H., Iohara K., Hayashi Y., Osako Y., Takei Y., Nakata K., Motoyama N., Kurita K., Nakashima M.: The use of granulocyte-colony stimulating factor induced mobilization for isolation of dental pulp stem cells with high regenerative potential. *Biomaterials.* 査読有、2013, 34(36), 9036-9047.

3. Ishizaka R., Hayashi Y., Iohara K., Sugiyama M., Murakami M., Yamamoto T., Fukuta O., Nakashima M.: Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp. *Biomaterials.* 査読有、2013, 34(8), 1888-1897.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 村上真史、林勇輝、庵原耕一郎、竹内教雄、中島美砂子：イヌ歯髄、骨髄、脂肪幹細胞の抜髄後根管自家移植による歯髄再生能の比較、第140回日本歯科保存学会2014年度春季学術大会、大津、2014年6月20日

2. 村上真史、堀部宏茂、庵原耕一郎、林勇輝、大迫洋平、石坂亮、竹内教雄、栗田賢一、中島美砂子：優れた安全性と再生能を有するヒト歯髄幹細胞の分取法の開発、第60回日本臨床検査医学会学術集会、神戸、2013年11月3日

3. 村上真史、堀部宏茂、庵原耕一郎、林勇輝、大迫洋平、石坂亮、竹内教雄、栗田賢一、中島美砂子：新規膜遊走分取法を用いたヒト歯髄幹細胞の特徴化と歯髄再生に対する有用性の検討、第12回日本再生医療学会総会、横浜、2013年3月22日

4. 村上真史、堀部宏茂、庵原耕一郎、石坂亮、林勇輝、竹内教雄、栗田賢一、中村洋、中島美砂子：新規幹細胞分取法を用いたヒト歯髄幹細胞の特徴化と歯髄再生能、第136回日本歯科保存学会2012年度春季学術大会、宜野湾、2012年6月29日

5. 村上真史、庵原耕一郎、石坂亮、林勇輝、竹内教雄、中島美砂子：ブタ同一個体由来の歯髄、骨髄、脂肪幹細胞の形質の比較、第11回日本再生医療学会総会、横浜、2012年6月14日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 真史 (MURAKAMI, Masashi)

国立長寿医療研究センター・再生歯科医療研究部・研究員

研究者番号：30614531