

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592163

研究課題名（和文） 硬組織形成における組織幹細胞微小環境の解明

研究課題名（英文） Microenvironment of stem cells in bone formation

研究代表者

二宮 禎 (NINOMIYA TADASHI)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号：00360222

研究成果の概要（和文）：本研究では、幹細胞が豊富に含まれると考えられている Side Population (SP)細胞を用いて、歯根膜細胞 SP 細胞の硬組織形成能を検討した。SP 細胞は、Non-SP (NSP)細胞と比べると、高い骨芽細胞分化能および石灰化能を有した。SP 細胞では、BMP-2、NSP 細胞では、石灰化抑制因子である periodontal ligament associated protein-1 の高い発現が認められた。本研究により、SP 細胞は歯槽骨再生に適することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the micro environment of stem cell in alveolar bone formation, we examined osteogenic potential of side population (SP) cell which contain abundantly the stem cells, in PDL cells. Isolated SP cells from rat PDL cells had high potential in differentiation into osteoblasts and formation of calcified matrices, compared with non-SP (NSP) cells. The gene expressions of osteoblast markers and BMP-2 in SP cells were higher level than that in NSP cells. On the other hand, the gene expressions of mineralization inhibitors such as periodontal ligament-associated protein-1 were high level in NSP cells. This study indicates that SP cells in PDL have high abilities to form bone-like matrices and are effective in regeneration of alveolar bone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔解剖学

科研費の分科・細目：歯学・口腔解剖学（含組織学・発生学）

キーワード：硬組織形成、Side Population 細胞、歯根膜細胞、微小環境

1. 研究開始当初の背景

- (1) 歯の欠損・喪失に対する硬組織再生医療は、細胞の供給源に問題があり、いまだ完全な治療法が確立されていない。
- (2) 組織幹細胞において、自己複製機能や分化を Wnt シグナルが調節するのに対し、

BMP は自己複製を阻害し、分化を進行させることが報告されている。

- (3) 歯周組織においても、Wnt, BMP シグナルが組織幹細胞の細胞微小環境を調節するのに重要な役割を担っていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、以下のことを明らかにすることを目的とした。

- (1) 歯根膜組織における硬組織形成に関わる組織幹細胞 (SP 細胞) の存在と特性
- (2) 歯根膜組織幹細胞 (SP 細胞) を用いた再生医療の可能性

3. 研究の方法

- (1) 歯根膜細胞における SP 細胞の単離：ラット臼歯より歯根膜細胞を採取し、Hoechst 処理を行った後、Fluorescence activating cell sorting system (FACS) により、SP 細胞を解析および単離した。
- (2) SP 細胞の性状解析：SP 細胞と Non-SP (NSP) 細胞の細胞増殖をアラマーブルー法により評価した。
- (3) 硬組織形成能の検討：骨芽細胞分化誘導培地により、SP および NSP 細胞の硬組織形成能を比較した。その際の骨芽細胞分化マーカーおよび石灰化抑制因子の発現を RT-PCR により検索した。
- (4) SP 細胞の特異因子の検索：SP および NSP 細胞から採取した mRNA をマイクロアレイにより、網羅的解析を行った後、Real-time PCR で定量した。
- (5) *in vivo* における SP 細胞の硬組織形成能の検討：GFP 陽性 SP および NSP 細胞を播種したハイドロキシアパタイト (HA) スキャホールドを Wild Type ラットの背部筋膜下に移植した。移植 12 週目に摘出し、組織化学的および免疫組織化学的染色により評価した。

4. 研究成果

- (1) 歯根膜細胞には、約 2 % の SP 細胞が含まれていた (図 1)。

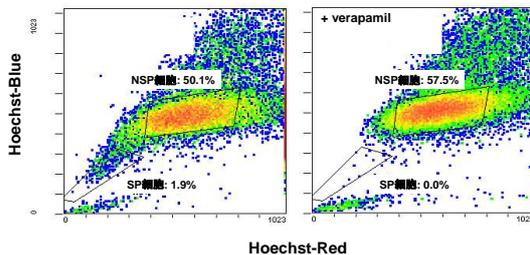


図 1. FACS による解析

- (2) 歯根膜 SP 細胞は、NSP 細胞よりも増殖能が低かった (図 2)。
- (3) *in vitro* 実験により、SP 細胞は、NSP 細胞よりも、骨芽細胞分化および硬組織形成能が高いことが明らかになった (図 3)。SP 細胞は、骨芽細胞分化誘導培地で培養することで、骨芽細胞分化マーカーの遺

伝子発現があがった (図 4)。このことより、SP 細胞により形成された硬組織は、骨様硬組織であることが示唆された。一方、NSP 細胞では、石灰化抑制因子として知られる periodontal ligament associated protein-1 (PLAP-1) と matrix gla-protein (MGP) の高い発現が認められた (図 5)。

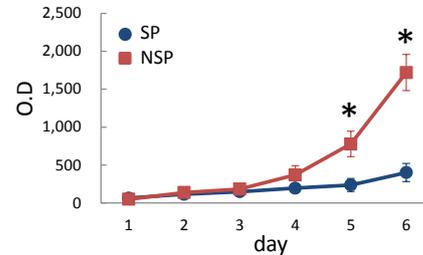


図 2. 細胞増殖曲線



図 3. 骨芽細胞分化と石灰化能の評価

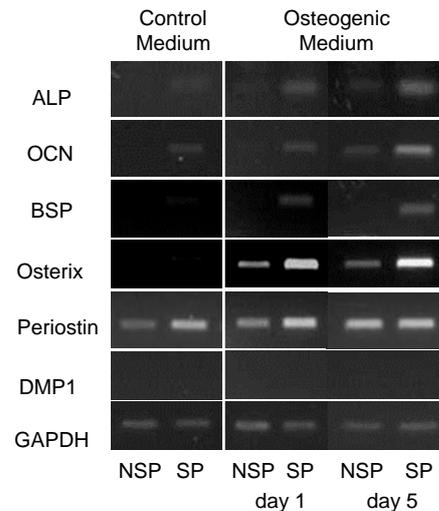


図 4. 骨芽細胞分化マーカー発現の検索

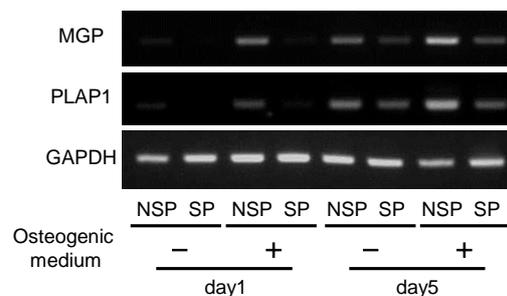


図 5. 石灰化抑制因子の発現

(4) SP 細胞は、NSP 細胞よりも、BMP-2 と BMPR-2 の遺伝子発現が高かった(図 6)。

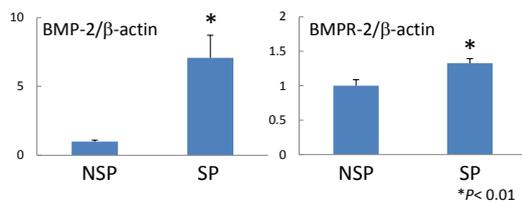


図 6. BMP-2 と BMPR-2 の遺伝子発現

(5) SP 細胞は、移植実験においても硬組織形成能が高いことが示された(図 7)。NSP 細胞を播種した HA では、Alizarin Red 陽性硬組織は形成されなかったが、SP 細胞を播種した HA では、硬組織形成が認められた。この硬組織は、osteopontin および bone sialoprotein 陽性であったことから、骨様硬組織であることが示された。

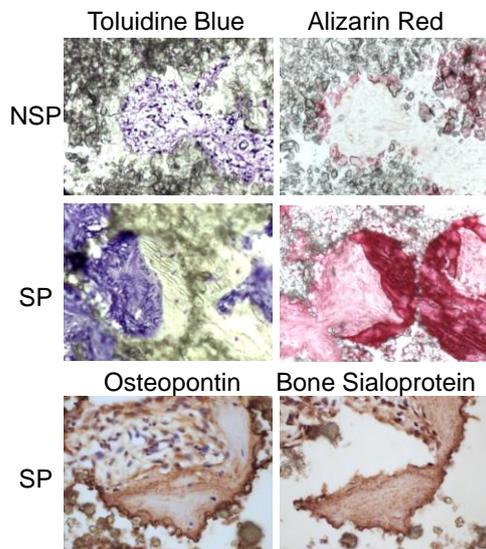


図 7. 移植実験における硬組織形成

(6) 本実験により、以下のことが示された。

- ① 歯根膜 SP 細胞は、高い硬組織形成能を有することが明らかになった。
- ② 歯根膜 SP 細胞を用いることで、効率的な歯周組織再生が期待される。

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 32 件)

- ① T. Ninomiya, A. Hosoya, T. Hiraga, M. Koide, K. Yamaguchi, H. Oida, Y. Arai, N. Sahara, H. Nakamura, H. Ozawa (2011) Prostaglandin E₂ receptor EP4-selective agonist (ONO-4819) increases bone formation by modulating mesenchymal cell differentiation. Eur

J Pharmacol 650:396-402 査読有

- ② T. Yonezawa, S. Hasegawa, M. Asai, T. Ninomiya, T. Sasaki, BY Cha, T. Teruya, H. Ozawa, K. Yagasaki, K. Nagai, JT. Woo (2011) Harmine, a β -carboline alkaloid, inhibits osteoclast differentiation and bone resorption *in vitro* and *in vivo*. Eur J Pharmacol 650:511-518 査読有
- ③ Y. Kariya, M. Honma, A. Hanamura, S. Aoki, T. Ninomiya, Y. Nakamichi, N. Udagawa, H. Suzuki (2011) Rab27a and Rab27b are involved in stimulation-dependent RANKL release from secretory lysosomes in osteoblastic cells. J Bone Miner Res 26:689-703 査読有
- ④ S. Aoki, M. Honma, Y. Kariya, Y. Nakamichi, T. Ninomiya, N. Takahashi, N. Udagawa, H. Suzuki (2010) Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. J Bone Miner Res 25:1907-1921 査読有
- ⑤ K. Tanaka, S. Tanaka, A. Sakai, T. Ninomiya, Y. Arai, T. Nakamura (2010) Deficiency of vitamin A delays bone healing process in association with reduced BMP2 expression after drill-hole injury in mice. Bone 47:1006-1012 査読有
- ⑥ H. Nakamura, A. Yukita, T. Ninomiya, A. Hosoya, T. Hiraga, H. Ozawa (2010) Localization of Thy-1-positive cells in the perichondrium during endochondral ossification. J Histochem Cytochem 58:455-462 査読有
- ⑦ T. Hiraga, T. Ninomiya, A. Hosoya, H. Nakamura (2010) Administration of the bisphosphonate Zoledronic Acid during tooth development inhibits tooth eruption and formation, and induces dental abnormalities in rats. Calcified Tissue Int 86:502-510 査読有
- ⑧ A. Hosoya, T. Ninomiya, T. Hiraga, K. Yoshida, N. Yoshida, E. Kasahara, H. Ozawa, H. Nakamura (2010) Potential of periodontal ligament cells to regenerate alveolar bone. J Oral Biosci 52:72-80 査読有
- ⑨ PH. de Freitas, M. Li, T. Ninomiya, M. Nakamura, S. Ubaidus, K. Oda, N.

- Udagawa, T. Maeda, R. Takagi, N. Amizuka (2009) Intermittent Parathyroid Hormone Administration Stimulates preosteoblastic proliferation without leading to enhanced bone formation in osteoclast-less c-fos(-/-) mice. *J Bone Miner Res* 24:1586-1597 査読有
- ⑩ N. Kodama, M. Nagata, Y. Tabata, M. Ozeki, T. Ninomiya, R. Takagi (2009) A local bone anabolic effect of rhFGF2-impregnated gelatin hydrogel by promoting cell proliferation and coordinating osteoblastic differentiation. *Bone* 44:699-707 査読有
- ⑪ M. Koide, S. Kinugawa, T. Ninomiya, T. Mizoguchi, T. Yamashita, K. Maeda, H. Yasuda, Y. Kobayashi, H. Nakamura, N. Takahashi, N. Udagawa (2009) Diphenylhydantoin inhibits osteoclast differentiation and function through suppression of NFATc1 signaling. *J Bone Miner Res* 24:1469-1480 査読有
- ⑫ Y. Tomimori, K. Mori, M. Koide, Y. Nakamichi, T. Ninomiya, N. Udagawa, H. Yasuda (2009) Evaluation of pharmaceuticals with a novel fifty-hour animal model of bone loss. *J Bone Miner Res* 24:1194-1205 査読有
- ⑬ C. Gonzales, H. Hotokezaka, Y. Arai, T. Ninomiya, J. Tominaga, I. Jang, Y. Hotokezaka, M. Tanaka, N. Yoshida (2009) An In Vivo 3D Micro-CT Evaluation of Tooth Movement after the Application of Different Force Magnitudes in Rat Molar. *Angle Orthodontist* 79:703-714 査読有
- ⑭ T. Mizoguchi, N. Muto, N. Udagawa, A. Arai, T. Yamashita, A. Hosoya, T. Ninomiya, H. Nakamura, Y. Yamamoto, A. Kinugawa, M. Nakamura, Y. Nakamishi, Y. Kobayashi, S. Nagasawa, K. Oda, H. Tanaka, M. Tagaya, JM. Penninger, M. Ito, N. Takahashi (2009) Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *J Cell Biol* 184:541-554 査読有
- ⑮ T. Hiraga, T. Ninomiya, A. Hosoya, M. Takahashi, H. Nakamura (2009) Formation of bone-like mineralized matrix by periodontal ligament cells in vivo: a morphological study in rats. *J Bone Miner Metab* 27:149-157 査読有
- ⑯ H. Nakamura, T. Hiraga, T. Ninomiya, A. Hosoya, N. Fujisaki, T. Yoneda, H. Ozawa (2008) Involvement of cell-cell and cell-matrix interactions in bone destruction induced by the metastatic MDA-MB-231 human breast cancer cells in nude mice. *J Bone Miner Metab* 26:642-647 査読有
- ⑰ A. Hosoya, T. Ninomiya, T. Hiraga, C. Zhao, K. Yoshida, N. Yoshida, M. Takahashi, T. Okabe, S. Wakitani, H. Yamada, E. Kasahara, H. Ozawa, H. Nakamura (2008) Alveolar bone regeneration of subcutaneously transplanted rat molar. *BONE* 42:350-357 査読有
- [学会発表] (計 38 件)
- ① 二宮 禎: ラクトフェリンは細胞分化を制御し、卵巣摘出ラットの骨量減少を抑制する。第 30 回日本骨形態計測学会、2010 年 5 月 14 日、米子コンベンションセンター (鳥取県)
- ② 平賀 徹: 乳がん Side population 細胞は高い骨転移能を有するか?、第 28 回日本骨代謝学会、2010 年 7 月 21 日、京王プラザホテル (東京都)
- ③ T. Ninomiya: Osteogenic potential of side population cells in periodontal ligament. 32th American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, October, 17, 2010, Metro Toronto Convention Centre/ South Building (Toronto, Canada)
- ④ T. Hiraga: Side population in human breast cancer cells exhibits cancer stem cell-like properties but does not have higher bone-metastatic potential. 32th American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, October, 17, 2010, Metro Toronto Convention Centre/ South Building (Toronto, Canada)
- ⑤ Y. Kariya: Rab27a and Rab27b are involved in stimulation-dependent RANKL release from secretory lysosomes in osteoblastic cells. 32th American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, October, 17, 2010, Metro Toronto Convention Centre/ South Building (Toronto, Canada)
- ⑥ M. Koide: OPG rather than RANKL regulates alveolar bone loss. 32th American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, October, 18,

- 2010, Metro Toronto Convention Centre/ South Building (Toronto, Canada)
- ⑦ 陳彦呈: 歯根膜におけるビタミンD レセプターの局在とビタミン D3 の作用について、第 52 回歯科基礎医学会、2010 年 9 月 22 日、タワーホール船堀 (東京都)
 - ⑧ 細矢明宏: Thy-1 陽性歯髄細胞の硬組織形成能に関する形態学的研究、第 52 回歯科基礎医学会、2010 年 9 月 22 日、タワーホール船堀 (東京都)
 - ⑨ 平賀 徹: 乳癌 side population 細胞の骨転移能、第 69 回日本癌学会総会、2010 年 9 月 24 日、大阪国際会議場 (大阪府)
 - ⑩ 二宮 禎: In Vivo マイクロ CT を用いた骨形態解析、第 29 回日本骨形態計測学会、2009 年 5 月 30 日、大阪国際会議場 (大阪府)
 - ⑪ 二宮 禎: In Vivo マイクロ CT の骨研究における有用性、第 1 回 In-vivo micro CT Forum、2009 年 8 月 6 日、松本歯科大学 (長野県)
 - ⑫ 二宮 禎: In Vivo マイクロ CT の骨研究における有用性、第 9 回日本外傷歯学会、2009 年 10 月 4 日、日本大学 (東京都)
 - ⑬ 中村浩彰: 軟骨膜・骨膜の Thy-1 (CD90) 陽性細胞の骨原生細胞としての役割、第 27 回日本骨代謝学会、2009 年 7 月 25 日、大阪国際会議場 (大阪府)
 - ⑭ T. Hiraga: Administration of Bisphosphonate during Tooth Development Inhibits Tooth Formation and Eruption, and Induces Odontomas. 31th American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, September 12, 2009, Colorado, America
 - ⑮ 二宮 禎: 歯根膜 SP 細胞を用いた歯槽骨再生の試み、第 50 回 歯科基礎医学会、2008 年 9 月 24 日、TOC 有明コンベンションホール (東京都)
 - ⑯ 平賀 徹: 歯根膜細胞の in vivo における骨形成能、第 50 回 歯科基礎医学会、2008 年 9 月 24 日、TOC 有明コンベンションホール (東京都)
 - ⑰ 中村浩彰: 軟骨内骨化における Thy-1 陽性細胞について、第 68 回日本解剖学会中部支部学術集会、2008 年 10 月 11 日、名古屋市立大学 (愛知県)
 - ⑱ 二宮 禎: 歯根膜 SP 細胞を用いた歯槽骨再生の試み、第 26 回 日本骨代謝学会、2008 年 10 月 30 日、大阪国際会議場 (大阪府)
 - ⑲ 平賀 徹: 歯根膜細胞による歯周組織形成能、第 26 回 日本骨代謝学会、2008 年 10 月 30 日、大阪国際会議場 (大阪府)
 - ⑳ T. Hiraga: Osteogenic Potential of Periodontal Ligament Cells in Vivo.

30th American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, September 15, 2008, Palais Des Congres (Montriel, Canada)

〔図書〕 (計 1 件)

- ① N. Takahashi, M. Koide, T. Noguchi, T. Suda (2009) Chapter 23: Current paradigms of osteoblast-osteoclast interactions and bacterial pathogen-induced bone resorption. Periodontal Medicine and Systems Biology, 3rd Edition, Blackwell Publishing, Chichester, 379-394.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二宮 禎 (NINOMIYA TADASHI)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号: 00360222

(2) 研究分担者

中村 浩彰 (NAKAMURA HIROAKI)

松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 50227930

平賀 徹 (HIRAGA TORU)

松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 70322170

小出 雅則 (KOIDE MASANORI)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号: 10367617