

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20615

研究課題名(和文) 乳歯歯髄由来細胞の低酸素培養における未分化能の検討

研究課題名(英文) Undifferentiation ability of dental pulp cells of deciduous teeth under hypoxia

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：乳歯歯髄由来細胞(SHEDs)は過去の研究において高い分化能や増殖能を有していることが確認されている。さらに最近の研究では低酸素状態で培養された永久歯歯髄由来細胞において幹細胞特性を維持できることが報告されている。今回、SHEDsにおいても低酸素培養においてその分化能が増強されるという仮説のもと、通常培養下および低酸素培養下にて、細胞増殖能、未分化マーカー遺伝子(Oct3/4、sox2、c-Myc)発現、脂肪細胞への分化について検討した。低酸素培養は細胞増殖能に影響を与えなかった。さらに通常培養と比較して低酸素培養において未分化マーカー遺伝子の有意な発現増強を認め、脂肪細胞への分化を確認した。

研究成果の概要(英文)：Cell proliferation and differentiation of dental pulp cells in deciduous teeth (SHEDs) are greater than those of dental pulp cells in permanent teeth. And in recent study, it was suggested that dental pulp cells incubated under hypoxia can maintain ability of stem cells. I created the hypothesis that hypoxia can increase differentiation ability and examined cell proliferation, the gene expressions of undifferentiation markers(Oct3/4、sox2、c-Myc) and differentiations of adipocytes under hypoxia and normoxia. Hypoxia didn't affect cell proliferations of SHEDs. It increased the gene expression of Oct3/4、sox2 and c-Myc, and enhanced adipogenic differentiation under hypoxia. These results suggested that hypoxia enhances the differentiation ability of SHEDs.

研究分野：小児歯科

キーワード：歯髄 乳歯 低酸素 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。

過去にグリコー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。(Sato N, et al.: Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. Nat Med 2004 10:55-63.)。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。

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。

また、幹細胞は通常20%酸素で培養されているが、幹細胞に適した生理的酸素分圧は1~2%であるといわれており、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いる(Zhou Y, et al.: The effect of hypoxia on the stemness and differentiation capacity of PDLC and DPC. Biomed Res Int 2014(2014), Article ID 890675)。また、ヒト智歯より採取された歯髄由来細胞における研究では、低酸素培養時に歯根膜由来細胞と比較して高いALP活性が確認されたとの報告があり、高齢者より採取した歯髄由来細胞においても、低酸素培養を行うことで骨、象牙芽細胞への分化能が維持されたと報告されている。

乳歯歯髄由来細胞が再生医療において注目されているが、低酸素培養における研究は永久歯歯髄細胞を用いたそれと比較して少

ない。低酸素培養でヒト乳歯歯髄由来細胞の幹細胞特性の維持や他の細胞への分化が可能であると考えられる。研究開始当初、私は、通常培養下で乳歯歯髄由来細胞が永久歯歯髄由来細胞より増殖能が高いこと、未分化マーカーである遺伝子(Oct3/4、Sox2)発現増強を確認していた状態であった。

ヒト乳歯歯髄細胞の未分化能を維持できるBIOを添加し低酸素状態で培養することで、さらなる未分化能の増強ができれば、さらに再生医療への研究や臨床へ貢献できると考え、まず低酸素状態において乳歯歯髄由来細胞の増殖能、未分化能を維持することを目的として、MTS assay、リアルタイムRT-PCR、フローサイトメトリーを行い検討するとともに、低酸素状態で培養された細胞の分化能の検討を行い、そしてさらに、BIO刺激乳歯歯髄由来細胞を低酸素状態で培養することにより、さらなる未分化能の増強が可能であるという仮説をもとに、細胞増殖能測定や、リアルタイムRT-PCRにより検討を行う予定であった。

2. 研究の目的

乳歯歯髄は他の組織と比較して採取による侵襲が少なく、加齢に伴う遺伝子変異が少ない。また、硬組織に覆われているため外環境に起因した遺伝子変異を生じにくいなどの利点から再生医療の幹細胞ソースとして適している。さらに、乳歯歯髄由来細胞は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。また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。

今回の研究により、低酸素状態で培養した乳歯歯髄由来細胞が増殖能、分化能を維持でき、さらに様々な細胞への分化が可能であれば、乳歯歯髄由来細胞の再生医療へのさらなる可能性を広げることができる。そこで低酸素状態において分化能や増殖能に優れている乳歯歯髄由来細胞の多分化能や増殖能の維持が可能であることを確認するために本研究を行った。

目的を達成することにより、幹細胞の供給源として注目されている乳歯歯髄由来細胞はさらに再生医療において利用価値があるものになり得、歯髄保存や組織再生にむけた再生医療への路を拓くことができると考える。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄細胞の採取および培養

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た。さらに、All Cells(Alameda, CA, USA)より購入したヒト乳歯歯髄由来細胞も本研究に使用し、採取してきた細胞と同様に培養を行い、3-7 継代した細胞を実験に用いた。培養には -minimum essential medium supplemented(-MEM)へ 10% fetal bovine serum (Life technologies, Carlsbad, CA, USA), 100 U/mL penicillin (Life technologies), 100 µg/mL streptomycin (Life technologies), および 2 mM L-glutamine (Life technologies)を添加したものを使用した。

低酸素培養には、マルチガスインキュベータ(MCO-5M(UV)/5M; SANYO Electric Co., Ltd., Osaka, Japan)を使用した。

(2) 低酸素培養時の細胞生存率の測定

細胞生存率の検討は MTS assay により行った。

96well plate にヒト乳歯歯髄由来細胞を 4×10^3 /well で播種し、通常培養(20%酸素下) 下および、低酸素状態(2%)にて 2 日間培養を行った後、CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA)を添加し 1 時間後、マイクロプレートリーダー (Spectra MaxM5; Molecular Devices Inc., Downingtown, PA, USA)にて 490nm の吸光度を測定し、細胞増殖能の検討を行った。

(3) 低酸素培養時の遺伝子発現変動

通常培養および低酸素培養を行ったヒト乳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、さらに低酸素状態で誘導される HIF 遺伝子発現変動の検討を行った。

96well plate にヒト乳歯歯髄由来細胞を 4×10^3 /well で播種し 2 日間通常培養および低酸素状態にて培養を行った後、Cells-to-Ct™ 1-Step TaqMan® Kit (Life technologies)を用いて Step one plus® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)にてリアルタイム RT - PCR を行った。使用したプライマーは、HIF-1 (Hs00153153_m1)、Oct3/4 (Hs01654807_sl)、Sox2 (Hs01053049_sl)、c-Myc (Hs00905030_m1)および指標として GAPDH (Hs02758991_g1) (全て Taqman® Gene Expression Assays (Applied Biosystems))であった。

(4) 低酸素培養されたヒト乳歯歯髄由来細胞の脂肪細胞および骨芽細胞への分化能の検討

低酸素培養を行ったヒト乳歯歯髄由来細胞における他の細胞への分化能を検討するために、本研究では脂肪細胞分化への検討を行った。

24well plate にヒト乳歯歯髄由来細胞を 4×10^3 /well にて播種し、通常酸素下および低酸素下にて培養を行った。コンフレント時に脂肪細胞分化誘導培地 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)に交換し、3~4 日毎に培養液の交換を行った。7 日後に Oil red O 染色を行った。染色には Lipid Assay Kit (Wako, Osaka, Japan)を使用し、プロトコルに従って行った。さらに、細胞に取り込まれた染色液を抽出しマイクロプレートリーダーを用いて 490nm の吸光度で計測し色素量の定量を行った。

骨芽細胞分化への検討は、同様に骨芽細胞誘導培地 (R&D systems)を用いて 14 日間の分化誘導後、アルカリフォスファターゼ染色を行った。

4 . 研究成果

(1) 細胞増殖能

2 日間の低酸素培養および通常培養した乳歯歯髄由来細胞において、細胞増殖能の有意な差は認められなかった。

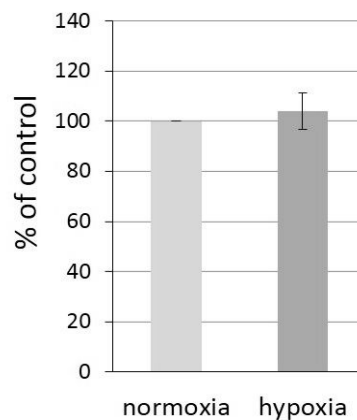


Fig.1 : 細胞増殖能測定

通常培養 (20% :normoxia) および低酸素 (2% :hypoxia) 培養におけるヒト乳歯歯髄由来細胞の細胞増殖能は MTS assay にて検討した。

(2) 遺伝子発現変動】

2 日間の低酸素培養および通常培養において未分化マーカー遺伝子 (Oct3/4、sox2、C-myc) および、HIF 遺伝子について遺伝子発現変動の検討を行った結果、低酸素培養した乳歯歯髄由来細胞においてすべての遺伝子の有意な発現増強が認められた。(Fig.2)

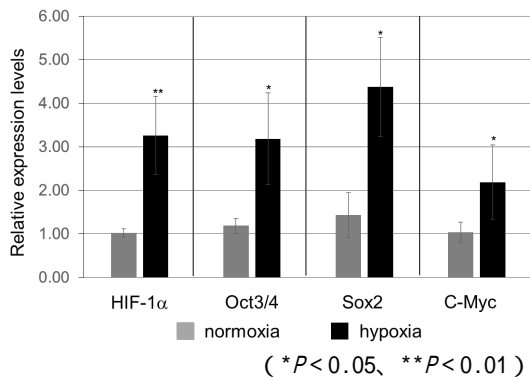


Fig.2: ヒト乳歯歯髄由来細胞の通常培養 (20%) 下および低酸素 (2%) 培養下における未分化マーカー遺伝子発現変動

(3) 脂肪細胞分化

通常培養および低酸素培養にて Oil red O 染色を行った結果、低酸素培養において脂肪細胞への分化増強が認められた。(Fig.3)

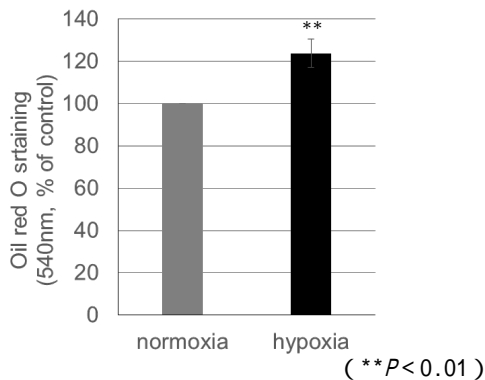
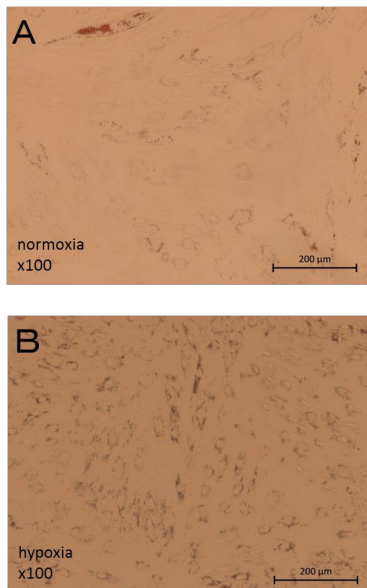


Fig.3: 脂肪細胞分化誘導後の Oil red O 染色 (A,B) および、定量 (C)

(4) 骨芽細胞分化

通常培養および低酸素培養にてアルカリフォスファターゼ染色を行った結果、骨芽細胞への分化が認められた。(Fig.4)

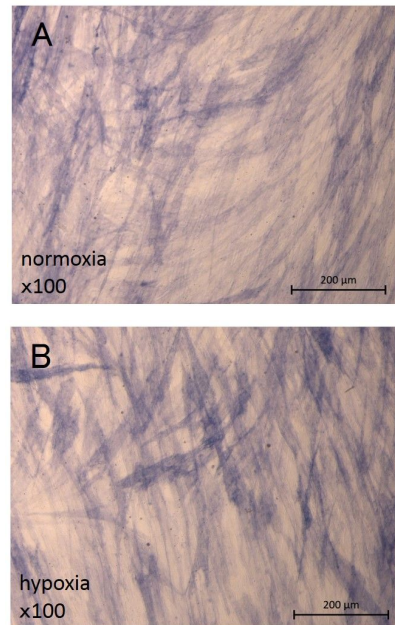


Fig.4: ALP 染色

通常培養 (A) および低酸素培養 (B) における 14 日間骨芽細胞誘導後の ALP 染色

以上の結果より、本研究では、2 日間の低酸素培養は細胞増殖能に影響を与えず、未分化能を増強すること、さらに低酸素培養を行うことにより、通常培養と比較して脂肪細胞への分化増強が可能であることが示唆された。

また、アルカリフォスファターゼ染色において、通常培養および低酸素培養どちらにおいても骨芽細胞への分化を確認した。現在、骨芽細胞分化について、western blotting を行い、タンパク発現において通常培養と低酸素培養において分化に差があるのかを検討している。

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 1 件)

Differentiation ability of dental pulp cells of deciduous teeth under hypoxia
Kawai S, Harada K, Aoki S, Arita K
 Journal of Oral Tissue Engineering 査読
 有 15(2)65-70 2017
 DOI: 10.11223/jarde.15.65

[学会発表](計 2 件)

Differentiation ability of SHEDs under hypoxia

Saki Kawai, Kyoko Harada, Sho Aoki, Takako
Nishimura, Kenji Arita
2018 AADR/CADR Annual Meeting 2018 Fort
Lauderdale, Fla. USA

低酸素培養による乳歯歯髓由来細胞の分
化能への影響
河合咲希, 原田京子, 永田幸子, 人見さよ子,
園本美恵, 有田憲司
第 55 回日本小児歯科学会大会 小倉 2017

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