

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861895

研究課題名(和文) 予期的に分離した歯髄幹細胞のin vivoにおける評価と顎骨壊死治療への応用

研究課題名(英文) Evaluation of prospectively isolated dental pulp stem cells in vivo and application to jawbone necrosis therapy

研究代表者

安居 孝純 (YASUI, TAKAZUMI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：80348771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：従来の接着培養法による歯髄幹細胞の分離では、血球系や成熟細胞等が混入するため、歯髄幹細胞の本質や再生能力を解明することに限界があると考えられる。本研究では、フローサイトメトリーにて歯髄組織より高純度の歯髄幹細胞を予期的に分離した。LNGFR Low+/THY-1 High+の分画より分離した細胞は高純度のコロニー形成細胞の集団であり、高い増殖能と多分化能を有することが明らかになった。また、この細胞はマウス頭蓋骨欠損モデルにおいて骨再生を促進した。このことからLNGFR Low+/THY-1 High+細胞は骨再生治療において優れたソースとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human dental pulp stem cells (hDPSCs) isolated by plastic adherence, frequently contain contaminating hematopoietic cells and mature cells, which has limited our ability to investigate their basic biology and regenerative properties. In the present study, we prospectively isolated a pure population of hDPSCs from human dental pulp by flow cytometry. Prospectively isolated, dental pulp-derived LNGFR Low+/THY-1 High+ cells represent a highly enriched population of clonogenic cells; notably, the isolated cells exhibited high proliferation and multi-lineage differentiation potential in vitro. The cells also promoted new bone formation to heal critical-size calvarial defects in vivo. These findings suggest that LNGFR Low+/THY-1 High+ dental pulp-derived cells provide an excellent source of material for bone regenerative strategies.

研究分野：再生医学

キーワード：歯髄幹細胞 細胞表面マーカー フローサイトメトリー 骨再生

### 1. 研究開始当初の背景

歯髄には、骨髄と同様に骨・軟骨・脂肪等への多分化能を有する幹細胞の存在が知られている。これらの歯髄幹細胞(以下 DPSC)は、増殖能が高く、比較的採取しやすいため、組織再生のための細胞ソースとして盛んに研究が行われている。

しかしながら、それらの殆どが歯髄を培養皿上で培養後、付着増殖した細胞を DPSC とみなす接着培養法により細胞が分離されている(Gronthos et al., Proc Natl Acad Sci. 2000)。そのため、前駆細胞の混入や培養による性質変化の可能性が否定できず、実験の再現性に欠けるなど、DPSC の本質を明らかにするには不十分であると考えられる(d'Aquino et al., Cell Death Differ. 2007; Yu et al., Mol Ther. 2010)。また、臨床応用を考えた場合にも、雑多な細胞集団を移植した場合には、細胞の分化、増殖能が一定でなく組織再生能力が不安定となることが予想される。そこで、歯髄から培養を経ることなく直接的に幹細胞を分離する方法(予期的分離法)を確立するためにヒト歯髄幹細胞(hDPSC)に特異的な細胞表面マーカーを同定する研究を行ってきた。骨髄では、慶應義塾大学にてヒト骨髄間葉系幹細胞を分離するための細胞表面マーカーとして Low-affinity nerve growth factor receptor(LNGFR, CD271)、THY-1(CD90)が有効であることを同定している(Mabuchi et al., Stem Cell Rep. 2013)。これらのマーカーを用いて、歯髄より培養を経ることなく直接的に幹細胞を分離する方法(予期的分離法)の確立を目指し研究を行った(図1)。その結果、LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>の細胞集団より分離した細胞は高いコロニー形成能を示した(図2, 3)。この細胞集団は、骨髄細胞にはみられない細胞集団であり、骨髄間葉系幹細胞とは異なる細胞集団であると考えられた(図2)。本研究期間では、予期的に分離した LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞の再生医療への応用を目指し、*in vivo*における細胞増殖能および骨形成能について検討した。

図1(予期的分離法)

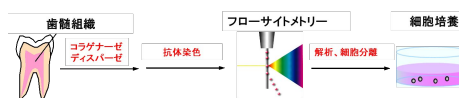


図2(歯髄と骨髄のFACSプロファイル)

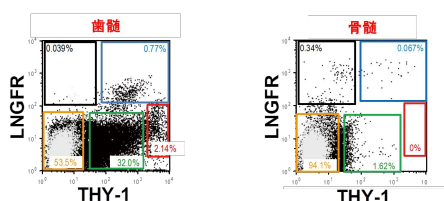
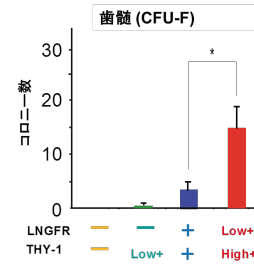


図3(各分画のコロニー数)



### 2. 研究の目的

フローサイトメトリーによりヒト歯髄から培養を経ることなく直接的に分離した細胞を免疫不全マウスに移植し、細胞増殖能や骨形成能を検討することを目的とした。幹細胞を用いた再生医療への臨床応用を想定した場合、歯髄は比較的採取しやすい組織ではあるが採取量が限られている。そこで高純度歯髄幹細胞を、その純度や性質を変えることなく *ex vivo* 培養する技術の開発を目指し、研究を行った。さらに、予期的に分離した LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup> hDPSC を難治性疾患である顎骨壊死の治療へ応用するための研究を目的とした。

### 3. 研究の方法

平成25年度は、hDPSC に特異的な細胞表面マーカーの LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>を用いて歯髄より培養を経ることなく直接的に分離し hDPSC の増殖能、骨分化能について評価した。

#### (1) 予期的分離法で得られた純度の高い細胞集団の生物学的特性(増殖能、分化能、遺伝子発現)の解析。

LNGFR および THY-1 にて歯髄細胞をフローサイトメーターにて分取すると、LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>、LNGFR<sup>High+</sup>THY-1<sup>Low+</sup>、LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>Low+</sup>、LNGFR<sup>High+</sup>THY-1<sup>High+</sup> の各分画に細胞集団が認められた(図2)。これらの細胞を培養した際に、骨髄では LNGFR<sup>High+</sup>THY-1<sup>Low+</sup>の分画の細胞が最も高いコロニー形成能を示すが、歯髄では骨髄にはみられない LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞が最も高いコロニー形成能を示した(図3)。LNGFR<sup>High+</sup>THY-1<sup>Low+</sup>細胞にもコロニー形成が認められたが、その他の分画の細胞はほとんどコロニー形成を示さなかった。

本研究で予期的に分離した2種類のコロニー形成細胞である LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞および LNGFR<sup>High+</sup>THY-1<sup>Low+</sup>細胞の増殖能および骨、脂肪等の間葉系細胞への分化能について、コロニーアッセイ法、培養法を用いて確認した。さらに、脂肪、骨、軟骨へ分化誘導した際の遺伝子発現についてリアルタイムPCR法を用いて確認した。

上記の性質を明らかにした段階で、平成26年度から平成27年度は、*in vivo*の実験を中

心に行った。

### (2) 予期的分離法により得られた高純度 hDPSC を用いた *in vivo* における増殖能の評価。

予期的に分離した細胞を培養増幅後に、蛍光タンパク(Venus)をレンチウイルスにて導入した。この細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells) をコラーゲンゲル(5ul)と混合しマウス頭蓋骨欠損モデル(免疫不全(NOD/SCID)マウス)に移植した。マウス頭蓋骨欠損部にカバーガラスを装着し cranial window を作製することにより、移植した Venus 陽性細胞が経時的に増殖する状態を透視しながら観察した。

### (3) 予期的分離法により得られた高純度 hDPSC を用いた *in vivo* における骨形成能の評価。

移植 4 週後にマウスを屠殺し、抗ヒト-オステオカルシン抗体を用いた免疫染色にて、形成された骨組織の評価を行った。

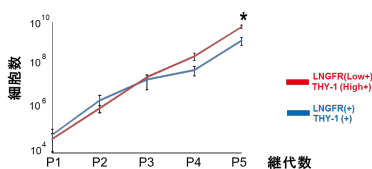
また、移植 2、4 週後にマイクロ CT を用いて骨形成の状態、骨形成量について評価した。これらについて、LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞移植群、LNGFR<sup>+</sup>THY-1<sup>+</sup>細胞移植群とコラーゲンゲルのみ移植した群で比較した。なお、マイクロ CT を用いた評価では、骨欠損部にコラーゲンメンブレンを置き皮膚切開部を閉創するモデルで評価した。また、移植細胞はスフェロイド培養した細胞( $3 \times 10^5$  cells)を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 予期的分離法で得られた純度の高い細胞集団の生物学的特性(増殖能、分化能、遺伝子発現)の解析。

最も高いコロニー形成能を示した LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞と次に高いコロニー形成能を示した LNGFR<sup>+</sup>THY-1<sup>+</sup>細胞の増殖能を比較した。培養初期には両者に差が認められなかったが、5 継代目では LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞が有意に高い増殖を示した(図 4)。

図 4 (増殖曲線)



次に、LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞と LNGFR<sup>+</sup>THY-1<sup>+</sup>細胞の間葉系細胞への分化能を評価した。DPSC は骨髄間葉系幹細胞と比較し脂肪への分化能が低いとされている

が、LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞は高い脂肪への分化能が認められた(図 5)。また、骨、軟骨への分化能についても LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞で高い分化能が認められた(図 5)。つづいて、リアルタイム PCR にて脂肪および骨関連の遺伝子発現を比較した。脂肪関連の遺伝子発現も骨関連の遺伝子発現も両方とも LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞の方が LNGFR<sup>+</sup>THY-1<sup>+</sup>細胞よりも高い結果が得られた(図 6)。

図 5 (間葉系細胞への分化能の比較)

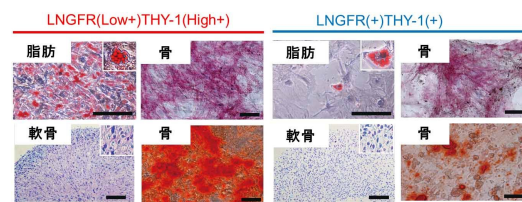
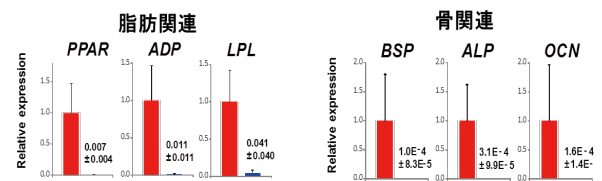


図 6 (リアルタイム PCR による遺伝子発現の比較)



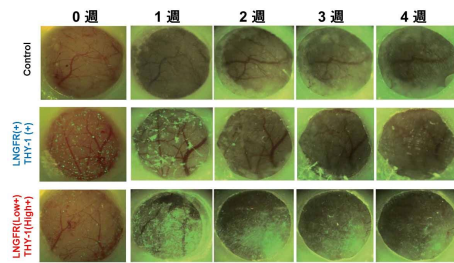
左 (赤): LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞  
右 (青): LNGFR<sup>+</sup>THY-1<sup>+</sup>細胞

### (2) 予期的分離法により得られた高純度 hDPSC を用いた *in vivo* における増殖能の評価。

予期的に分離した LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞および LNGFR<sup>+</sup>THY-1<sup>+</sup>細胞に蛍光タンパクの Venus を導入し、コラーゲンゲルと混合した上でマウス頭蓋骨欠損モデルに移植した。欠損部に装着したカバーガラスを通して、移植した Venus 陽性細胞が増殖する状態を観察した。LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞移植群では、LNGFR<sup>+</sup>THY-1<sup>+</sup>細胞移植群と比較して移植細胞の増殖が認められた(図 7)。LNGFR<sup>+</sup>THY-1<sup>+</sup>細胞が、2 週目には大半が消失していたのに対し、LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞は 4 週目まで確認可能であった(図 7)。LNGFR<sup>Low+</sup>THY-1<sup>High+</sup>細胞は他分画の細胞と比較して *in vivo* においても高い増殖能を示し、長期生存することが明らかになった。



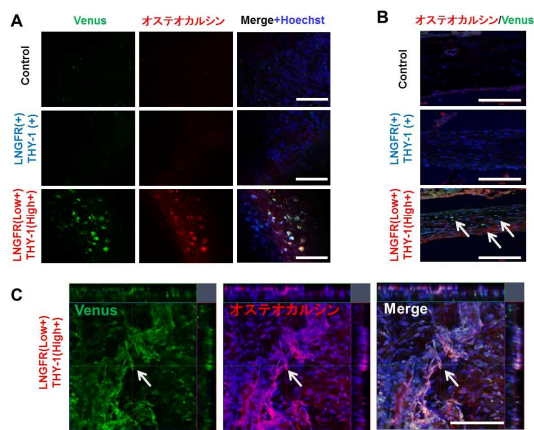
図7 (Cranial window による移植細胞の観察)



**(3) 予期的分離法により得られた高純度 hDPSC を用いた *in vivo* における骨形成能の評価。**

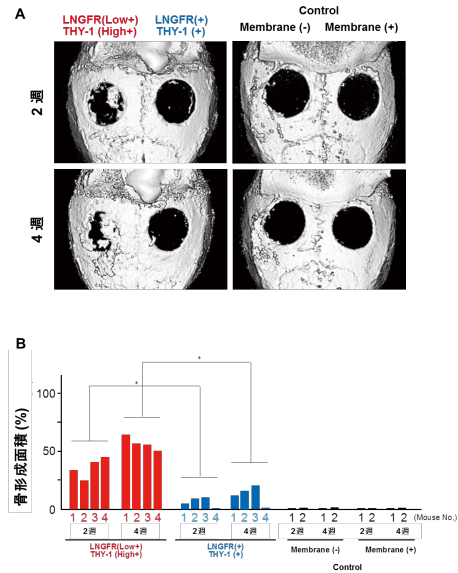
移植 4 週後にマウスを屠殺し、抗ヒト-オステオカルシン抗体を用いた免疫染色を行ったところ、LNGFR<sup>Low</sup>+THY-1<sup>High</sup>+細胞を移植した群のみに、移植細胞を示す Venus と骨形成タンパクを示すオステオカルシンの発現が認められた (図 8A, B)。LNGFR<sup>Low</sup>+THY-1<sup>High</sup>+ 細胞移植群の Confocal image では、Venus 陽性細胞にオステオカルシンの発現が認められ、移植細胞が骨芽細胞へ分化し骨形成に寄与していることが示唆された (図 8C)。

図8 (抗ヒト-オステオカルシン抗体による免疫染色)



次に、マイクロ CT を用いて骨形成量について検討した。欠損部に占める骨形成領域の割合を算出し、LNGFR<sup>Low</sup>+THY-1<sup>High</sup>+ 細胞移植群、LNGFR<sup>+</sup>THY-1<sup>+</sup> 細胞移植群とコラーゲンゲルのみ移植した群で比較した。LNGFR<sup>Low</sup>+THY-1<sup>High</sup>+ 群で最も骨形成領域の割合が高く、LNGFR<sup>+</sup>THY-1<sup>+</sup> 群と比較しても有意に高い結果が得られた (図 9A, B)。そのため、LNGFR<sup>Low</sup>+THY-1<sup>High</sup>+ cells は *in vivo* においても骨形成能が高いことが示唆された。

図9 (マイクロ CT による骨形成の比較)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)  
 1. T. Yasui, Y. Mabuchi, H. Toriumi, T. Ebine, K. Niibe, D.D. Houlihan, S. Morikawa, K. Onizawa, H. Kawana, C. Akazawa, N. Suzuki, T. Nakagawa, H. Okano, and Y. Matsuzaki  
 Purified Human Dental Pulp Stem Cells Promote Osteogenic Regeneration  
 Journal of Dental Research. 査読有. 95(2) 2016. 206-214

〔学会発表〕(計 1 件)  
 1. 安居孝純, 鬼澤勝弘, 軽部健史, 森川 暁, 河奈裕正, 中川種昭  
 予期的に分離した高純度歯髄幹細胞による骨形成能の評価  
 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2013.10.11 ~ 13 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
 ○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
 安居 孝純 (YASUI TAKAZUMI)  
 慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
 研究者番号: 80348771