

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390550

研究課題名 (和文) ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞の多能性および再生医療への可能性について

研究課題名 (英文) Studies on stem cells from human exfoliated deciduous teeth.

研究代表者

三留 雅人 (MITOME MASATO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：50261318

研究成果の概要：

幹細胞を使用した再生医療が注目を集めている。歯髄中にも幹細胞が存在することが示唆されてきた。本研究はヒトの脱落した乳歯歯髄の中から発見された幹細胞 (stem cells from human exfoliated deciduous teeth: SHED, 以下SHED) を中心に、その多能性を検討した。マウス門歯歯髄、乳歯および上顎正中過剰歯の歯髄を採取し培養後、マウスの中枢に移植すると種々の神経細胞に分化することが明らかになった。このことから、歯髄中の細胞には多分化能を有する幹細胞が存在し、中枢において神経細胞に分化することが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,100,000円	0円	8,100,000円
2007年度	4,300,000円	1,290,000円	5,590,000円
2008年度	3,000,000円	900,000円	3,900,000円
年度			
年度			
総計	15,400,000円	2,190,000円	17,590,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学, 小児歯科学

キーワード：移植・再生医療, 再生医学, 歯学, 神経科学, 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

歯髄中に幹細胞 (dental pulp stem cells, 以下 DPSCs) が存在することを証明したのは、米国立保健研究所 (NIH) の研究チームである。当初は、DPSCs が象牙芽細胞や骨芽細胞などの中胚葉系内のみの細胞に分化し、その多能性は限局していた。しかし、乳歯歯髄細胞 (SHED) が発見されると、DPSCs よりも分

化能力が高く、特に多くの種類の神経系の細胞に分化することが示されてからは、歯髄系幹細胞に関する考え方は大きく変わり、一躍再生医療への可能性について脚光を浴びることになった。しかし、SHED に関する衝撃的な研究の発表がなされたばかりであり、その全容はいまだ不明である。神経系への分化能についても未解明な点が多く、また、実際に

移植による再生医療への応用を検討した研究は国内外において存在しない。

中枢神経系における再生医療は現在、最も注目を浴びている分野の一つである。出生前にはほぼすべての神経細胞（ニューロン）が分裂を終了し、医学分野では一度損傷を受けるとその再生は困難であると思われていた。そのため脊髄損傷、アルツハイマー病およびパーキンソン病に代表される中枢神経系の疾患の根本的治療は不可能と考えられてきた。歯科分野においても、脳性まひや脳梗塞により中枢神経が損傷した場合、摂食困難および口腔感覚異常など口腔領域に関係した問題が存在し、その根本的治療は確立していない。しかし、神経幹細胞は移植後、脳内の環境因子の影響を受け、多くの場合、目的のタイプのニューロンに分化しなかったり、ニューロンの活動をサポートするアストロサイトに分化することが多かった。また、神経幹細胞を患者自身から採取するのは、侵襲を伴う手術を必要とし、また、神経疾患により神経幹細胞自体も損傷を受けて、使用できないなどの問題もあった。このため、現在、ES細胞や骨髄幹細胞など、神経幹細胞以外の幹細胞を中枢に移植する研究も盛んに行われている。

2. 研究の目的

近年、歯髄中にも幹細胞が存在することが示唆されてきたが、最近、ヒトの脱落した乳歯歯髄の中から発見された SHED の多能性は我々の想像をはるかに超えるものであった。申請者の最終目的は SHED を患者に移植し、特定の臓器疾患において機能回復を期待することにある。この目的を達成するために、(1) 乳歯歯髄細胞を培養し、これを維持および増殖するための培養法を確立すること、(2) *in vitro* において SHED の多能性を証明すること、(3) SHED が特に中枢神経細胞に特異的に分化する能力をもつという報告をうけて、移植による神経系への分化転換を動物モデルによって証明すること、(4) 神経機能異常モデル動物を用いて SHED を移植後、その機能を回復できるか検討することである。これらによって得られた結果を考察し、SHED の再生医療へ果たす役割を総合的に検証する。

3. 研究の方法

(1) 大学病院小児歯科外来にて提供を受けたヒト脱落乳歯、正中過剰歯より採取した歯髄をウシ胎児血清含有 α -MEM にて培養を行った。培養 1~2 週間後、細胞を剥離し低付着性の培養皿 (HydroCell[®]) で、B-27suppliment, bFGF および EGF を含有した D-MEM 培養液にて 7~10 日間培養を行い、実験に用いた。また、4 週齢の GreenFluorecentProtein 遺伝子導入マウス (以下 GFP マウス) の切歯より採取した歯髄

を用いて同様の操作を行い、これらの細胞群の性質を比較した。また、培養 12 日目の細胞群をスライドガラスに接着させ、神経幹細胞マーカーである Nestin, ニューロンのマーカーである β -tublinIII, アストロサイトのマーカーである GFAP にて免疫染色を行い観察した。また、接着性培養ディッシュで再び培養することにより、*in vitro* での分化を観察した。この細胞を新生および 8 週齢の C57BL/6 マウスの小脳延髄槽に移植した。移植細胞をレシピエント側と区別するために、ヒト歯髄由来細胞群では培養液中に BrdU を加えて標識し、移植後 BrdU の抗体で免疫染色を行った。

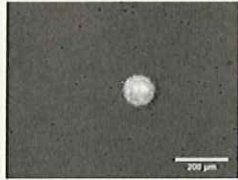
(2) 歯髄由来の培養細胞を中枢神経のどの部分に移植すると、細胞が効率よく生着し、分化するかを調べるために、胎生 16 日目の GFP マウスから線条体を採取し、Epidermal growth factor (EGF) を含む神経細胞用培養液で培養し、浮遊状の神経細胞塊 (Neurosphere) を得た。この細胞を、生後 1 日目のドナーマウスにおいて、神経幹細胞が終生分裂しているといわれる、海馬歯状回、側脳室下帯および延髄孤束核での生着を調べるために、側脳室および小脳延髄槽に移植した。4 から 8 週間後、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定を行い、免疫染色により分化動態を確認した。

(3) 上記で得られた成果をもとに、ヒト脱落乳歯、正中過剰歯および GFP マウス歯髄より培養した歯髄由来細胞を生後 1 日目の小脳延髄槽に移植した。ヒト歯髄移植細胞のマーキングとして、培養液中に BrdU を滴下し標識した。移植から 2 週間後、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定を行った。灌流後、脳を取り出し 50 μ m の切片を作製し、BrdU の抗体で免疫蛍光染色することにより移植細胞の生着を確認した。また、移植細胞の分化能を調べるために、アストロサイトのマーカーである GFAP の抗体および、ニューロンのマーカーである NeuN の抗体で免疫染色を行った。

4. 研究成果

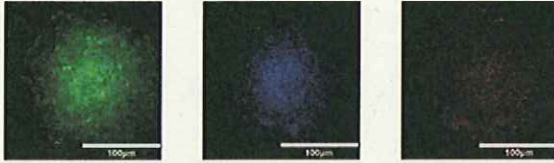
(1) 歯髄由来細胞の培養

GFP マウスの切歯より採取した歯髄をウシ胎児血清含有 α -MEM にて培養を行った。細胞は底面に付着しながら増殖した。培養 1~2 週間後、細胞を剥離し低付着性の培養皿 (HydroCell[®]) で、B-27suppliment, bFGF および EGF を含有した D-MEM 培養液にて 7~10 日間培養すると、浮遊細胞塊を形成し Neurosphere 様の形態を示した (図 1)。

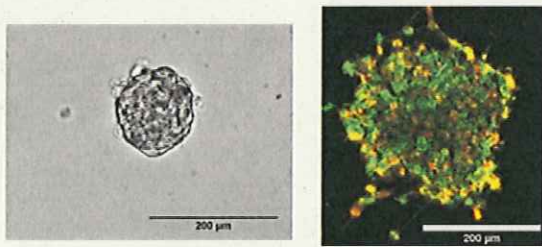


【図1】GFP マウス切歯髄細胞由来細胞

この細胞を Nestin および β -tubulinIII の抗体で染色すると、両方の抗体で染色され、神経幹細胞およびニューロンに分化していることが、判明した (図2)。また、ヒト歯髄細胞においても同様の結果が示された。(図3)

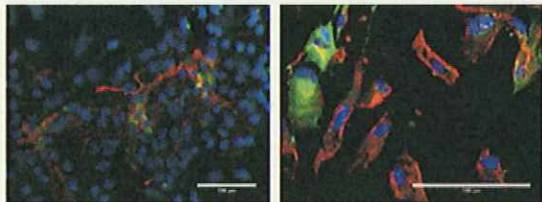


【図2】移植前の GFP マウス歯髄由来 Neurosphere 様細胞。緑: GFP, 青: Nestin, 赤: β -tubulinIII



【図3】ヒト正中過剰歯, 歯髄細胞由来 Neurosphere 様細胞。移植後に移植細胞を判別するために BrdU で免疫染色した。(赤: BrdU, 緑: Nestin)

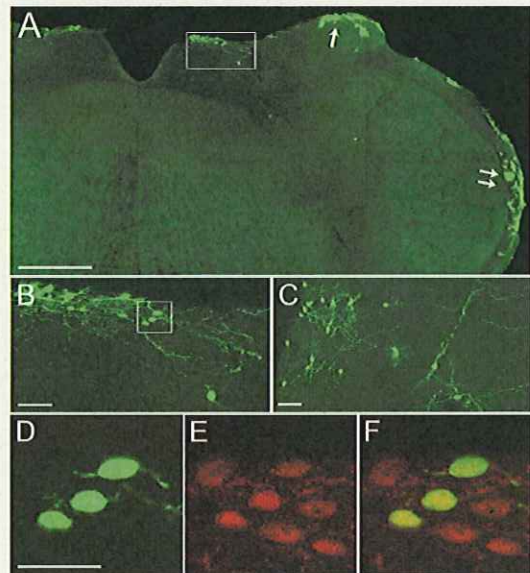
これらの細胞を, *in vitro* で分化させ, 分化後の細胞の性質を確認したところ, Nestin, β -tubulinIII および GFAP の抗体に染色さら他種類の細胞に分化したことが示された (図4)。



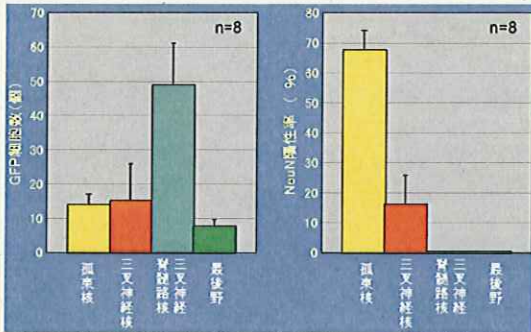
【図4】*in vitro* で神経系の細胞に分化したヒト歯髄由来 Neurosphere 様細胞 左 (青: DAPI, 赤: GFAP, 緑: Nestin) 右 (青: DAPI, 赤: GFAP, 緑: β -tubulinIII)

(2) 神経幹細胞の移植による中枢での生着部位の考察

GFP マウス由来 EGF 反応性神経幹細胞を生後1日目のマウスに移植した。8週間後固定を行い, 幹細胞が存在しており, 特殊なニッチを持つといわれる延髄孤束核において, 他の部位と形態の異なる移植細胞が認められた。この細胞の形態を詳細に観察するとスパインと思われる突起と長い神経線維が観察され, ニューロンに分化していることが判明した。この細胞を神経細胞のマーカーである NeuN の抗体で染色すると局在が一致した (図5)。延髄において移植細胞の生着数は三叉神経脊髄路核が多かったが, 細胞のニューロンへの分化率は孤束核において60%以上の移植細胞がニューロンに分化していた (図6)。一方, 側脳室に移植した神経幹細胞は, 側脳室下帯や海馬歯状回に生着したが, その殆どが形態的にグリア細胞であることが判明し, NeuN との局在の一致もみられなかった。以上のことから, 延髄の孤束核は幹細胞をニューロンに分化しやすい特殊なニッチを持ち, 歯髄由来細胞の移植後の観察について, 興味深い神経核であることが, 判明した。



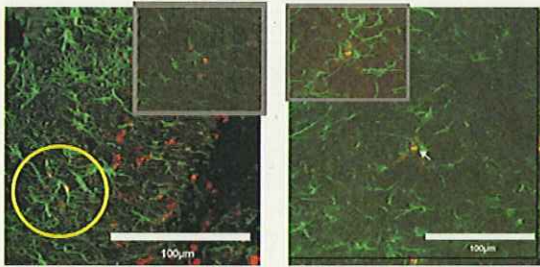
【図5】延髄孤束核にみられた移植神経幹細胞。他の生着部位 (矢印) に比べて, 延髄孤束核にみられた神経幹細胞は形態的にニューロンに分化していた。A(冠状断), B(拡大像), C(水平断)。孤束核に生着した細胞をニューロンのマーカーである NeuN で染色すると局在の一致が認められた。D(GFP), E(NeuN), F(マージ画像)。スケール, A: 500 μ m, B, C: 50 μ m, D-F: 25 μ m



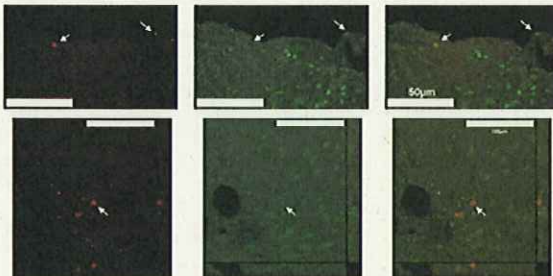
【図6】延髄に見られた移植 GFP 陽性細胞。
左：GFP 細胞数は三叉神経脊髄路核で最も多かった。右：しかし NeuN 陽性を示す移植細胞の割合は孤束核で最も高く 60%を超えていた。

(3) 歯髄由来細胞の孤束核への移植とその分化動態

ヒト歯髄由来細胞(乳歯歯髄, 正中過剰歯)をマウス小脳延髄槽に移植し, 孤束核での分化動態を観察した。その結果, 孤束核に多くの移植歯髄細胞を観察することができた。移植細胞の分化を調べるために GFAP で染色すると移植細胞が GFAP と染色を同一にし, アストロサイトに分化していることが判明した(図7)。また NeuN との局在の一致が認められ, ニューロンへの分化が確認された(図8)。



【図7】延髄孤束核(NST)でアストロサイトに分化した BrdU 陽性移植歯髄細胞(赤), GFAP(緑)。



【図8】延髄孤束核(NST)でニューロンに分化した BrdU 陽性移植細胞(赤), NeuN(緑)

考察と結論

歯髄に存在する幹細胞は間葉系細胞由来であり, 中枢へ移植後の分化機序については現在明らかにされていない。本研究から間葉系幹細胞が分化転換により神経幹細胞を生じ神経細胞に分化したことが示唆された(図9, 10)。今回, 特定の培養条件において歯髄細胞から得られた Neurosphere 様細胞の性質を探り, 歯髄由来の神経幹細胞が生体内にて生着, 分化が可能かを調べた。

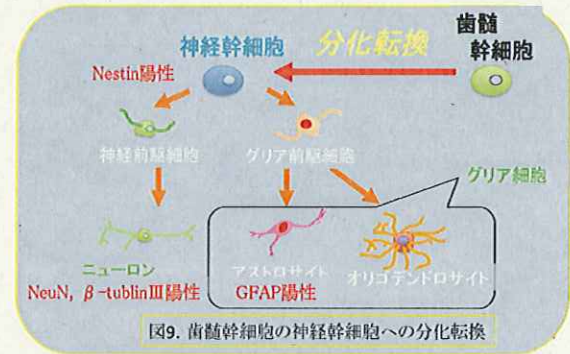


図9. 歯髄幹細胞の神経幹細胞への分化転換

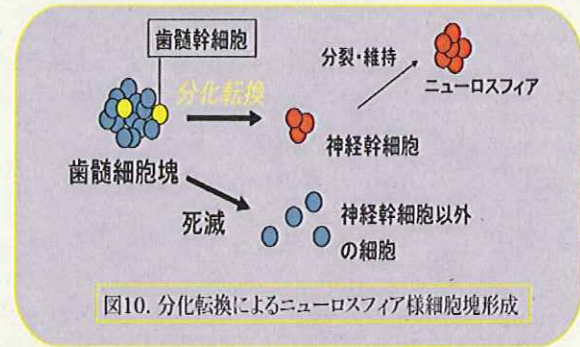


図10. 分化転換によるニューロスフィア様細胞塊形成

胎児マウスの脳から得られる Neurosphere とは神経幹細胞の集合体である。本実験では, 歯髄由来の Neurosphere 様細胞を作成し, その分化動態を *in vitro*, *in vivo* において分析した。歯髄由来 Neurosphere 様細胞はその内部の細胞群に神経幹細胞マーカー陽性の細胞を多く内在しており, 外周の細胞はニューロンのマーカーに標識された。さらに, *in vitro* にて分化させた場合, 神経幹細胞マーカーである Nestin に標識される細胞, アストロサイトのマーカーである GFAP, およびニューロンのマーカーである NeuN で標識される細胞を確認した。このことから, 歯髄由来 Neurosphere 様細胞の幹細胞から神経系細胞への分化が生じることが示唆された。さらに, マウス脳内に移植した細胞では, 延髄に存在する孤束核においてニューロンおよびグリア細胞へ分化することを確認した。このことは, 歯髄由来 Neurosphere 様細胞は生体内で生着し, 神経細胞へ分化することを示唆している。

今回使用した SHED と過剰歯由来の歯髄細胞において大きな分化動態の違いは認めら

れなかった。今後乳歯の細胞の特徴を明確化するために、歯髄の採取時期や部位、培養法などの条件設定にさらなる検討が必要であると思われる。

まとめ

SHED を中心として歯髄細胞から神経細胞へ分化しやすい培養条件を設定し、培養された細胞は、*in vitro*において神経細胞に分化することを証明した。また、移植による神経細胞への分化を検討し、延髄孤束核に移植した歯髄由来細胞がニューロンをはじめとして、神経細胞に分化することを証明した。歯髄に存在する間葉系幹細胞からは主に中胚葉組織が形成されるが、外胚葉系である神経系細胞への分化が *in vitro* および *in vivo* において認められた。したがって、歯髄内の間葉系幹細胞から神経幹細胞へと分化転換が生じることが示唆された。これらの得られた結果は、SHED の再生医療への応用を示唆するものであった。

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1件)

1) Masato Mitome, Hoi Pang Low, Karen M. Lora Rodriguez, Masafumi Kitamoto, Takamasa Kitamura and William J. Schwartz, Neuronal differentiation of EGF-propagated neurosphere cells after engraftment to the nucleus of the solitary tract. *Neurosci Lett*, 444: 250-253, 2008.

[学会発表] (計2件)

1) 北村尚正, カレン・ローラ・ロドリゲス, 北本眞史, 塚本亮一, 赤澤友基, 三留雅人 : マウス脳内に移植した歯髄幹細胞の神経細胞への分化
日本小児歯科学会大会, 大阪
小児歯科学雑誌 47 (2) : 350, 2009

2) カレン・ローラ・ロドリゲス, 北村尚正, 赤澤友基, 三留雅人 : 神経幹細胞の移植による延髄孤束核での分化動態について
日本小児歯科学会大会, 大阪
小児歯科学雑誌 47 (2) : 349, 2009

6. 研究組織

(1)研究代表者

三留 雅人 (MITOME MASATO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号 : 50261318

(2)研究分担者

白川 哲夫 (SHIRAKAWA TETSUO)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号 : 00187527

中村 渉 (NAKAMURA WATARU)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号 : 60372257

菊入 崇 (KIKUIRI TAKASHI)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 10322819