

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17216

研究課題名(和文) エピジェネティクス修飾を応用した3次元歯胚形成能の検討

研究課題名(英文) Examination of three-dimensional tooth germ formation ability applying epigenetic modification

研究代表者

佐藤 惇 (Sato, Jun)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：30624267

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)：本研究では、エピジェネティクス修飾を応用し、歯根膜由来マラッセ上皮細胞から歯原性上皮幹細胞を作製し、間葉系幹細胞との器官原基法を用いた歯胚形成能について検討することを目的とした。まず、マラッセ上皮細胞から歯原性上皮幹細胞を作製し、歯髄幹細胞を含んだ間葉系歯髄細胞と器官原基法を用いて共培養を行い歯胚様細胞塊を作製した。その後、歯胚形成に関与するCD29の発現解析を行った結果、CD29陽性細胞率の有意な上昇を認められた。その後、この歯胚様細胞塊を免疫不全マウスの頭蓋骨へ移植し歯胚形成能の検討を行ったが、移植組織から硬組織形成を誘導することは確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、歯胚を用いた歯の再生は研究が進められているが、エピジェネティクス修飾技術によって歯の再生が可能になれば、将来的には歯胚を用いることが無くとも、親知らず等の抜去歯から採取可能な歯根膜マラッセ上皮細胞や歯髄細胞から、新たな歯胚を作製することが可能になるかもしれない。本研究で得られた知見は、歯胚を用いること無く、患者自身の抜去歯とエピジェネティクス修飾技術を応用する方法によって新たな歯を再生するための基礎データとして意義あるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we applied epigenetic modification to prepare odontogenic epithelial stem cells from Epithelial cell Rests of Malassez derived from the periodontal ligament, and investigated the ability to form tooth germs using the organ germ methods with mesenchymal stem cells.

First, odontogenic epithelial stem cells were prepared from Epithelial cell Rests of Malassez, and co-cultured with mesenchymal dental pulp cells containing dental pulp stem cells using the organ germ methods to prepare tooth germ-like cell mass. The expression of CD29 involved in tooth germ formation was analyzed. The percentage of CD29-positive cells was significantly higher.

The tooth germ-like cell mass was transplanted into the skull of the immunodeficient mouse, and the tooth germ forming ability was examined, but it could not be confirmed that hard tissue formation was induced from the transplanted tissue.

研究分野：再生歯学

キーワード：歯胚形成 エピジェネティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、医療の分野では臓器再生を目指した研究が進められている。歯科では2009年に、摘出歯胚を上皮細胞と間葉系細胞とに分け、3次元共培養法である器官原基法を用いた歯の機能的再生が報告されて以降 (Ikeda et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 2009) 歯胚を用いた歯の再生研究が進められている。しかしながら、歯を再生する為には歯胚を犠牲にしなくてはならないという問題点があり、臨床応用に向けては課題が多い。

我々の研究グループは、これまで主にエピジェネティクスに関する研究 (Abiko et al. J. Oral Biosci. 56, 2014, review) および間葉系組織の歯根膜に存在するマラッセ上皮細胞に関する研究 (Noro et al. Arch Oral Biol. 60, 2015) を行ってきた。エピジェネティクスは、塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の表現型に変化を引き起こす修飾であり、様々な生命現象や疾患の発症に関わっている。細胞の分化制御への関与も明らかになってきており、エピジェネティクス修飾をターゲットとした薬剤、脱メチル化剤 5-Azacytidine (5Aza) により線維芽細胞が幹細胞化することが報告されている (Mikkelsen et al. Nature. 454, 2008)。

また口腔内では、歯根膜において幹細胞マーカーである Sox2 の発現が確認されているのに対し、歯根膜に存在するマラッセ上皮細胞では発現は認められないと報告されている (Juuri et al. Eur J Oral Sci. 121, 2013)。そこで、マラッセ上皮細胞にエピジェネティクス修飾を行い、歯原性上皮幹細胞を作製し、歯原性上皮幹細胞と、歯髓幹細胞を含む間葉系歯髓細胞とを器官原基法によって共培養することで、歯胚を犠牲にすること無く、人工的な歯胚を作製することが可能になるかもしれないと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、エピジェネティクス修飾により作製するマラッセ上皮由来歯原性上皮幹細胞と、歯髓幹細胞を含む間葉系歯髓細胞とを器官原基法によって共培養した後、マウスに移植し、上皮-間葉相互作用による歯胚形成能について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) マラッセ上皮細胞からの歯原性上皮幹細胞の作製

ブタ下顎臼歯から単離された歯根膜のマラッセ上皮細胞に対し、エピジェネティクス修飾のために 1  $\mu$ M の 5Aza と 2 mM のパルプロ酸で 1 週間処理することで、歯原性上皮幹細胞を作製した。

#### (2) 歯原性上皮幹細胞確認のための免疫蛍光染色

マラッセ上皮細胞から歯原性上皮幹細胞が作成されたかについて、幹細胞マーカーである NANOG および OCT4 の発現をタンパクレベルで確認するために、共焦点レーザー顕微鏡の Confocal microscope (Nikon EZ-C1) を用いて免疫蛍光染色による観察を行った。一次抗体には、anti-human NANOG and OCT4 (Human ESC/iPSC Characterization Kit, System Biosciences)、二次抗体には goat anti-rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody Alexa Fluor 488 conjugate (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

#### (3) 器官原基法による歯原性上皮幹細胞と間葉系幹歯髓細胞との上皮-間葉相互作用

池田ら、中尾らの方法を用いて (Ikeda et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 2009; Nakao et al. Nat Methods. 4, 2007) 歯原性上皮幹細胞と、歯髓幹細胞を含む間葉系歯髓細胞とを  $5 \times 10^4$  cells ずつ Type I Collagen gel で 37  $^{\circ}$ C 5 日間培養を行い、上皮-間葉相互作用を促進させ歯胚様細胞塊を作製した。

#### (4) フローサイトメトリーによる CD29 の発現解析

歯胚形成に関与する CD29 の発現解析を行うために、APC Mouse Anti-Human CD29 抗体 (BD) を使用し、Flow cytometer (BD FACSAria u, BD Biosciences) での歯胚様細胞塊におけるタンパク発現解析を行った。対照群 (Control) として、通常のマラッセ上皮細胞と、歯髓幹細胞を含む間葉系歯髓細胞による細胞塊を用いた。

#### (5) 免疫不全マウスへの歯胚様細胞塊の移植および歯胚形成能の検討

器官原基法によって作製された歯胚様細胞塊を、ヌードマウス (BALB/C nu/nu) の頭蓋骨へ移植した。28 日間飼育後屠殺し、移植組織を摘出後、歯胚形成能の検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) マラッセ上皮細胞からの歯原性上皮幹細胞の作製 (図1)

マラッセ上皮細胞にエピジェネティクス修飾を行った結果、幹細胞マーカーである NANOG および OCT4 のタンパク発現 (図1 ; 緑色) を認める歯原性上皮幹細胞を作製することができた。

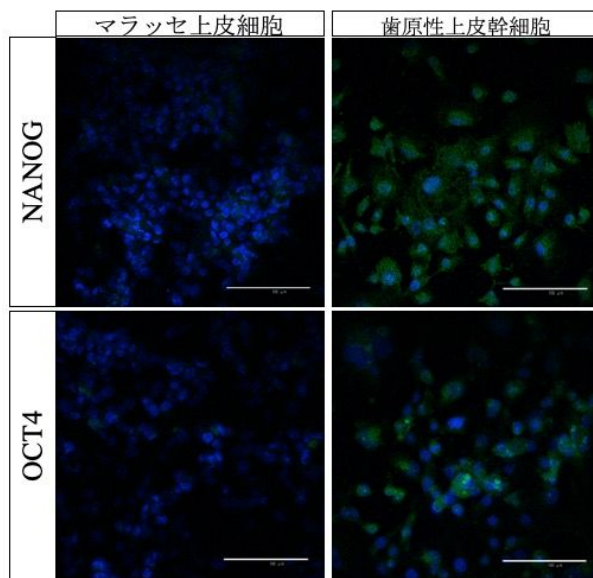


図1. マラッセ上皮細胞から作製した歯原性上皮幹細胞

##### (2) フローサイトメトリーによる CD29 の発現解析 (図2)

フローサイトメトリーによる、歯胚形成に関与する CD29 の発現解析の結果、対照群 (Control) に比べ、歯胚様細胞塊における CD29 タンパク発現陽性細胞率の有意な上昇を認めた ( $p < 0.05$ ; カイ二乗検定)。CD29 は歯胚形成に関与することから、エピジェネティクス修飾を用いた器官原基法は、人工的な歯胚形成能を誘導させる可能性が示唆された。

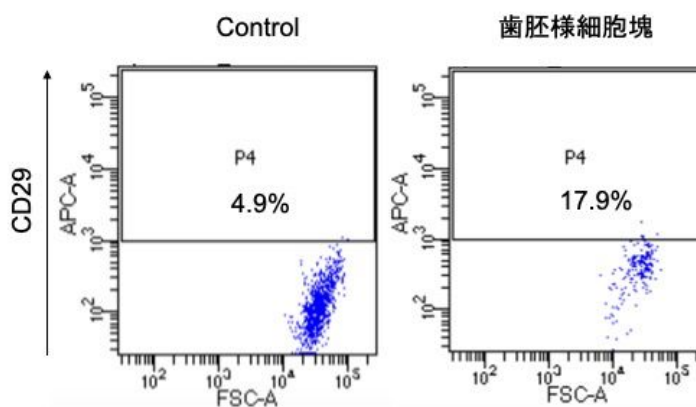


図2. フローサイトメトリーによる CD29 の発現解析

##### (3) 免疫不全マウスへの歯胚様細胞塊の移植および歯胚形成能の検討

歯胚様細胞塊をヌードマウスの頭蓋骨へ移植し検討した結果、移植組織から硬組織形成を誘導することは確認できなかった。問題点としては、歯胚様細胞塊の細胞数の不足や歯胚構成遺伝子の発現レベルが不十分であった点などが考えられた。今後の更なる検討が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koki Yoshida, Osamu Uehara, Yoshihito Kurashige, Durga Paudel, Aya Onishi, Puja Neopane, Daichi Hiraki, Tetsuro Morikawa, Fumiya Harada, Rie Takai, Jun Sato, Masato Saitoh & Yoshihiro Abiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Direct reprogramming of epithelial cell rests of malassez into mesenchymal-like cells by epigenetic agents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79426-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Koki Yoshida, Tetsuro Morikawa, Durga Paudel, Aya Onishi, Daichi Hiraki, Puja Neopane, Osamu Uehara, Jun Sato, Masato Saitoh, Yoshihiro Abiko
2. 発表標題 Calcification induction of dental pulp cells by DNA demethylation
3. 学会等名 第67回JADR総会・学術大会 / （第4回IADR APR (Asia Pacific Region) 学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. YOSHIDA, A. ONISHI, D. HIRAKI, T. MORIKAWA, F. HARADA, R. TAKAI, O. UEHARA, J. SATO, M. NISHIMURA, Y. ABIKO
2. 発表標題 Dedifferentiation and Direct Reprogramming of epithelial cell rests of Malassez into osteoblast like cells by epigenetic agents
3. 学会等名 第66回国際歯科研究学会日本部会（JADR）総会・学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野ホームページ  
<http://www3.hoku-iryu-u.ac.jp/courses/2/013/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------