

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463106

研究課題名(和文) 乳歯歯髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化機転の解明

研究課題名(英文) transdifferentiation mechanism of stem cells from human exfoliated deciduous teeth

研究代表者

菊入 崇 (Kikuri, Takashi)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：10322819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、乳歯歯髄由来間葉系幹細胞の分化転換機構を明らかにし、臨床応用を前提とした乳歯歯髄由来間葉系幹細胞を用いた有効的な骨組織再生療法を構築するため実験を行った。乳歯歯髄由来幹細胞を継代したところ、継代を重ねるごとに間葉系幹細胞の表面マーカーを発現している細胞数は減少する傾向が認められた。しかし、乳歯歯髄由来幹細胞に対して薬剤によりWnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化すると、これらの表面マーカーの陽性率が上昇した。乳歯歯髄由来間葉系幹細胞の幹細胞として可塑性の維持が可能である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)： In this study, we elucidated the mechanism underlying the transdifferentiation of human exfoliated deciduous teeth and conducted experiments to establish an effective bone tissue regeneration therapy using human exfoliated deciduous teeth for clinical application. When human exfoliated deciduous teeth was subcultured, we found that the number of cells expressing the surface marker of mesenchymal stem cells tended to decrease with each passage. However, activation of the Wnt signaling pathway by human exfoliated deciduous teeth antagonist increased the rate of positivity for this surface marker. These results suggest that human exfoliated deciduous teeth could maintain plasticity as stem cells.

研究分野：歯学

キーワード：歯学 乳歯歯髄由来間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の組織再生に関する研究の進展は著しく、さらなる再生医療技術の確立することで、一般臨床においてもその実施が普及することが予想されている。口腔領域においても歯牙、歯槽骨、歯根膜、唾液腺などの口腔組織を再生することが可能となり、以前の治療技術では実現不可能な治療を行うことが期待されている。

間葉系幹細胞は、骨髄や臍帯血、脂肪組織中の間葉に存在している幹細胞であり、間葉系に属する細胞への分化能を持つ。そのため、骨や血管、筋肉の再構成などの再生医療の幹細胞資源として使用されることが期待されている。しかし、骨髄や脂肪組織中の間葉に存在している間葉系幹細胞を得るためには、何らかの方法により骨髄組織や脂肪組織から直接採取しなければならず、身体に外科的侵襲を加えなければならない。また臍帯血中の間葉系幹細胞の採取のチャンスは出産時のみと限られている。乳歯歯髄由来幹細胞は、乳歯の歯髄組織中に存在する間葉系幹細胞であり、脱落した乳歯の付着する歯髄組織中から抽出することが可能であるため、採取のために身体に外科的侵襲を加える必要がない特徴を有している。また、骨髄中に存在している間葉系幹細胞と比較しても、高い細胞分裂能と多分化能を有していることが知られている。さらに、乳歯歯髄由来幹細胞の分泌物の中には、血管誘導能、抗炎症作用、免疫機能調節を有するタンパクが含まれていることが分かっている。このように、乳歯歯髄由来幹細胞は再生医療の幹細胞ソースと優れた特徴を有していると考えられる。

しかし、現時点において乳歯歯髄由来幹細胞を用いた再生医療の実用化には技術的に解決しなければならない課題も多く存在していることも指定されている。

2. 研究の目的

乳歯歯髄由来間葉系幹細胞は、骨組織の再生医療における有用な幹細胞資源であるが、移植後にどのような分化転換機構を経て骨細胞へ誘導するか、その作用機序は明らかになっていない。通常、幹細胞による再生医療は、目的の細胞に選択的に誘導されるように幹細胞の移植を行う。しかし、移植された幹細胞が、目的の組織にどのように分化するか、その分化誘導機構に関しては明らかにされていない。将来、幹細胞を用いた骨再生医療を実施するためには、この分化転換機構を解明する必要がある。本研究では、造血幹細胞との微小環境(ニッチ)の構築に焦点を絞り、乳歯歯髄由来間葉系幹細胞の分化転換機構を明らかし、臨床応用を前提とした乳歯歯髄由来間葉系幹細胞を用いた有効的な骨組織再生療法の基礎理論を構築するため実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞の採取および細胞培養

歯髄由来間葉系幹細胞の採取は、北海道大学病院歯科小児・障害者歯科外来において、保護者に対して実験内容について十分に説明を行い、その主旨に同意を得たのちに、交換期のため抜去が必要な健全乳歯あるいは矯正治療のため抜去が必要な永久歯より採取した。採取に関しては、北海道大学病院の倫理委員会の承認を受けている。乳歯あるいは永久歯から歯髄組織を剥離し、剥離した歯髄組織を細断、酵素処理を行い、遠心分離によって細胞のみ回収。回収した細胞を -MEM 培地を用いて細胞培養プレートに播種。播種後、培養プレートに付着しコロニーを作成した細胞を実験に用いた。

造血幹細胞の採取は、メス C3H/He Slc マウスより採取した。動物実験に関しては北海道大学動物実験委員会の承認を受けている。回収した骨髄細胞に対して、Anti-Sca-1 MicroBead Kit (Milteny Biotec 社) を用い

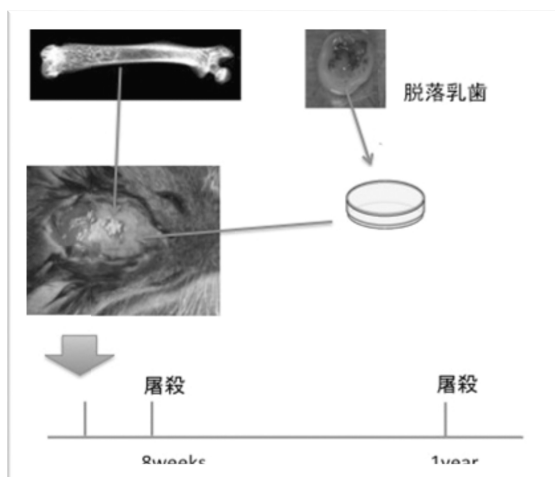
て造血幹細胞を分離した。

(2) *in vitro*における検討

継代後の幹細胞を培養プレートに播種し、各々分化培地に交換し多分化能について比較検討を行った。分化培地には Osteoblast Differentiation Medium(DS Pharma Biomedical) Adipocyte Differentiation Medium (DS Pharma Biomedical)を使用した。分化培地交換3週間後に、骨芽細胞は Alizarin Red 染色および von Kossa 染色を行い、各群の石灰化度を比較した。また、骨形成の指標となる各種遺伝子の発現を比較するため、real time-PCR を行い mRNA の発現量を比較した。脂肪細胞は Oil Red O 染色を行い、脂肪細胞への分化度を比較した。

(3) *In vivo*における骨組織誘導実験

乳歯髄由来間葉系幹細胞と造血幹細胞を第三リン酸カルシウム顆粒に混和した細胞凝集複合体を NOD/ShiJcl マウスの頭頂部に人工的に作成した骨欠損部に移植を行った。移植8週間後および1年後にマウスを屠殺し、移植体を EDTA にて脱灰。脱灰後、通法に従い切片を作成、HE 染色を行い形成された新生骨について組織学的に検討した。



上図：実験方法の略図

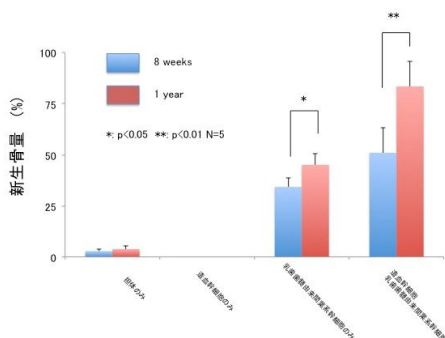
4. 研究成果

乳歯髄由来幹細胞の初代培養からコロニーを形成した細胞を継代し、継代ごとにお

ける間葉系幹細胞の表面マーカーである Stro-1・CD44・CD146・CD166 の発現について FACS 解析を用いて比較した。継代を重ねるごとに、これらの表面マーカーを発現している細胞数は減少する傾向が認められた。しかし、継代を重ねた乳歯髄由来幹細胞に対して造血幹細胞を加え共存培養を行ったところ、これらの表面マーカーの陽性率が上昇した。乳歯髄由来間葉系幹細胞の生細胞数に対する造血幹細胞の影響を検討した。造血幹細胞が乳歯髄由来間葉系幹細胞に対して細胞障害を及ぼすか培養液中の乳酸脱水素酵素(LDH)活性を測定したところ、造血幹細胞は乳歯髄由来間葉系幹細胞の生死にはほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった。生細胞数には変化がなく、幹細胞様の性質を持つ細胞の比率が増加したことは、造血幹細胞により継代後の乳歯髄由来間葉系幹細胞を脱分化することにより、自己複製能を有する幹細胞様細胞が増加した結果と推測された。さらに造血幹細胞添加群の乳歯髄由来間葉系幹細胞は、各種分化誘導培地で培養することによりそれぞれの分化マーカー遺伝子の発現が克進し、短時間で各系統の細胞に分化することが可能であった。このことから、造血幹細胞を作用させた乳歯髄由来間葉系幹細胞は、一度多分化能が低下した細胞が再び多分化能を獲得したと考えられた。

NOD/ShiJcl マウスの頭頂部に人工的に作成した骨欠損部に、乳歯髄由来間葉系幹細胞を移植し、継時的に骨欠損部に再生した骨組織について組織学的に検討を行った。結果、乳歯髄由来間葉系幹細胞のみを移植した実験群では、1ヶ月後には移植した担体の周囲にわずかに石灰化した層板状の骨様構造物が確認された。2ヶ月後には担体の周囲に広範囲な石灰化が亢進した骨様組織が再生していることが確認されたが、担体は吸収されずに残存したままであった。一方、乳歯髄

髄由来間葉系幹細胞とともに造血幹細胞を移植した実験群では、1ヶ月後において担体の一部が吸収され、その周囲に成熟した骨様組織が再生していた。さらに2ヶ月後には担体の大部分はほぼ吸収されており、形成した骨欠損部は再生した新生骨に置き換わっていた。



間葉系幹細胞のマーカに対する免疫染色を行ったところ、乳歯髄由来間葉系幹細胞と造血幹細胞との共存培養を行った実験群では乳歯髄由来間葉系幹細胞を単独培養した実験群と比較して、細胞表面に幹細胞マーカーを強く発現している細胞が多く存在していることが判明した。

以上の結果から、乳歯髄由来間葉系幹細胞と造血幹細胞間には何らかの相互作用が存在し、乳歯髄由来間葉系幹細胞の幹細胞として可塑性を維持している可能性が示唆された。つまり、移植した乳歯髄由来間葉系幹細胞に存在するある種の細胞が造血幹細胞によるある種のシグナルの影響により未分化な状態、いわゆる多分化能を有する幹細胞様細胞に脱分化され、骨組織再生に必要な細胞成分を供給する役割を担っている可能性が示唆された。

さらに、造血幹細胞の乳歯髄由来間葉系幹細胞への作用機序について検討を行った。造血幹細胞を用いないで乳歯髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化能が維持されるか再現を試みた。実験の結果、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を活性化することで、骨芽細胞への分化能が増強することが判

明した。この実験結果から、乳歯髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化過程における造血幹細胞との相互作用は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路が関与していることが示唆された。

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0件)

[学会発表](計0件)

[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:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菊入 崇 (KIKUJIRI、Takashi)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号： 10322819

(2)研究分担者

吉村 善隆 (YOSHIMURA、Yoshitaka)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号： 30230816

(3)連携研究者

なし