

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：34408

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893273

研究課題名(和文) 乳歯歯髄由来未分化幹細胞における分化能の検討

研究課題名(英文) The differentiation ability in the undifferentiated stem cell from the human dental pulp cells of deciduous teeth

研究代表者

河合 咲希 (KAWAI, Saki)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70707067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウス・ヒトES細胞において未分化能を維持することが報告されている6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO)を用いて乳歯歯髄由来細胞を刺激し、細胞生存率(MTS assay)および、未分化能の検討(Real Time RT-PCR、フローサイトメトリー)を行った。フローサイトメトリーにて細胞のソーティングを行った結果、BIO刺激群と無刺激群との差が認められなかったため、別の培養条件の検討を行うこととした。現在、低酸素状態における乳歯歯髄細胞の未分化能について検討を行っている状態である。

研究成果の概要(英文)：In the past study, it was reported that 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) maintains undifferentiation ability in mouse and human ES cell. I examined the cell proliferation and undifferentiation ability in human dental pulp cells of deciduous teeth (hDPCs) was cultured with cell culture medium and BIO. We used MTS assay, Real time RT-PCR and Flow cytometry. We sorted hDPCs stimulated with BIO by Flow cytometry, but there was not the difference between hDPCs stimulated with BIO and hDPCs. Therefore I should examine the different culture condition. I investigate the undifferentiation ability of hDPCs in Hypoxia culture.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯髄 乳歯 未分化

1. 研究開始当初の背景

幹細胞の利用は近年の再生医療研究において注目されている。歯科領域では、その供給源として歯髄細胞の利用が検討されており、なかでも乳歯歯髄幹細胞は身体的に苦痛を伴うことなく採取でき、骨髄由来幹細胞に比べて高い増殖能を持ち、永久歯歯髄由来細胞と比較して増殖能や分化能に優れていることから再生医療への応用が期待されている。しかし、歯髄中に含まれる幹細胞は 0.4 ~ 0.8% と非常に少なく、幹細胞を利用するにはその多分化能や増殖能の維持・増強が必要である。さらに幹細胞は象牙芽細胞や骨芽細胞、軟骨細胞などへの分化能を有しており、乳歯歯髄由来の幹細胞においても様々な細胞への分化能の研究が進められている。

過去にグリコゲンシンターゼキナーゼ 3 に特異的な薬理的阻害剤である 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) はマウス・ヒト ES 細胞において未分化能を維持することが報告されている。BIO は未分化能の維持だけでなく、心筋細胞増殖の強化や、神経分化など、他の影響も示すことから様々な疾患において薬理的に可能性を秘めている。

BIO が抑制している GSK-3 は生体の様々な経路に関与しており、その中には未分化能維持に関与する Wnt 経路も含まれる。BIO は GSK-3 を抑制することにより Wnt 経路を活性化し未分化能を維持することと考えられており、ブタ臍臓由来間葉系幹細胞やヤギ精巢由来幹細胞においても未分化能を維持したことが報告されている。

私はこれまでに、BIO がヒト乳歯歯髄由来細胞の未分化能を維持することを明らかにした。しかし、この未分化能の維持が、細胞数によるものであるかを確認する必要がある。そして、BIO 刺激により得られた細胞が、他の細胞への分化能を有していれば再生医療への研究や臨床へ貢献できると考える。

2. 研究の目的

BIO を添加し培養した乳歯歯髄由来細胞の未分化能および他の細胞への分化能を明らかにすることで、さらに再生医療への研究や臨床へ貢献できると考える。

そこで今回、BIO 添加乳歯歯髄由来細胞の増殖能、未分化能を維持すること、それが細胞数により維持されているのかを解明することを目的として、細胞増殖能を検討するために MTS assay、幹細胞マーカー遺伝子の発現を確認するためにリアルタイム RT-PCR、間葉系幹細胞マーカー発現をフローサイトメトリーを用いて検討し、さらに BIO 刺激乳歯歯髄由来細胞のソーティングを行い未分化幹細胞数の検討を行う。

そして、BIO 刺激乳歯歯髄由来未分化幹細胞が他の細胞への分化能を有しているかを検討する目的で、BIO 刺激乳歯歯髄由来未分化幹細胞を間葉系幹細胞マーカーを用いてソーティングして得られた未分化幹細胞を用いて、各細胞への分化能の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄細胞の採取

乳歯および永久歯歯髄細胞は実験に関して十分に説明し本人や保護者の同意を得た後、乳歯は歯根が 2/3 以上残存するう蝕のない乳歯、永久歯は矯正治療や咬合誘導等の理由によって抜去されるう蝕のない永久歯より採取する。採取に関してはすでに、大阪歯科大学において医の倫理委員会の承認 (大歯医倫理 110713 号) を得ている。採取した歯髄組織をフラスコに付着させ増殖してきた細胞を初代歯髄由来細胞とし、その後、10cm ディッシュで細胞を培養する。本研究には 3 - 7 継代した細胞を用いる。

(2) BIO 刺激乳歯歯髄由来細胞の細胞生存率の測定

BIO 刺激ヒト乳歯歯髄細胞において、MTS assay により細胞生存率の検討を行う。なお BIO の濃度は、0.5、1.0、1.5、2.0 とした。ヒト乳歯歯髄由来細胞を 96well ディッシュに播種し、BIO 添加し 2 日後に MTS 試薬を添加する。1 時間後にマイクロプレートリーダーを使用し計測を行う。

(3) 未分化マーカー発現の測定

BIO 刺激ヒト乳歯歯髄由来細胞および、ヒト永久歯歯髄由来細胞における未分化マーカー遺伝子 Oct3/4、sox2、c-myc 遺伝子発現変動をリアルタイム RT-PCR を行い、step one plus にて発現変動の検討を行う。

ヒト乳歯歯髄由来細胞を 12 well plate に播種し、コンフレント時に BIO を 0.5、1.0、1.5 μ M の濃度で添加する。添加後 2 日後にリアルタイム RT-PCR を行った。なお、指標として GAPDH を用いた。

(4) 間葉系幹細胞マーカー発現の検討

BIO 刺激ヒト乳歯歯髄由来細胞において、CD44、CD90、STRO-1 抗体を用いてフローサイトメトリーを行い検討する。

ヒト乳歯歯髄由来細胞を 6cm ディッシュに播種し、コンフレント時に BIO を添加した。48 時間後に CD44、CD90、STRO-1 抗体を用いてフローサイトメトリーを行った。

(5) 間葉系幹細胞マーカーによるソーティング

CD44、CD90 を用いて、BIO 刺激ヒト乳歯歯髄由来細胞のソーティングを行う。

(6) BIO 刺激乳歯歯髄由来未分化幹細胞の分化能の検討

BIO 刺激乳歯歯髄由来細胞からソーティングして得られた未分化幹細胞の分化能を検討する。脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化培地を用いて培養を行う。そして分化能の検討を、Oil Red 染色、アリザリンレッド染色、アグレカンによる染色を行い検討する。

研究開始当初の予定では、BIO 刺激乳歯歯髄由来細胞をソーティングし培養する予定であったが、BIO 刺激群と無刺激群との間に大きな差が認められなかった結果、別条件での培養環境の検討が必要だと考えた。最近の研究において、低酸素状態で培養することにより、歯髄由来細胞や歯根膜由来細胞において、その幹細胞特性を維持できることが報告されており、現在は低酸素培養下でのヒト乳歯歯髄由来細胞の未分化能の検討を行っている。

(7) 低酸素培養における乳歯歯髄由来細胞の細胞増殖能の検討

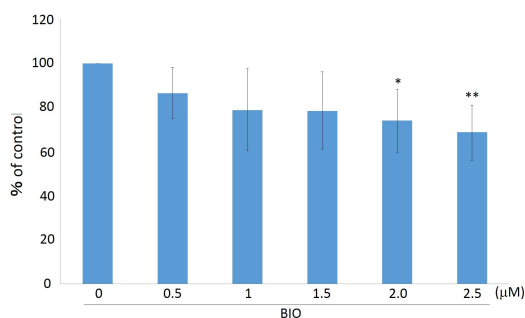
ヒト乳歯歯髄由来細胞を 96well プレートに播種し、低酸素下にて培養を行い、コンフルエント時に MTS Assay を行った。

(8) 低酸素培養における未分化マーカー遺伝子の発現変動

ヒト乳歯歯髄由来細胞を 12well プレートに播種し、低酸素下にて培養を行い、コンフルエント時にリアルタイム RT-PCR を行い step one plus にて解析を行った。

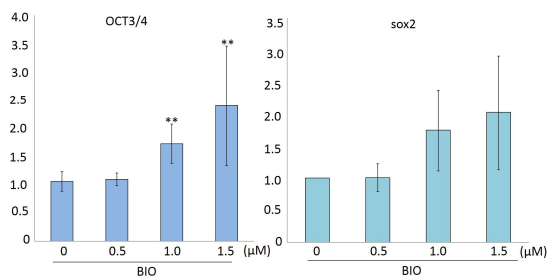
4. 研究成果

(1) BIO 刺激乳歯歯髄由来細胞の細胞増殖能の検討



ヒト乳歯歯髄由来細胞において BIO は 0.5、1.0、1.5 μM の濃度では細胞増殖能に有意な変化は認められなかった。

(2) BIO 刺激乳歯歯髄由来細胞における未分化マーカー遺伝子の発現変動



未分化マーカーである Oct4、sox2 は、BIO 1.0、1.5 μM 刺激乳歯歯髄由来細胞において、発現増強が認められた。なお、c-Myc 遺伝子に関しては有意に減少していた。

(3) 間葉系幹細胞マーカーの発現検討

乳歯歯髄由来細胞の BIO 1.0 μM 刺激時においては、CD44、CD90 は有意な増加を認めたが、STRO-1 においては大きな変化を認めなかった。

(4) 間葉系幹細胞マーカーによるソーティング

フローサイトメトリーにより、CD44、CD90 の増加が認められたので、ソーティングは CD44、CD90 抗体を用いて行うこととしたが、思うようにソーティングできなかった。その際、BIO 刺激群と無刺激群との間に大きな変化が認められなかった。原因の追究、および、BIO 刺激時において別の培養条件の検討が必要であると考え、低酸素培養による検討を行うこととした。低酸素培養によるヒト乳歯歯髄由来細胞の細胞増殖能の検討および、未分化マーカー遺伝子の発現増強の検討を行っている状態である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

原田京子、河合咲希、竹安正治、阿部洋子、大東希好、有田憲司

乳歯歯髓由来細胞における SSEA-3 発現について
第 53 回日本小児歯科学会大会
平成 27 年 5 月 21 日
広島国際会議場（広島県 広島市）

W.Xu, J.Chen, Q.Chen, L.Xu, W.Zhao, B.Wu,
S.Kawai, K.Harada, Y.Fang, K.Arita
Establishment of an experimental model of
pulp revascularization in mice
第 62 回国際歯科研究学会日本部会総会学術
大会
平成 26 年 12 月 4～5 日
KKR ホテル大阪（大阪府 大阪市）

〔図書〕（計 0 件）

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 咲希 (KAWAI Saki)
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：70707067

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし