

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17226

研究課題名(和文) 歯由来の間葉系幹細胞におけるTh1系サイトカインによる新規分化誘導調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of new differentiation-regulatory system by Th1 cytokine in mesenchymal stem cells derived tooth

研究代表者

石田 陽子(ishida, yoko)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：00772055

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)：埋伏歯抜歯後の組織から歯乳頭、歯小嚢を採取し間葉系幹細胞を分離培養した。両細胞は同様の細胞増殖能をもち、CD90,CD73,CD105などの幹細胞マーカーが陽性であった。これらの間葉系幹細胞は骨分化誘導能、脂肪分解能、軟骨分化能を持つ幹細胞であることが示された。両細胞にINF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ を添加した結果INF- $\gamma$ 単独添加で骨誘導が抑制された。さらにINF- $\gamma$ 誘導性の骨分化能力の抑制がTNF- $\alpha$ でさらに増強された。本研究により歯乳頭、歯小嚢細胞から幹細胞の分離が可能であること、歯乳頭、歯小嚢由来幹細胞が多分化能をもつこと、さらにその分化はTh1サイトカインにより調節できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯乳頭細胞、歯小嚢細胞由来の間葉系幹細胞の生物学的特性、分化能力の違いには不明な点が多い。歯乳頭、歯小嚢由来の組織から間葉系幹細胞を分離し、骨誘導能、軟骨誘導能、脂肪分化誘導能といった多分化能をもつことを示した。またTh1系の炎症性サイトカインが歯乳頭、歯小嚢由来間葉系幹細胞の骨分化能力を抑制することを明らかにした。歯乳頭、歯小嚢由来の間葉系幹細胞における炎症系サイトカインの骨分化能力の調節について報告はなく、再建医療を中心とした再生医療への応用につながるものが考えられた。

研究成果の概要(英文)：While a dental papilla and a dental follicle were extracted from the organization after extraction of embedding tooth, a separation cultivated the mesenchymal stem cells. These cell have cell proliferation ability and stem cell marker of CD90,CD73,CD105 was positive. It was indicated that the mesenchymal stem cells is a stem cell with the bone differentiation ability, the fat resolution and the cartilage differentiation ability. After INF- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were added to these cells, bone induction was restrained by INF- $\gamma$  independent addition. More restraint of the bone differentiation ability of the INF- $\gamma$  inductivity was reinforced with TNF- $\alpha$ . It became clear that the case that this research can separate a stem cell from a dental papilla and a dental follicle, These cell have pluripotent, multipotent and that Th1 cytokines is able to control more the differentiation.

研究分野：歯学

キーワード：間葉系幹細胞 歯小嚢由来幹細胞 歯乳頭由来幹細胞 炎症性サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、自己増殖能および多分化能を有する細胞と定義され、生体諸組織に分布することが知られている。とくに、間葉系幹細胞の有する骨芽細胞や軟骨細胞への分化能は再生医療の中でも、注目されている。骨髄系間葉幹細胞以外にも様々な組織から存在が報告されているが、口腔領域では、歯髄由来の間葉系幹細胞の増殖能や多分化能が報告されている。一方、智歯や正中過剰埋伏歯は抜歯後、医療廃棄されるため、それら組織からの間葉系幹細胞の採取は、再生医療による貴重な細胞源となりうる。口腔領域では、歯髄由来の間葉系幹細胞の増殖能や多分化能が報告されているが、歯乳頭細胞、歯小囊細胞由来の間葉系幹細胞の生物学的特性、分化能力の違いには不明な点が多い。口腔領域の治療において過剰埋伏歯は医療破棄されることがおおく、組織から間葉系幹細胞の採取を行う事が容易であることから再生医療による細胞源となりうると思った。また一方で間葉系幹細胞は傷害された組織や炎症を生じた組織において免疫制御機構を発揮することが知られている。特に、口腔内の炎症組織には、Th1 細胞から誘導される炎症系サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  の発現が認められる。申請者らのグループは現在まで、口腔の組織由来の細胞を樹立し、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  の刺激による炎症応答機構を解明してきた。しかしながら歯乳頭、歯小囊由来の間葉系幹細胞における炎症系サイトカインの骨分化能力の調節については国内外でも報告はない。これらの背景から歯乳頭細胞、歯小囊細胞由来の間葉系幹細胞の生物学的特性、分化能力、炎症系サイトカインによる分化能の調節機構を検討する本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、医療廃棄される過剰埋伏歯より歯乳頭、歯小囊組織を採取し、歯乳頭、歯小囊由来の間葉系幹細胞を分離し、生物学的特性や多分化能の比較を行うこと、炎症性サイトカインによる分化能への調節機構と新規分化誘導関連遺伝子を明らかにし、再生医療への応用を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 歯小囊、歯乳頭由来幹細胞の単離と生物学的特性の比較

広島大学医歯薬学総合研究科倫理委員会による承認の下で、本研究に対して患者による同意が得られた患者の埋伏歯抜歯後の組織から歯乳頭、歯小囊から幹細胞を分離培養した。過剰歯から歯小囊、歯乳頭、歯髄からの間葉幹細胞の単離はBalliniらの方法を用いて行った。単離された細胞を播種し、細胞増殖能の解析を行った培養を行った細胞群を12 well プレートに播種し、2, 4, 6, 8, 10 日毎の細胞数を測定した。

培養した幹細胞マーカーや、間葉系細胞マーカー発現の解析を、フローサイトメトリー法によって行った。

### 2) 歯小囊、歯乳頭由来幹細胞の多分化誘導能の比較

#### 骨分化誘導能の解析

10%FBS, 10 nM dexamethasone, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 100  $\mu$ M L-ascorbate-2-phosphate を添加した  $\alpha$ -modified minimal essential medium を添加した 10%FBS 含有  $\alpha$ -MEM 培地を用いて骨誘導を行った。培地交換は 3~4 日おきに行い、誘導培養液に交換後、3 週間培養を継続した。分化誘導開始から 7, 14, 21 日後、Alizarin Red S 染色を行った。

#### 軟骨分化誘導能の解析

細胞を 15ml のポリプロピレンチューブ中に移し、5 分間遠沈し、細胞ペレットを作製した。軟骨分化誘導培養液として、1%FBS、10 ng/mltransforming growth factor- $\beta$ 1、1%insulin-transferrin-selenium (ITS)、50 mM ascorbate-phosphate を添加した  $\alpha$ -MEM 培地をポリプロピレンチューブ中に静かに加え、培養を行った。培養液は 3~4 日おきに交換し、培養は 4 週間継続した。4 週間後、パラフィン包埋した後、切片を作製し、1%alcian blue solution、0.1%safranin-O (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Germany)、抗コラーゲン 1 抗体を用いた染色を行った。

### 脂肪分化誘導能の解析

培養した細胞を 12 well プレートに播種し培養を行い、脂肪誘導能脂肪細胞誘導培地に切り替えた。40 日間培養を続けたのち、オイルレッドO 染色により評価を行った。培地交換は 1 週間に 2 回行った。

### 3) 歯小囊, 歯乳頭由来幹細胞におけるサイトカインの分化調節

歯小囊, 歯乳頭細胞を 24 well プレートに播種し、TNF- $\alpha$ 単独, IFN- $\gamma$ 単独, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ の同時添加によって骨誘導を行った。分化誘導後、Alizarin Red S 染色を行い、骨誘導能を比較した。

## 4. 研究成果

### 1) 歯小囊, 歯乳頭由来幹細胞の単離と他の間葉系幹細胞との生物学的特性の比較

患者から得られた抜歯後の埋伏歯から歯小囊, 歯乳頭組織を採取し、Ballini らの方法によって幹細胞の単離を行った。得られた細胞の生物学的解析を行った。歯小囊, 歯乳頭細胞は同様の増殖能力を示した。これらの細胞における幹細胞マーカーの解析をフローサイトメトリー法によって行った結果、CD90, CD73, CD105 などの幹細胞マーカーが陽性であることが示された。これらのことから歯小囊, 歯乳頭細胞から間葉系幹細胞が分離できた。

### 2) 歯小囊, 歯乳頭由来幹細胞におけるサイトカインの分化調節

歯小囊, 歯乳頭細胞由来細胞における骨分化誘導能, 脂肪分化能, 軟骨分化能を検討した。歯小囊, 歯乳頭細胞由来幹細胞は骨誘導 21 日目で Alizarin Red S 染色の強い陽性を示し、骨誘導能が示された。歯小囊, 歯乳頭細胞由来幹細胞は軟骨誘導 4 週間後、Alcian blue 染色陽性、コラーゲン 1 の陽性を示し、軟骨分化が確認された。また歯小囊, 歯乳頭細胞由来幹細胞は脂肪誘導 40 日目に脂肪滴の沈着が認められた。これらのことから歯小囊, 歯乳頭細胞由来細胞は骨分化誘導能, 脂肪分化能, 軟骨分化能を持つ多分化幹細胞であることが示された。

### 3) 歯小囊, 歯乳頭由来幹細胞におけるサイトカインの分化調節

歯小囊, 歯乳頭細胞由来細胞において IFN- $\gamma$ を単独添加することによってコントロールと比較して骨誘導能が抑制された。一方, TNF- $\alpha$ 単独では両細胞とも骨誘導能に変化は認められなかった。一方, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ の同時添加によって歯小囊, 歯乳頭細胞における IFN 誘導性の骨誘導能が抑制された。これらの結果によって TNF, IFN は歯小囊, 歯乳頭細胞由来幹細胞の骨誘導能を調節する作用を持つことが明らかになった。

本研究によって歯乳頭, 歯小囊組織から幹細胞の分離が可能であることを証明したまた歯乳頭, 歯小囊由来幹細胞が多分化能をもつこと、さらにその分化は Th1 サイトカインによって調節できることが明らかになった。

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 Ishida Y, Ohta K, Naruse T, Kato H, Fukui A, Shigeishi H, Nishi H, Tobiume K, Takechi M.	4. 巻 Mar22:86(4)
2. 論文標題 Candida albicans -Glucan-Containing Particles Increase HO-1 Expression in Oral Keratinocytes Via a Reactive Oxygen Species/p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Nrf2 Pathway.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infect Immun	6. 最初と最後の頁 26 : 86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------