

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791620
 研究課題名 (和文)
 歯根膜細胞に存在する Side Population 細胞の特徴と歯周組織再生への応用
 研究課題名 (英文)
 Characteristics of Side Population Cells Existing in Periodontal Ligament Cells.
 研究代表者
 小出 容子 (KOIDE YOKO)
 昭和大学・歯学部・助教
 研究者番号：40407466

研究成果の概要：

確実に予知性の高い歯周組織再生療法は未だ確率していないが、過去の研究結果は *ex vivo* で増殖させた歯根膜細胞やそこから分取した組織幹細胞を用いた組織再生療法の有効性を示唆している。また、多くの組織・臓器での存在が確認されている Side Population(SP)細胞分画には多臓器に分化可能な最も未熟な組織幹細胞が存在すると考えられ、最近培養ヒト歯根膜細胞中にも SP 細胞分画が存在することが報告された。しかしながら、この歯根膜 SP 細胞はヘテロであるため、実際この細胞中に存在する SP 細胞から純化した組織幹細胞を用いた歯周組織再生療法の確立を目指し、培養ヒト歯根膜細胞中に存在する SP 細胞の特徴を明らかにした上で、この歯根膜 SP 細胞中からの組織幹細胞の純化を試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,500,000	0	1,500,000
平成 20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	450,000	3,450,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯根膜細胞、ヒト、再生療法、Side Population 細胞、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 限度を超えた損傷により機能回復の困難な組織・臓器の再生への幹細胞の応用が 21 世紀の再生医療として注目されている。ヒトの骨髄、骨格筋、真皮中には、間葉系幹細胞のみならず中胚葉系幹細胞が存在すること、また間葉系幹細胞は外胚葉由来の神経細胞や内胚葉由来の肝細胞にも分化する(幹細胞の可塑性)ことが見出されて以来、様々

な組織から組織幹細胞を採取して再生治療へ応用する試みが行われている。しかし、これまで種々の細胞表面分子を指標にして間葉系幹細胞や中胚葉系幹細胞を分取する試みが行われてきたが、現時点でこれらの幹細胞を特異的に識別するマーカーは明確ではない。

(2) 近年、細胞周期や薬剤耐性に関与する

ポンプ状分子を介して Hoechst 色素を汲み出す細胞分画である Side Population (SP) 細胞分画は、骨髄のみならず骨格筋、脳、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、角膜等の多くの臓器・組織に存在し、この分画に存在する細胞の骨格筋や血球系細胞への分化が確認されている¹⁾。したがって、SP 細胞分画には多臓器に分化可能な最も未熟な組織幹細胞が存在する可能性がある。

(3) 歯周炎は歯の支持組織の喪失を伴う疾病であるが、確実で予知性の高い歯周組織再生療法は未だ確立されていない。一方、すでに報告された多くの *in vivo* の実験結果は、歯根膜とセメント質の再生には既存の歯根膜の存在が不可欠であることを示している。したがって、歯根膜組織中には歯の支持組織の恒常性の維持や再生に深く関わる細胞が存在すると考えられる。しかし、培養歯根膜細胞はヘテロな細胞集団であり、種々の中胚葉系細胞の前駆細胞や更に未分化な組織幹細胞が存在すると考えられているが、現時点でこれらの細胞を特異的に識別するマーカーが判明していないためその存在は明確ではない。近年、Seo らは、歯根膜組織中における組織幹細胞の存在を報告した²⁾。しかし、臨床応用を想定した場合、Seo らの方法で幹細胞を採取することは現実的であるとはいえない。そこで、培養ヒト歯根膜細胞から幹細胞リッチな細胞集団を分取するためのマーカーの確定が重要であると考えられる。また最近、ブタ歯髄組織中に SP 細胞が存在すること³⁾、培養ヒト歯根膜細胞中に SP 細胞分画が存在すること⁴⁾ が相次いで報告された。

2. 研究の目的

培養ヒト歯根膜細胞中に存在する SP 細胞の特徴を明確にした上で、歯周組織再生への応用の可能性を検討することを目的とする。

培養ヒト歯根膜細胞から SP 細胞と SP 細胞以外の Main Population (MP) 細胞を分取し、(1)幹細胞マーカー分子の発現 (2)細胞増殖能 (3)種々の中胚葉系細胞への分化能 (4)強発現している既知および未知の遺伝子の網羅的解析 (5)腱・靭帯マーカー分子と歯根膜マーカー分子の発現 (6)歯周組織形成能を両細胞で比較検討する。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞マーカー分子発現の確認

培養ヒト歯根膜細胞を Hoechst 染色後、SP 細胞分画と MP 細胞分画における CD73 (SH3/SH4), CD105 (SH2), CD166 (SB-10),

STRO-1, CD146 の発現をフローサイトメトリーで解析する。また、SP 細胞分画と MP 細胞分画を分取・培養後、*bmi, stat3, tert, oct-4* の発現を RT-PCR にて確認する。

(2) 細胞増殖能の評価

SP 細胞と MP 細胞を分取・培養し、細胞増殖能を MTT 法で検討する。

(3) 種々の中胚葉系細胞への分化能の検討

分取した SP 細胞と MP 細胞を骨分化誘導培地、脂肪分化誘導培地、血管内皮細胞基本培地で単層培養、あるいは軟骨分化誘導培地でペレット培養する。各分化誘導後、骨、脂肪、軟骨、血管内皮細胞への多分化能を両細胞で比較検討する。この際、骨への分化は alkaline phosphatase (ALP) 活性染色、骨マーカー遺伝子 (*alp, runx2, osterix, osteopontin*) の発現 (RT-PCR) と石灰化結節の形成 (アリザリンレッド染色) で、脂肪への分化は脂肪マーカー遺伝子 (*lpl, ppar γ*) の発現 (RT-PCR) と脂肪滴の形成 (オイルレッド O 染色) で、軟骨への分化は軟骨マーカー遺伝子 (*type II collagen, sox9*) の発現 (RT-PCR) とタイプ II コラーゲン陽性の基質形成 (組織切片作成後、免染) で、血管内皮への分化は血管内皮細胞マーカー分子 [Flk-1/KDR (VEGFR-2), CD31, Tie-2, VE-cadherin] の発現 (フローサイトメトリーと免染) で、リンパ管内皮への分化はリンパ管内皮細胞マーカー分子 [Fit-4 (VEGFR-3), Prox-1, LYVE-1] の発現 (フローサイトメトリーと免染) で評価する。

(4) 強発現している既知および未知の遺伝子の網羅的解析

SP 細胞あるいは MP 細胞で強発現している既知および未知の遺伝子を歯根膜組織由来カスタマイズド DNA チップ (『PerioGen Chip』) を使用した gene expression profile 解析で網羅的に検討する。(なお、本遺伝子解析は研究協力者である大阪大学、口腔分子免疫制御学講座 村上伸也博士らの指導のもと、遂行する。)

(5) 腱・靭帯マーカー分子と歯根膜マーカー分子の発現の確認

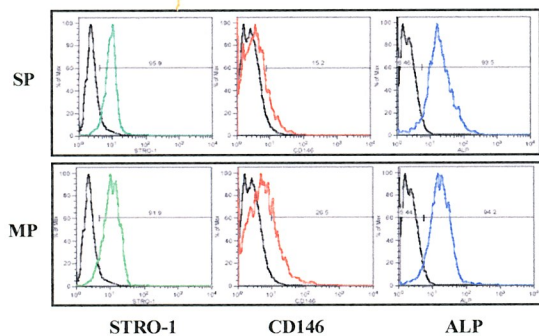
SP 細胞と MP 細胞を培養後、腱・靭帯マーカー遺伝子 (*scleraxis, comp, epha4, gdf-5*) と歯根膜マーカー遺伝子 (*periostin, plap-1, adamt1-4, byglycan, decorin*) の発現を RT-PCR で確認する。

4. 研究成果

(1) 研究結果

① 幹細胞マーカー分子発現の確認

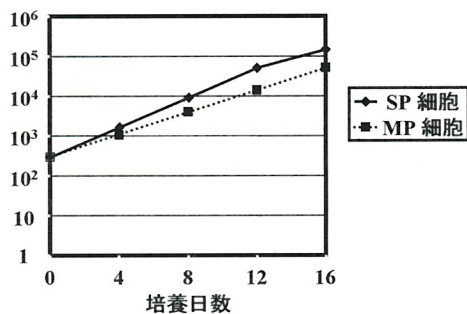
培養ヒト歯根膜細胞中の SP 細胞分画と MP 細胞分画において、歯根膜幹細胞との関連が指摘されている CD146/STRO-1 ならびに ALP の陽性細胞率を比較すると、STRO-1 陽性細胞率は SP で 95.9%・MP で 91.9%、CD146 陽性細胞率は SP で 15.2%・MP で 26.5%、ALP 陽性細胞率は SP で 93.5%・MP で 94.2%であり、両細胞間で大きな差は認められなかった [図 1]。



[図 1] SP, MP 細胞分画における幹細胞マーカー分子の発現率

② 細胞増殖能の評価

培養ヒト歯根膜細胞中から分取したそれぞれ 500 個の SP 細胞と MP 細胞で細胞増殖能を比較すると、SP 細胞は MP 細胞よりも高い増殖能を示し、培養開始 12 日目では約 4 倍の細胞がカウントされた。[図 2]

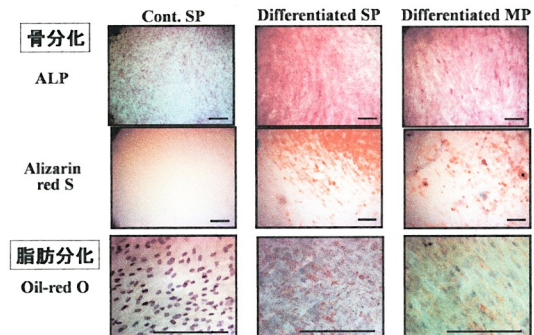


[図 2] SP, MP 細胞における細胞増殖能

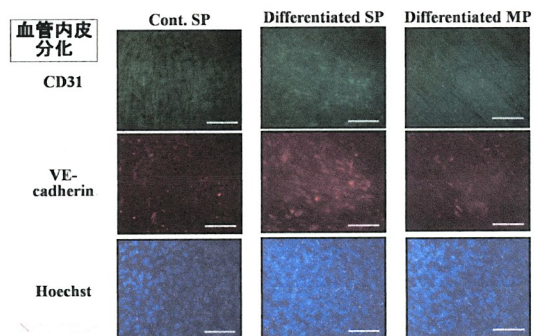
③ 種々の中胚葉系細胞への分化能の検討

培養ヒト歯根膜細胞中から分取した SP 細胞と MP 細胞を骨分化誘導培地あるいは脂肪分化誘導培地で 21 日間培養し、骨・脂肪への分化能を比較すると、ALP 陽性細胞とアリザリンレッドで染色される石灰化結節の形成、およびオイルレッド O で染色される脂肪滴を有する細胞は、いずれも SP 細胞で多く認

められた [図 3-1]。さらに、SP, MP 両細胞を血管内皮前駆細胞分化誘導培地で 21 日間培養すると、CD31 かつ VE-カドヘリン陽性の細胞は、SP 細胞のみで認められ、MP 細胞とコントロール培地で培養した SP 細胞では認められなかった [図 3-2]。



[図 3-1] SP, MP 細胞における骨・脂肪への分化能



[図 3-2] SP, MP 細胞における血管内皮への分化能

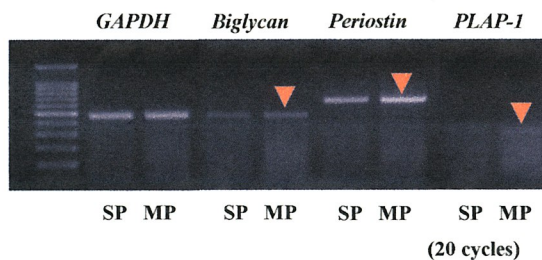
④ 強発現している既知および未知の遺伝子の網羅的解析

ヒト歯根膜組織由来カスタマイズド DNA チップ (PerioGen Chip) を用いて、SP 細胞と MP 細胞でそれぞれ強発現している既知および未知の遺伝子を網羅的に解析したところ、幹細胞マーカー遺伝子である CD73 は SP 細胞で強く発現しており、一方、MP 細胞では *pro- α 1 type III collagen* や *procollagen type I α 2 chain* などの細胞外基質の遺伝子のみならず、歯根膜マーカー分子である *PLAP-1* や *Periostin* の遺伝子が強発現していることがわかった [表 1]。

SP細胞で発現が高い遺伝子	MP細胞で発現が高い遺伝子
<ul style="list-style-type: none"> • integrin beta 1 control • CD73 control • Homo sapiens proline synthetase co-transcribed homolog (bacterial), mRNA (cDNA clone MGC: 26671 MAG 3546307), complete cds. • Homo sapiens glutaredoxin mRNA, complete cds. • Homo sapiens calmodulin (CALM2) gene, exons 3-6, and complete cds. • MALAT1 metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA) [Homo sapiens] • Human mRNA for cytoskeletal gamma-actin • Adenosine receptor A2b control 	<ul style="list-style-type: none"> • Human mRNA for pro-alpha-1 type 3 collagen • PLAP-1 • Periostin • Human decorin (DCN) gene, exon 8, complete cds. NTPDase3 control • COL3A1 • Human fibrillin 2 mRNA, complete cds. • GSS07: unknown • Human thrombospondin 2 (THBS 2) mRNA, complete cds. • Homo sapiens RNA for type VI collagen alpha 3 chain. G58655: ZWILCH Zwich, kinetochore associated, homolog (Drosophila) [Homo sapiens] • Homo sapiens mRNA for prepro-alpha 1 (I) collagen. • Homo sapiens pigment epithelium- differentiation factor (PEDF) mRNA, complete cds. • Homo sapiens mRNA for selenoprotein P. • Human procollagen type 1 alpha-2 chain, partial exon 1. • Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564C093 (from clone DKFZp564C093)

〔表 1〕 SP, MP 細胞における遺伝子発現のプロファイル解析

⑤歯根膜マーカー分子の発現の確認
 培養ヒト歯根膜細胞中のSP細胞分画とMP細胞分画において、歯根膜マーカー分子である *PLAP-1*, *Periostin* および *Biglycan* の遺伝子発現を RT-PCR で確認したところ、やはりこれらの遺伝子の発現は SP 細胞と比較して MP 細胞で強いことが確認された〔図 4〕。



〔図 4〕 SP, MP 細胞における歯根膜マーカー分子の発現

(2) 研究の結論

本研究結果より、培養歯根膜細胞中の SP 細胞分画には種々の中胚葉系前駆細胞が豊富に存在する可能性があることが示唆された。この SP 細胞は歯周組織再生を目的とした細胞療法の候補になり得ると思われる。

(3) 参考文献

- 1) Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med.* 183(4):1797-806, 1996.
- 2) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from

human periodontal ligament. *Lancet.* 364(9429):149-55, 2004.

3) Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells.* 24(11): 2493-503, 2006.

4) Kawanabe N, Murakami K, Takano-Yamamoto T. The presence of ABCG2-dependent side population cells in human periodontal ligaments. *Biochem Biophys Res Commun.* 344(4): 1278-83, 2006.

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

① Koide Y, Kobayashi M, Yamamoto M. Characteristics of Side Population Cells Existing in Periodontal Ligament Cells. 86th General Session & Exhibition of the IADR AND 32nd Annual Meeting of the CADR, July, 2008, Toronto, Canada

② 小出容子、小林 誠、鶴見亜有子、三井 将、松崎有未、山田 聡、村上伸也、山本松男. 培養ヒト歯根膜細胞中に存在する Side Population 細胞の特徴. 第 7 回日本再生医療学会総会, 2008 年 3 月, 名古屋

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出 容子 (KOIDE YOKO)
 昭和大学・歯学部・助教
 研究者番号: 40407466