様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19791578
研究課題名（和文）　ヒト歯根膜ＳＰ細胞を用いた歯周組織再生に関する研究

研究課題名（英文）Investigation of periodontal tissue regeneration using human periodontal ligament SP cells

研究代表者
川邉　紀章（KAWANABE　NORIAKI）
岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：00397879

研究成果の概要：
本研究では、side population (SP)法を用いてヒト歯根膜幹細胞に特異的な表面抗原マーカーの探索を行った。その結果、stage-specific embryonic antigen (SSEA)-4陽性歯根膜細胞が、脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞・神経細胞・肝細胞への分化能を有することが示された。このことから、SSEA-4が多分化能を有する歯根膜幹細胞のマーカーとして有用であることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学
キーワード：歯科矯正学

１．研究開始当初の背景

今日の歯科医療における歯や歯周組織の治療は、人工材料を用いた治療が主に行われている。しかし、人工材料を用いる治療では、審美性・耐久性・アレルギーなどの問題を完全に克服することは難しい。近年、これらの問題を克服するための新しい治療として、再生医療への期待が高まってきている。歯科の再生医療を実現するためには、歯・歯周組織へ分化することのできる幹細胞に対する研究が必要不可欠である。

再生医療に用いる幹細胞の候補としては、多分化能という面においては胎児幹細胞（ES細胞）がもっとも優れていると考えられている。しかし、ヒトES細胞の利用は、倫理的問題や技術的問題（腫瘍化など）といった多くの克服するべき問題が解決されておらず、未だに実用化の目処はたっていない。これに代

わる幹細胞として近年注目されているものは、成人幹細胞である。成人幹細胞はES細胞と比較して多分化能という点では劣るものの、自己由来の幹細胞を用いることができるため、倫理的問題や組織適合性などの問題を克服できるという利点がある。これまでに成人幹細胞の中で最もよく研究されているものは骨髄幹細胞であり、多くの種類の細胞へ分化させることが可能である。しかし、骨髄を採取するためには侵襲の大きい骨髄穿刺を行わなければならないという欠点を伴う。

申請者は、これらの問題を解決しうる幹細胞の候補の一つとして、歯根膜幹細胞に着目した。申請者は、ヒト歯根膜細胞が、骨髄間葉系幹細胞と同じ表面抗原マーカーを発現していることを解明しており、ヒト歯根膜細胞が骨髄間葉系幹細胞と同様の性質を保持していることが示された。また、最近の研究により、組織を修復させるために必要な多分化能をもつ幹細胞がヒト歯根膜にも存在する可能性が示唆されてきており、再生医療への応用の可能性が期待されている (Seo B.M. et al., 2004)。正常歯根膜組織は、矯正治療に伴う抜歯や、智歯抜歯、乳歯の自然脱落などにおいて得られる抜去歯を用いれば、治療にかかる以上の負荷をかけることはなく、非侵襲的に採取できるという利点がある。申請者らのグループは、ヒト歯根膜に、高い幹細胞活性をもつと言われているSP (side population) 細胞が存在することを報告した (Kawanabe N. et al., 2006)。SP細胞とは、Goodellら (1996) によって初めて報告された未分化な細胞が濃縮された集団であり、骨髄をはじめ臍帯血・筋・脳・皮膚・眼・乳腺など多くの組織において、その存在が確認されている。このSPという形質は、薬物排出能力が非常に高いという幹細胞に特有の性質に依存するものであり、細胞にDNA結合性蛍光色素であるHoechst33342を取り込ませて、フローサイトメトリーによって観察することができる。

２．研究の目的

本研究では、申請者の報告した歯根膜のSP細胞を再生医療へ応用していく方法を確立することを目的とする。そのために、具体的には以下の目的について実験を行う。

(1) ヒト歯根膜SP細胞が多分化能を持つかどうかをin vitroにて調べる。それぞれの分化誘導培地を用いて、脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞・神経細胞への分化能を持つかどうかを確認する。

(2) ヒト歯根膜SP細胞が生体内にて組織再生能を持つかどうかを調べる。歯根膜SP細胞を、免疫不全ラットの歯周組織へ移植し、in vivoにて歯周組織を再生できるかどうかを調べる。

また、SP細胞の分離・抽出は技術的に難しく、UVレーザーを搭載したフローサイトメーターという非常に高額の機材が必要となる。また、SP細胞の分離にはHoechst33342を用いるが、この色素はDNA結合色素であり、発癌を誘発する危険性がある。これらのことより、Hoechst33342を用いたSP細胞をそのまま臨床応用することは技術・費用・安全性の面で困難であると考えられる。これらの問題を克服するためには、SP細胞と同等の細胞を認識できる特異的表面抗原を同定する必要がある。特異的表面抗原が同定できれば、それに対する抗体を用い、磁気ビーズ法のように簡便・安価かつ安全な方法でSP細胞と同等の未分化な細胞を分離することが可能となる。このために、さらに以下の目的について実験を行う。

(3) ヒト歯根膜SP細胞およびNon-SP細胞 (SP以外の細胞) をフローサイトメトリーにて回収し、表面抗原RNAの発現の違いをDNAマイク

ロアレイにて調べる。発現の違いが認められるものについては、フローサイトメトリーを用いて、抗体による検出が可能かどうかを調べる。
(4) この抗原をもつ細胞が多分化能を持つかどうかを調べるために、脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞・神経細胞へ分化誘導できるかどうかをin vitroにて確認する。
(5) この抗原をもつ細胞が生体内にて組織再生能を持つかどうかを調べるために、免疫不全ラットの歯周組織へ移植し、in vivoにて歯周組織を再生できるかどうかを調べる。

３．研究の方法
(1) 細胞培養：本研究は，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認のもとに行われた。本研究に用いたヒト歯根膜は，矯正治療を目的に便宜抜去された患者の健全歯より採取した。歯根膜の提供を受けるに際して，規定に基づきこの歯根膜の使用目的を十分に説明し，同意を得たうえで本研究を開始した。提供を受けた患者の歯をCa^{2+}，Mg^{2+}非含有リン酸緩衝液（phosphate-buffered saline：PBS(-)）で2回洗浄した後，外科用替え刃メスを使用して歯根表面を削がないよう歯根膜を採取した。得られた歯根膜は，5 mg/mL collagenase type IIおよび2.5 mg/mL dispase Ｉ含有low-glucose Dulbecco’s modified Eagle medium（DMEM）にて37℃で60分間消化した。得られたヒト歯根膜細胞は，15%非働化済ウシ胎仔血清（heat inactivated fetal bovine serum：HIFBS）および1% penicillin/streptomycin（最終濃度各々100 U/mLおよび100 µg/mL）含有low-glucose DMEMで培養した。培地は週2回半量を交換した。
(2) フローサイトメトリー:細胞は2% HIFBS, 10mM HEPES および 1% penicillin/streptomycin 含有 Hanks’ balanced salt solution（HBSS；Invitrogen）に再懸濁した。細胞内抗原の検出の際は，細胞を4% paraformaldehyde（PFA）にて5分間固定を行った後，0.1% Nonidet P-40 にて 5 分間透過化処理を行った。抗体染色の場合，細胞懸濁液に一次抗体を添加し，60分間氷上にて反応させた。未標識一次抗体を用いる場合は，一次抗体反応後さらに蛍光標識された二次抗体を添加し，30分間氷上にて反応させた。Hoechst 染色の場合，細胞懸濁液に 5 µg/mL Hoechst 33342を添加し，37℃で90分間反応させた。ABC トランスポーターによる色素排出作用の阻害には，Hoechst 33342 添加前に 50 µM verapamil もしくは 5 µM reserpineを添加し10分間氷上で静置した。死細胞の検出には，7-amino-actinomycin D（７-AAD）を用いた。染色した細胞は，FACSAria（BD Biosciences）を用いて解析した。Fluorescein isothiocyanate（FITC), phycoerythrin(PE),7-AADおよびPE-Cy7は，488 nm のアルゴンイオンレーザーで励起し，それぞれ 530/30，575/26，695/40，780/60 のフィルターを用いて検出した。Allophycocyanin（APC）は 633 nm の He-Ne レーザーで励起し，660/20のフィルターで検出した。Hoechst 33342は407 nmのクリプトンレーザーで励起し，450/40（Hoechst 33342-Blue）と695/40（Hoechst 33342-Red）の２つのフィルターを用いて検出した。死細胞は前方・側方散乱光上でのゲーティング，および7-AAD陽性集団を除くことによって除外した。
(3) 脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞・神経細胞・肝細胞への分化誘導：①脂肪細胞への分化誘導は，10% HIFBS，1% penicillin/streptomycin，1 µM dexamethasone，0.2 mM indomethacin，0.01 mg/mL insulin，0.5 mM

3-isobutyl-1-methylxanthine 含有 high-glucose DMEM にて 21 日間培養を行った。培養した細胞は，oil red O にて染色し光学顕微鏡下において観察を行った。②骨芽細胞への分化誘導は，10% HIFBS，1% penicillin/streptomycin，100 nM dexamethasone，0.05 mM L-ascorbic acid，10 mM β-glycerophosphate 含有 minimum essential medium alpha medium（α-MEM）にて 21 日間培養を行った。培養した細胞は，alizarin red S にて染色し光学顕微鏡下において観察を行った。③軟骨細胞への分化誘導は、1% penicillin/streptomycin，100 nM dexamethasone，1 mM sodium pyruvate，0.17 mM L-ascorbic acid，0.35 mM L-proline，ITS+ Universal Culture Supplement Premix，10 ng/mL human transforming growth factor beta 3 (TGF-β3)含有 high-glucose DMEM にて 21 日間培養を行った。培養した細胞は，パラフィン包埋にて薄切した後、alcian blue にて染色し光学顕微鏡下において観察を行った。④神経細胞への分化誘導は，15% HIFBS，1% penicillin/streptomycin，10 ng/mL bFGF 含有 low-glucose DMEM にて 24 時間培養した後，1% penicillin/streptomycin，2% dimethyl sulfoxide (DMSO)，100 µM butylated hydroxyanisole (BHA)，10 µM forskolin，5 U/mL heparin，5 nM K252a，25 mM KCl，2 mM 2-propylpentanoic acid，N2 supplement，10 ng/mL human basic fibroblast growth factor (bFGF)，10 ng/mL human platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB)含有 low-glucose DMEM にて 24 時間培養した。培養した細胞は，抗 neuron-specific enolase (NSE) 抗体および Alexa Fluor 594 標識二次抗体を用いて染色し蛍光顕微鏡下にて観察を行った。
⑤肝細胞への分化誘導は、第一段階（0-5 日目）として 2% HIFBS，1% penicillin/streptomycin，100 ng/mL human acidic fibroblast growth factor (aFGF)含有 low-glucose DMEM にて 5 日間培養し、第二段階（5-10 日目）として 2% HIFBS，1% penicillin/streptomycin，20 ng/mL human hepatocyte growth factor (HGF) 含有 low-glucose DMEM にて 5 日間培養した。第三段階（10-21 日目）では、2% HIFBS，1% penicillin/streptomycin，20 ng/mL HGF，10 nM dexamethasone，insulin-transferrin-selenium X supplement，10 ng/mL oncostatin M 含有 low-glucose DMEM にて 11 日間培養した。培養した細胞は，抗 serum albumin 抗体および Alexa Fluor 594 標識二次抗体を用いて染色し蛍光顕微鏡下にて観察を行った。

４．研究成果

(1) 申請者が行ったSP法を用いて、ヒト歯根膜幹細胞を同定・単離できるかについて、clonal asayにて評価を行った。8個の歯根膜SP細胞のクローンを単離し、増殖させた後に骨芽細胞への分化誘導を行った。その結果、100% (8/8) のクローン細胞がアリザリンレッド陽性の骨芽細胞へ分化することが確認された。このことから、歯根膜SP細胞は、骨芽細胞への分化能を持つ未分化幹細胞を高純度に含んでいる細胞集団であることが示された。

(2) 申請者はさらに、このSP法を応用して、歯根膜幹細胞に特異的な表面抗原マーカーの探索を行った。その結果、グロボ系ガングリオシドである stage-specific embryo antigen-4 (SSEA-4)が、未分化な歯根膜幹細胞にて特異的に発現していることが示された。SSEA-4は未分化ヒト胚性幹細胞のマーカーとして知られているが、培養ヒト歯根膜細胞の約33%においても発現が認められた。ヒト胚性

幹細胞と同様、歯根膜細胞においても、all-*trans*-retinoic acid刺激を行うと、グロボ系ガングリオシドであるSSEA-3/SSEA-4発現の低下と、ラクト系ガングリオシドであるSSEA-1発現の上昇が認められた。SSEA-4陽性歯根膜細胞は、SSEA-4陰性細胞に比べて高い増殖活性とテロメア長を有していた。SSEA-4陽性歯根膜細胞のclonal assayを行った結果、63.6% (14/22)の細胞が脂肪細胞と骨芽細胞の両方への分化能を有していた。また、これらの細胞は、軟骨細胞・神経細胞・肝細胞への分化能を有していることが示された。このことから、SSEA-4陽性歯根膜細胞は、中胚葉由来組織（脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞）だけでなく、外胚葉由来組織（神経細胞）や内胚葉由来組織（肝細胞）への分化能も有する、高い分化能を持つ肝細胞であることが示された。

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）

〔学会発表〕（計　１件）

発表者（代表）名：<u>川邉紀章</u>、村田智子、村上薫、早野暁、黒坂寛、上岡寛、山本照子、山城隆

発表標題：SSEA-4 を用いたヒト歯根膜幹細胞の同定

学会等名：第８回日本再生医療学会総会

発表年月日：平成 21 年３月 5-6 日

発表場所：東京

〔産業財産権〕

○出願状況（計　１件）

産業財産権の名称：歯または歯周組織からの幹細胞の同定・単離方法ならびに該方法により得られる幹細胞

発明者：<u>川邉紀章</u>、山城隆

権利者：同上

産業財産権の種類：特許

番号：特願２００８－２００４３９

出願（取得）年月日：平成20年8月4日

国内・国外の別：国内

６．研究組織

(1)研究代表者

川邉　紀章（KAWANABE　NORIAKI）

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：00397879

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし