

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659875

研究課題名(和文) 歯乳頭由来幹細胞(SCAP)のニッチの解析による新たな間葉系幹細胞維持機構の解明

研究課題名(英文) The identification of maintenance mechanism of mesenchymal stem cells based on the niche concept of SCAP.

研究代表者

園山 亘(Sonoyama, Wataru)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：40325121

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)：生体内では、多くの器官に組織幹細胞が存在し、組織の恒常性の維持や修復に関与し、これらの組織幹細胞は、それぞれの組織内でニッチと呼ばれる特有な微小環境中に存在し、その幹細胞性を維持していることがよく知られている。そこで我々は幹細胞ニッチに関わる因子として、Ccn4遺伝子に注目し、Ccn4が歯の発生や創傷治癒に関与している可能性を明らかとした。今後、Ccn4遺伝子とニッチの維持機構の関係を明らかにしていく予定である。

研究成果の概要(英文)：It is well known that adult tissue stem cells, which exist in the niche, are involved in the maintenance or restoration of homeostasis in various tissue. In this research, we focused Ccn4 gene and that revealed that Ccn4 gene could be involved in tooth development and wound healing. In future, we will clarify the relationship between Ccn4 gene and maintenance mechanism of niche.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 歯科医用工学・再生歯学

キーワード：幹細胞性維持機構 ニッチ SCAP

## 1. 研究開始当初の背景

生体内では多くの器官に組織幹細胞が存在し、組織の恒常性の維持や修復に関与していることが報告されている。これらの組織幹細胞は、それぞれの組織中でニッチ (niche) と呼ばれる特有の微小環境中に存在し、その幹細胞性を維持していることがよく知られている。骨髄由来間葉系幹細胞においては、そのニッチは組織学的に血管近傍に位置すると考えられており、血管内皮細胞との関連が強く推測され、多くの研究が行われている。

申請者は、これまでに発育途中のヒト大臼歯の根尖部に残存する歯乳頭組織から新規幹細胞である歯乳頭由来幹細胞 (stem cells from apical papilla; SCAP) を発見した (Sonoyama *et al.*, PLoS One, 1, e79, 2006, Sonoyama *et al.*, Journal of Endodontics, 34, 166-171, 2008)。この SCAP は、骨髄や歯髄など、他の組織由来の間葉系幹細胞と異なり、血管数のたいへん少ない組織から得られるもので、その幹細胞性維持に関わるニッチも血管近傍に存在するのではないものと考えられている。

## 2. 研究の目的

そこで、本申請研究は、SCAP のニッチを組織学的・細胞生物学的に明らかにし、間葉系幹細胞の新たな幹細胞性維持機構を明らかにすることを目的に計画されたものである。

## 3. 研究の方法

SCAP のニッチ形成メカニズムを明らかにするためには、歯の発生メカニズムを明らかにすることが必須である。そこで、再生や創傷治癒に関与が報告されている様々な因子の歯の発生への関与を明らかにするため、*in situ hybridization* を実施した。つまり、胎齢 13.5, 14.5, 18.5 日の ICR 系マウスの頭部サンプルを 4% パラホルムアルデヒドにて固定後、サンプルを段階的に希釈したエタノール (25%, 50%, 75%, 100%) 中で脱水処理した。組織切片の作製にあたっては、胎仔サンプルをキシレンにて脱脂処理した後にパラフィン包埋を行い、厚さ 7  $\mu\text{m}$  の前頭断切片を作製、シランコーティングを施したスライドガラスにマウントし、それぞれの遺伝子のプローブを用い、*in situ hybridization* を実施した。

興味のある遺伝子に関し、遺伝子欠損マウスを入手し、歯の発生に与える影響を組織学的に検討した。

## 4. 研究成果

*in situ hybridization* の結果、CCN ファミリー遺伝子の一つである *wnt*-induced secreted protein (WISP)-1/CCN4 が E14.5 日の上皮と間葉の境界に高発現していることが確認された (図 1)。また、発生メカニズム

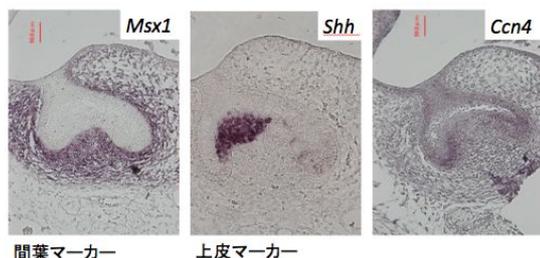


図1 歯胚発生期における上皮のマーカーである *Shh* と間葉のマーカーである *Msx1* および *Ccn4* の mRNA の発現パターンを示す。

が類似する毛根においても *Ccn4* の発現が確

認められた。そこで、*Ccn4* 遺伝子ノックアウトマウスにおいて、歯胚発生に影響があるか組織学的に検討した。その結果、E14.5 においてノックアウトマウスにおいて若干歯胚発生が遅れている像が観察されたが、E18.5 では発生にほぼ差は認められなかった(図2)。また、創傷治癒に幹細胞ニッチが大きく関与しているという報告から、*Ccn4* ノックアウトマウスに皮膚欠損を作製し、創傷治癒に与える影響を検討した。その結果、ノックアウトマウス群において、皮膚創傷治癒は有意に抑制された。以上より、*Ccn4* 遺伝子が幹細胞ニッチに関わり、組織発生や創傷治癒を制御している可能性が示唆された。今後は、*Ccn4* 遺伝子と間葉系幹細胞ニッチの関わりを詳細に検討するのみならず、*Ccn4* 遺伝子の歯の発生への関与を明らかにしていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Noda K, Arakawa H, Maekawa K, Hara ES, Yamazaki S, Kimura-Ono A, Sonoyama W, Minakuchi H, Matsuka Y, Kuboki T  
Identification of risk factors for fracture of veneering materials and screw loosening of implant supported fixed partial dentures in partially edentulous cases. *Journal of Oral Rehabilitation*:査読有:40(3): 214-220、2013  
Doi:10.1111/joor.12029
2. Yamazaki S, Arakawa H, Maekawa K, Hara ES, Noda K, Minakuchi H, Sonoyama W, Matsuka Y, Kuboki T  
A retrospective comparative ten-year study of cumulative survival rates of remaining teeth in large edentulism treated with implant-supported fixed partial dentures or removable partial dentures. *Journal of Prosthodontic Research*:査読有:57(3):156-161、2013, doi: 10.1016/j.jpor.2013.03.003.
3. Yamazaki S, Arakawa H, Maekawa K, Hara ES, Noda K, Minakuchi H, Sonoyama W, Matsuka Y, Kuboki T, Retrospective investigation of the remaining teeth status of

patients with implant-supported fixed partial dentures in unilateral free-end edentulism. *Journal of Prosthodontic Research*: 査読有: 57(4): 262-267、2013. Doi: 10.1016/j.jpor.2013.08.001.

4. Hara ES, Ono M, Eguchi T, Kubota S, Pham HT, Sonoyama W, Tajima S, Takigawa M, Calderwood SK, Kuboki T. miRNA-720 controls stem cell phenotype, proliferation and differentiation of human dental pulp cells. *PloS One*: 査読有:8(12) e83545:1-11、2013., 10.1371/journal.pone.0083545

5. Egusa H, Sonoyama W, Nishumura M, Atsuta I, Akiyama K, Stem cell in dentistry—part I: stem cell sources., *Journal of Prosthodontic Research*; 査読有: 56:151-165、2012. 10.1016/j.jpor.2012.06.001

6. Egusa H, Sonoyama W, Nishumura M, Atsuta I, Akiyama K., Stem cell in dentistry—part II: Clinical applications. *Journal of Prosthodontic Research*; 査読有:56:229-248、2012, 10.1016/j.jpor.2012.10.001

7. 松香芳三、縄稚久美子、木村 彩、完山 学、水口 一、三野卓哉、丸濱功太郎、前川賢治、藤澤拓生、園山 亘、峯 篤史、菊谷 武、窪木拓男、施設に入所している要介護高齢者の問題点を抽出するチュートリアル演習の試み、*老年歯科医学*: 査読有:26(1):36-45、2011

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Shinkawa S, Uchibe K, Ono M, Sonoyama W, Hara ES, Yoshioka Y, Ueda J, Asahara H, Kuboki T. Expression Pattern of Hox Genes During Mouse Tooth Development. *岡山医療教育研究国際シンポジウム*:2013年9月22日~2013年9月23日、岡山、日本
2. Hara ES, Ono M, Sonoyama W, Eguchi T, Pham HT, Calderwood SK, Kuboki T. miRNA-720 controls stem cell phenotype, proliferation and differentiation of human dental pulp cells.、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会:2013年9月20日~2013年9月22日、岡山、日本
3. 大野充昭、前田あずさ、正木明日香、吉岡裕也、園山 亘、窪木拓男、Young MF、CCN4/WISP-1 の骨形成における役割、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013年9月23日、岡山、日本
4. Shinkawa S, Uchibe K, Ono M, Sonoyama W, Hara ES, Yoshioka Y, Ueda J, Asahara H,

Kuboki T、Expression Pattern of Hox Genes During Mouse Tooth Development.、2<sup>nd</sup> Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region:2013年8月21日～2013年8月23日、Bangkok、Thailand

5. 中島 隆、大野充昭、園山 亘、笈田育尚、Emilio S.Hara、前川賢治、窪木拓男、抜歯窩肉芽組織からの新規間葉系幹細胞の同定、平成 25 年度社団法人日本補綴歯科学会創設 80 周年記念第 122 回学術大会:2013 年 5 月 18 日～2013 年 5 月 19 日、福岡、日本

6. Sonoyama W、Biological Bone Augmentation/Regeneration around Dental Implants.、Biennial Joint Congress of CPS-JPS-KAP、2013 年 4 月 12 日～2013 年 4 月 17 日、Jeju、Korea

7. Pham TH、Ono M、Hara ES、Ueda M、Sonoyama W、Lieu PV、Kuboki T、A comparative analysis of the effect of rhTNF- $\alpha$  treatment on the stem cell phenotype of cells derived from dental pulp,periodontal ligament and bone marrow、The Asean Plus and Tokushima Joint International Conference、2012 年 12 月 7 日、Yogyakarta、Indonesia

8. Pham TH、Ono M、Hara ES、Ueda M、Sonoyama W、Lieu PV、Kuboki T、Effect of transient TNF- $\alpha$  treatment on the stem cell phenotype of human periodontal ligament cells and bone marrow stromal cells.、第 10 回日本再生歯科医学会総会・学術大会、2012 年 9 月 2 日、神戸、兵庫

9. Ueda M、Fujisawa T、Ono M、Masaki A、Miki H、Sonoyama W、Kuboki T、Human Dental Pulp Cells Increase Stem Cell-like Phenotype By TNF- $\alpha$ 、90<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR、2012 年 6 月 24 日、Iguacu Falls、Brazil

10. 上枝麻友、藤澤拓生、大野充昭、正木明日香、三木春奈、園山 亘、窪木拓男、炎症環境による歯髄細胞の幹細胞化—歯髄細胞分化に与える TNF- $\alpha$  の影響—、平成 24 年度社団法人日本補綴歯科学会第 121 回学術大会、2012 年 5 月 26 日、横浜、日本

11. 上枝麻友、藤澤拓生、大野充昭、正木明日香、三木春奈、園山 亘、窪木拓男、歯髄細胞のリプログラミングに対する TNF- $\alpha$  の効果、平成 23 年度社団法人日本補綴歯科学会 中国・四国支部学術大会、2011 年 9 月 4 日、岡山、日本

12. 園山 亘、口腔機能の回復を目指した再

生歯科医療、九州歯科大学 最新生命科学特別講義、2011 年 12 月 20 日、小倉、日本

13. 中島 隆、大野充昭、園山 亘、笈田育尚、Emilio S.Hara、前川賢治、窪木拓男、抜歯窩肉芽組織からの新規間葉系幹細胞の同定、第 29 回日本骨代謝学会学術大会、2011 年 7 月 28 日、大阪、日本

14. 園山 亘、自己組織幹細胞による歯の機能再生、社団法人日本補綴歯科学会第 120 回記念学術大会、2011 年 5 月 21 日、広島、日本

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：新規間葉系幹細胞  
発明者：窪木拓男、大野充昭、園山 亘、中島 隆、笈田育尚  
出願人：国立大学法人 岡山大学  
種類及び番号：特許第 4859078 号  
出願：2011 年 5 月 8 日  
広報発行日：2012 年 1 月 18 日  
公開：2012 年 12 月 10 日

取得状況(計 0 件)

〔その他〕特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

園山 亘 (Sonoyama Wataru)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：40325121

(2)研究分担者

窪木 拓男 (Kuboki Takuo)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00225195

大野 充昭 (Ono Mitsuaki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60613156