

機関番号：32622

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：平成 20 年度 (2008) ～ 平成 22 年度 (2010)

課題番号：20592436

研究課題名 (和文) 培養歯根膜細胞中の組織幹細胞を用いた歯周組織再生療法確立のための基礎的研究

研究課題名 (英文) Investigation for establishment of periodontal regenerative therapy using stem cells in cultured periodontal ligament cells

研究代表者：小林 誠 (Kobayashi Makoto)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：80186767

研究成果の概要 (和文)：

平成 20 年度：ヒト歯根膜中に存在する Side Population (SP) 細胞で特徴的なフェノタイプの検討を行ったが、この SP 細胞は必ずしも間葉系幹細胞が豊富に存在する細胞集団ではないことが明らかになった。

平成 21 年度：ヒト歯根膜細胞の骨分化誘導過程における Twist と各種 BMP antagonist の発現動態を検討したところ、ヒト歯根膜細胞は恒常的に Twist, Gremlin, Follistatin を発現して自らの骨芽細胞様分化を抑制的に制御しており、骨芽細胞様分化が誘導されると、Twist と Gremlin/Follistatin はその発現がそれぞれ促進的、抑制的に制御され、この細胞の骨芽細胞様分化を調節している可能性があることが明らかになった。また、ヒト歯根膜細胞中に存在する Alkaline phosphatase (ALP) 陽性細胞と陰性細胞の特徴を検討し、ALP+細胞は骨芽細胞様の細胞集団であり、一方、ALP-細胞は細胞増殖能が高く、骨芽細胞様の分化能が乏しい線維芽細胞様の細胞集団であること、また、Biglycan は特に ALP+細胞における骨芽細胞様分化を促進的に制御しており、一方 Decorin は骨芽細胞様分化の誘導過程で発現が増加し、両細胞の石灰化を抑制的に制御している可能性があることが明らかになった。

平成 22 年度：ヒト歯根膜から回収した細胞から FACS で分取した CD271+/CD90+ の細胞を single cell culture し、間葉系幹細胞 (MSC) の特徴を有するクローンを獲得する試みを行い、CD271 と CD90 は歯根膜から MSC を純化するためのマーカーになり得ることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：

In 2008: The various types of stem cells exist in side population (SP) effused strongly Hoechst 33342 dye. The SP cells in bone marrow express cell surface markers of human stem cells (HSCs) and are highly enriched for HSC activity. In this study, we clarified the characteristics of SP cells isolated from human periodontal ligament (HPDL) cells. Unfortunately, the present data concluded that HPDL cells contain SP cells, whereas the SP cells are not enriched for mesenchymal stem cell (MSC)-like properties.

In 2009, Twist and bone morphogenetic protein (BMP) antagonists may play an important role in maintenance of constancy of PDL, by which negatively regulate osteoblastic differentiation of cells existing in PDL. In this study, changes of these molecules expression by inducing osteoblastic differentiation were assessed in HPDL cells. We further investigated regulatory effects of BMP antagonists on osteoblastic differentiation in the cells. The present results suggest that under physiological condition, twist and BMP antagonists; gremlin and follistatin, which are constitutively expressed in HPL cells, negatively regulate osteoblastic differentiation of the cells. Further, the induction of osteoblastic differentiation in HPL cells simultaneously enhances twist expression, while it suppresses expression of gremlin and follistatin, as the result, the osteoblastic differentiation may be modulated.

PDL contains fibroblastic cells, which may participate in formation and maintenance of PDL fibers, and osteoblastic cells with a potential to generate alveolar bone and cementum, however, the specific markers for recognition and isolation of each cell type have not been clarified. The purpose of this study was to isolate alkaline phosphatase (ALP)-positive and -negative subpopulations from HPDL cells using flowcytometry and to identify functional difference between the 2 subsets in terms of mitogenic activity,

osteogenic potential and expression of decorin as well as biglycan. The present results suggest that ALP-positive HPDL cells have osteoblast-like phenotype, while ALP-negative HPDL cells are fibroblastic cell population with weak osteogenic potential. Further, biglycan may positively regulate osteoblastic differentiation in ALP-positive HPDL cells, while decorin, whose expression is increased by osteogenic induction, may negatively regulate mineralization in both subpopulations.

In 2010, to investigate characteristics of MSC existed in PDL, CD271+/CD90+ cells, which were isolated from HPDL by FACS, were single cell cultured, and the clones with MSC-like properties were collected. Therefore, CD271+/CD90+ may be a marker to collect MSC from HPDL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1500,000	450,000	1950,000
平成 21 年度	1400,000	420,000	1820,000
平成 22 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総 計	3600,000	1080,000	4680,000

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：ヒト歯根膜、間葉系幹細胞、歯周組織再生、Side Population (SP) 細胞、骨分化制御、BMP アンタゴニスト、twist、biglycan、decorin

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な組織から採取した組織幹細胞を再生医療へ応用する試みが精力的に行われている。歯周炎は歯の支持組織の喪失を伴う疾病であるが、それを治療する確実で予知性の高い歯周組織再生療法は未だ確立していない。しかし、すでに報告された幾つかの研究結果は、骨髄から分取した間葉系幹細胞(MSC)を用いた歯周組織再生治療の有効性を示唆している。

過去報告された多くの *in vivo* の研究結果は、歯の支持組織、特に歯根膜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おり、このことは歯根膜から分取した間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生療法の有効性を示唆している。歯根膜は歯槽骨とセメント質を繋ぐ線維性結合組織であるが、この組織中には硬組織形成細胞（骨芽細胞、セメント芽細胞）、線維芽細胞、血管構成細胞、神経細胞などの成熟細胞のみならず、これら細胞種の前駆細胞や更に未分化な幹細胞が存在していると考えられている。しかし、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、その存在頻度を正確に把握することはできない。近年、Seoら(2004)とTomokiyoら(2007)は歯根膜組織中からMSCとしての特徴を有する細胞を採取した。しかし、歯根膜から効率的にMSCを採取する方法は確立されていない。

細胞周期や薬剤耐性に関するポンプ

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、膵臓、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。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幹細胞が存在する可能性がある。実際、ブタ歯髄組織中には象牙質、骨、脂肪、軟骨、脂肪、神経に分化する SP 細胞が存在すること (Iohara ら, 2007)、培養ヒト歯根膜細胞中にも SP 細胞分画が存在する (Kawanabe ら, 2006) ことが相次いで報告された。しかし、この培養ヒト歯根膜細胞中に存在する SP 細胞の特徴は明確でない。

歯根膜組織中には骨芽細胞様の細胞が存在しているにも拘らず、この組織は石灰化せずに組織の恒常性が維持されている。したがって、歯根膜細胞は自らの骨芽細胞様分化を抑制する分子を発現して、これに関わっている可能性がある。一方、Twist や数種の Bone morphogenetic protein (BMP) antagonist は骨形成や骨芽細胞分化を抑制的に制御することが報告されている。しかし、これらの分子の多くは、歯根膜細胞での発現の有無やその発現調節機構、また骨芽細胞様分化に及ぼす作用が明確にされていない。

歯根膜組織中には主要な骨マーカーである alkaline phosphatase (ALP) の陽性細胞と陰性細胞が存在しており、培養歯根膜細胞か

ら分取した ALP 陽性細胞は ALP 陰性細胞と比較して、骨芽細胞様の分化能が高いこと、また Fibroblast growth factor (FGF), Transforming growth factor- β (TGF- β) の受容体や骨マーカーである osteocalcin と bone sialoprotein の遺伝子発現が強く、basic FGF 依存的な細胞増殖能が高いことが報告されている。しかし、培養歯根膜細胞中に存在する ALP 陽性細胞と ALP 陰性細胞の特徴は未だ不明な点が多い。一方、Class 1 small leucine rich proteoglycan (SLRP) に属する細胞外基質タンパク質 (ECM) である Biglycan と Decorin は、腱、靭帯や歯根膜での発現が確認されており、また、この様な細胞機能の調節に関わる候補分子であると考えられる。しかし、培養歯根膜細胞中に存在する ALP 陽性細胞と ALP 陰性細胞における、Biglycan と Decorin の発現、骨芽細胞様分化の誘導に伴うこれらの分子の発現動態、これらの分子が骨芽細胞様分化に及ぼす作用に関する報告はない。

幾つかの研究グループは歯根膜中から MSC としての特徴を有する細胞を採取した。しかし、これらの MSC は、ヘテロな細胞集団であったり、不死化した細胞株であるため、歯根膜由来の MSC の特徴は明らかでない。一方、低親和性 neurotrophin 受容体および腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーに属している CD271 (LNGFR/p75NTR) は、中枢および末梢神経系における、運動および感覚神経、希突起膠細胞 (oligodendrocytes)、星状膠細胞 (astrocytes)、シュワン細胞、神経堤 (neural crest) 前駆細胞を含むグリア細胞で発現しており、神経細胞の発生、生存および分化に関与すると考えられている。また、この分子は、骨髄や脂肪から MSC を濃縮するためのマーカーであることも明らかにされており、実際、共同研究者の馬淵らは、ヒトの骨髄からコラゲナーゼ処理で採取した細胞の、CD271+/CD90+ の分画中には MSC が高度に濃縮されていることを明らかにした (2009)。しかし、CD271, CD90 が、歯根膜から MSC を純化するマーカーであるかは不明である。

2. 研究の目的

歯根膜中の MSC を用いた歯周組織再生療法を確立するための基礎的基盤を構築することを最終目標として、以下の4つの研究を計画・実行した。

① 培養ヒト歯根膜細胞中に存在する SP 細胞の特徴の検討

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、細胞増殖能、種々の間葉系細胞への分化能、

強発現している遺伝子の解析、歯根膜マーカー分子の発現、を両細胞で比較検討した。

② 培養ヒト歯根膜細胞における Twis と各種 BMP antagonist の発現制御の検討

骨芽細胞様分化を誘導したヒト歯根膜細胞における Twist と BMP antagonist の発現動態と、BMP antagonist がこの細胞の骨芽細胞様分化に及ぼす作用を検討した。

③ 培養ヒト歯根膜細胞中に存在する ALP 陽性細胞と陰性の特徴の検討

培養ヒト歯根膜細胞からフローサイトメトリーで ALP 陽性の細胞集団と ALP 陰性の細胞集団を分取し、これら2つの細胞集団の特徴、特に細胞増殖能、骨芽細胞様分化能および Biglycan と Decorin の発現を比較検討した。

④ ヒト歯根膜からの間葉系幹細胞クローン採取の試み

ヒト歯根膜から回収した細胞からフローサイトメトリーで分取した CD271+/CD90+ の細胞を single cell culture し、MSC の特徴を有するクローンを獲得する。

3. 研究の方法

① 培養ヒト歯根膜細胞中に存在する SP 細胞の特徴の検討

培養ヒト歯根膜細胞を Hoechst 33342 で染色した後、FACS Vantage で SP 細胞分画と MP 細胞分画に存在する細胞を其々分取・培養し、MP 細胞と比較して SP 細胞で強発現している遺伝子を、ヒト歯根膜組織由来カスタマイズド DNA チップ (PerioGen Chip) を使用して網羅的に解析した。また、両細胞における各種歯根膜マーカー遺伝子の発現を RT-PCR 法で比較した。また両細胞の増殖能と骨芽細胞、脂肪細胞への分化能を、其々 cell count、免疫染色で比較検討した。

② 培養ヒト歯根膜細胞における Twis と各種 BMP antagonist の発現制御の検討

培養ヒト歯根膜細胞を骨分化誘導培地 (ODM) で培養あるいは BMP-2 (500 ng/ml) で刺激後、ALP 活性 (ALP 染色)、石灰化 (Alizarin red 染色)、骨マーカー (ALP, Osteopontin, Runx2, Osterix) と BMP-4 の遺伝子発現 (RT-PCR)、BMP antagonist (Gremlin, Follistatin, Chordin) と Twist の遺伝子・蛋白発現 (RT-PCR, western blotting, ELISA) を評価した。また、一部の細胞は、抗ヒト BMP-2/4 抗体 (50 μ g/ml)、精製マウス Gremlin (10 μ g/ml)、精製ヒト Follistatin (10 μ g/ml) を添加した ODM で培養後、ALP 活

性と石灰化を定量的に評価した。

③培養ヒト歯根膜細胞中に存在する ALP 陽性細胞と陰性の特徴の検討

抜去歯から、コラゲナーゼ処理でヒト歯根膜細胞 (HPDL cells) を回収し、継代培養後、コンフルエントに達した2代目の細胞を回収し細胞数を測定した。また、回収した細胞に APC 標識抗 ALP 抗体と PI を加えた後、FACS Vantage を使用して解析と細胞分取を行った。各サンプル中の PI 陰性の生細胞から、蛍光強度が著しく強い (APC 蛍光強度 100 以上) ALP 陽性の細胞分画 [ALP (+) HPDL cells] と蛍光強度が著しく弱い (APC 蛍光強度 2 以下) ALP 陰性の細胞分画 [ALP (-) HPDL cells] の細胞集団を分取した。ALP (+) HPDL cells と ALP (-) HPDL cells 其々を、間葉系幹細胞増殖培地 (MSCGM) で培養後、血球計算板を用いて細胞数の測定を行った。また、両細胞を MSCGM でコンフルエントに達するまで培養後、精製ヒト Biglycan (0.1, 1, 5 µg/ml) の存在あるいは非存在下において、ODM あるいは MSCGM で培養した。培養後、ALP 活性の測定および ALP 活性染色を行った。また、細胞を 2% alizarin red S (pH 4.2) で染色し、石灰結節の形成を確認した。さらに、Decorin と Biglycan の発現を RT-PCR 法およびウエスタンブロット法で確認した。

④ヒト歯根膜からの間葉系幹細胞クローン採取の試み

抜去歯の歯根をコラゲナーゼ処理して細胞を回収した後、FACS Calibur で種々の MSC マーカー分子 (CD90, CD146, CD105, CD166, CD73, CD49f, CD271) の発現を確認した。また、継代培養した PI- 細胞を種々の分化誘導培地で培養後、骨、脂肪、軟骨への分化能を、其々 ALP 染色/Alizarin red S 染色、Oil red O 染色、Toluidine blue 染色で検討した。また、コラゲナーゼ処理で回収した細胞から、FACS Vantage で PI-, PI-/CD271+/CD90+, PI-/CD271-/CD90+ 分画の細胞を分取した後、其々の細胞を single cell culture した。培養開始 2 週後にウェル面積の半分以上増殖したクローン (CFU-F;P0) の数を計測した。また、これらのクローンを継代培養し、P1 と P2 のクローンがコンフルエントに達した時点での細胞数を計測した。さらに、P3 まで増殖が維持されたクローン (P3, P4) において、骨、脂肪、軟骨への分化能を検討した (染色、RT-PCR 法)。

4. 研究成果

①培養ヒト歯根膜細胞中に存在する SP 細胞の特徴の検討

P3 の培養ヒト歯根膜細胞における SP 細胞分画の存在を確認すると、SP 細胞は平均 0.07% (n=5) 存在した。(Fig. 1)

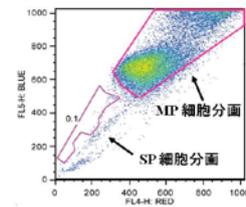


Fig. 1 培養ヒト歯根膜細胞で確認された SP 細胞分画と MP 細胞分画

分取した SP 細胞と MP 細胞における遺伝子発現を PerioGen Chip を使用して網羅的に解析すると、幹細胞マーカー分子である CD73 (SH3/SH4 antigen) の遺伝子発現は MP 細胞と比較して SP 細胞で強く、一方、pro- α 1 type III collagen, procollagen type I α 2 chain や歯根膜マーカー分子 (PLAP-1, periostin, decorin) の遺伝子発現は MP 細胞で強かった。(Fig. 2)

Fig. 2 遺伝子発現プロファイル解析

SP 細胞で発現が高い遺伝子

- 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

MP 細胞で発現が高い遺伝子

- Human mRNA for pro-alpha-1 type 3 collagen
- PLAP-1
- Periostin
- Human decorin (DCN) gene, exon 8, complete cds, NTFDase3 control
- COL3A1
- Human fibrillin-2 mRNA, complete cds.
- G5597 unknown
- Human thrombospondin 2 (THBS 2) mRNA, complete cds.
- Homo sapiens RNA for type VI collagen alpha 3 chain, G55655: ZWILCH Zwich, kinetochore associated, homolog (Drosophila) [Homo sapiens]
- Homo sapiens mRNA for propro-alpha 1 (I) collagen.
- Homo sapiens pigment epithelium, differentiation factor (PEDE) mRNA, complete cds.
- Homo sapiens mRNA for selenoprotein P.
- Human procollagen type I alpha 2 chain, partial exon 1.
- Homo sapiens mRNA, cDNA DKFZp564C093 (from clone DKFZp564C093).

さらに、両細胞における歯根膜マーカー遺伝子の発現を RT-PCR 法で確認すると、種々の歯根膜マーカー遺伝子 [biglycan, periostin, periodontal ligament associated protein-1 (plap-1)] の発現はいずれも SP 細胞と比較して MP 細胞で強かった。(Fig. 3)

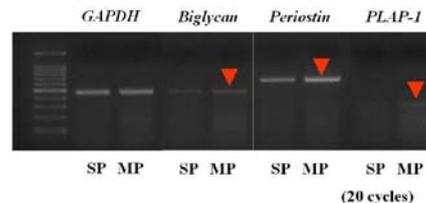


Fig. 3 SP 細胞と MP 細胞における歯根膜マーカー遺伝子の発現

SP 細胞と MP 細胞の細胞増殖能を比較すると、SP 細胞は MP 細胞よりも細胞増殖能が有意に高かった (n=5, p<0.05) (Fig. 4)。

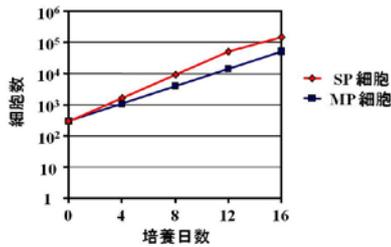


Fig. 4 SP細胞とMP細胞の増殖能

SP細胞とMP細胞における骨芽細胞、脂肪細胞への分化能を比較するために、両細胞を骨分化誘導培地あるいは脂肪分化誘導培地で2週間培養した。その結果、両細胞は共に、骨芽細胞、脂肪細胞に分化し、両細胞間で分化能に顕著な差は認められなかった。(Fig. 5)

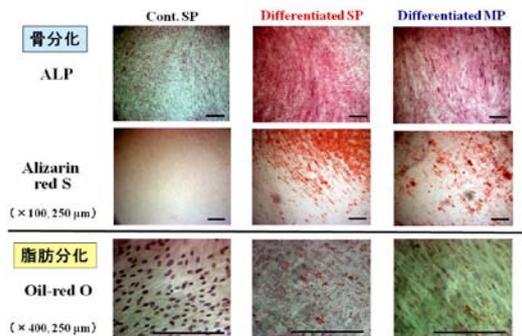


Fig. 5 SP細胞とMP細胞における骨芽細胞と脂肪細胞への分化能

以上の結果から、残念ながら、ヒト歯根膜細胞中の間葉系幹細胞がSP細胞分画特異的に存在している可能性は低いことが明らかになった。

②培養ヒト歯根膜細胞におけるTwistと各種BMP antagonistの発現制御の検討

1. 骨分化誘導

培養ヒト歯根膜細胞(HPDL cells)をODMで培養すると、コントロールと比較して培養開始3日目以降で明らかなALP活性の上昇が認められた。また、ODMで培養した場合のみにおいて、7日目以降で多数の石灰化結節の形成が認められた(Fig. 1)。

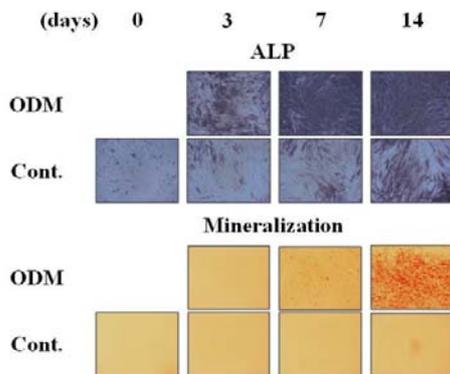


Fig. 1 HPDL cellsにおける骨分化誘導

また、HPDL cellsをODMで培養すると、コントロールと比較して種々の骨マーカーとBMP-4の遺伝子発現の増加が認められた。すなわち、ALPは3-7日目で、Osteopontinは7-14日目で、OsterixとBMP-4は14日目で、コントロールと比較して明らかに高い発現量を示した。一方、Runx2の遺伝子発現は両者の間で明確な差は認められなかった(Fig. 2)。これらの結果から、HPDL cellsをODMで培養すると骨芽細胞様分化が促進されることが確認された。

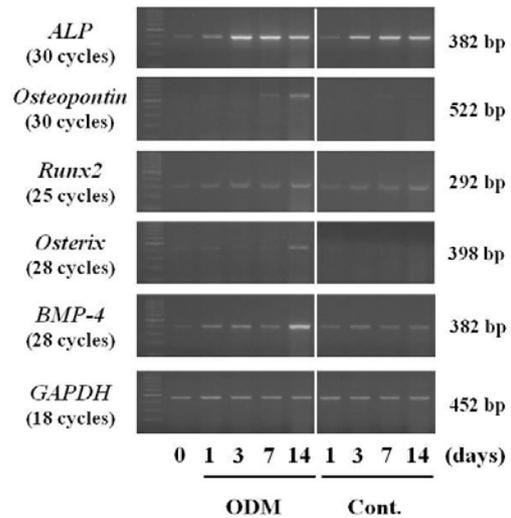


Fig. 2 ODMで培養したHPDL cellsにおける骨特異的遺伝子とBMP-4遺伝子の発現動態

2. 骨分化誘導に伴うTwistと種々のBMP antagonistの発現の変化

コントロールのHPDL cellsは恒常的にTwist, Gremlin, Follistatinの遺伝子を発現しており、これらの遺伝子の発現は培養期間を通して変化しなかった。一方、ODMで培養するとTwistの発現は培養開始1日目から僅かに上昇し14日目で顕著に増加したのに対し、BMP antagonistであるGremlinは3日目以降で、Follistatinは1日目以降で、明らかな発現の減少が認められた。また、コントロール細胞におけるChordinの遺伝子発現は培養開始1-7日目で増加し、その後減少したのに対し、ODMで培養した場合その発現は変化しなかった(Fig. 3)。

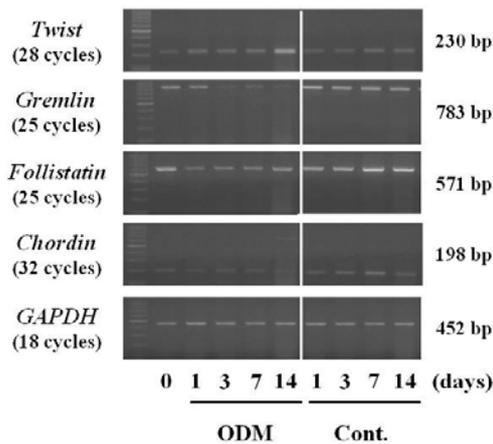


Fig. 3 ODM で培養したHPDL cellsにおける TwistとBMP antagonist 遺伝子の発現動態

この様な ODM で培養した HPDL cells で認められる Twist 発現の増加と、Gremlin 発現の減少は、ウエスタンブロット分析の結果から培養開始 14 日目において蛋白レベルでも確認された(Fig. 4A)。しかし、コントロール細胞、ODM で培養した細胞共に、Chordin の蛋白発現は認められなかった(data not shown)。一方、ELISA の結果から、培養開始後 3 日間毎に培養上清中に産生分泌される Follistatin の量は ODM で培養することにより有意に抑制された(Fig. 4B)。したがって、HPL cells を ODM で培養すると、Twist の発現は増加し、一方 BMP antagonist である Gremlin と Follistatin の発現は減少することが明らかになった。

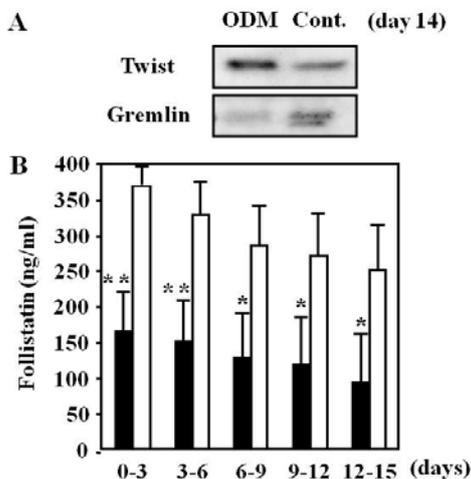


Fig. 4 ODM で培養したHPDL cellsにおける TwistとBMP antagonist タンパク質の発現動態

3. BMP-2 が骨芽細胞様分化に及ぼす作用
HPDL cells を BMP-2 で 72 時間刺激すると、コントロールと比較して ALP 活性の上昇が認められたが、石灰化結節の形成は観察されなかった(Fig. 5A)。また、この BMP-2 刺激はコントロールと比較して、ALP の遺伝子発現を 24 時間目以降で、Osteopontin 遺伝子を 48 時間目で、Osterix 遺伝子を 48 時間目以降で

明らかに促進した(Fig. 5B)。これらの結果から、BMP-2 は HPDL cells の初期の骨芽細胞様分化を促進することが確認された。

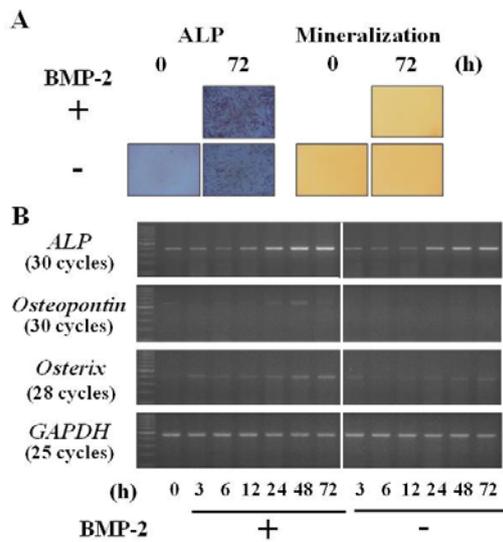


Fig. 5 BMP-2 はHPDL cells の骨芽細胞様分化を促進する

4. BMP-2 刺激に伴う Twist と種々の BMP antagonist の遺伝子発現の変化

コントロールの HPDL cells における Twist の遺伝子の発現は培養期間を通して変化しなかったが、その発現は BMP-2 刺激の開始 6-24 時間後で増加し、その後減少した。一方、Gremlin, Follistatin, Chordin の遺伝子発現は培養期間を通して、コントロール細胞と BMP-2 で刺激した細胞の間で明らかな差は認められなかった(Fig. 6)。これらの結果から、BMP-2 は Twist の遺伝子発現を促進するものの、Gremlin, Follistatin, Chordin の遺伝子発現を変化させないことが明らかになった。

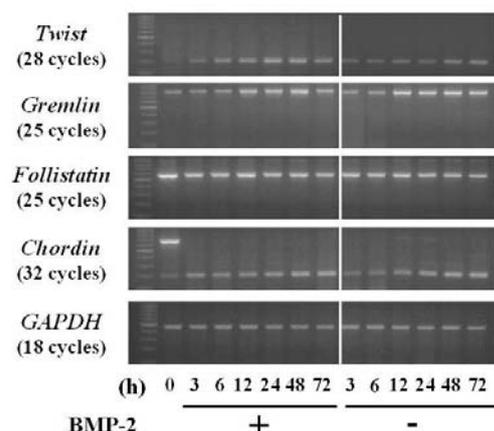


Fig. 6 BMP-2 がHPDL cells における TwistとBMP antagonist 遺伝子の発現に及ぼす作用

6. Gremlin, Follistatin, BMP-2/4 抗体が骨芽細胞様分化に及ぼす作用

HPL cells を ODM で培養すると、コントロールと比較して、ALP 活性は培養開始 7 日目以降で、細胞層中の Akizarin red 量は 14 日目まで有意増加した(Fig. 7A, 7B)。また、ODM で 14 日間培養した細胞で認められる ALP 活性の上昇と細胞層中の Akizarin red 量の増加は、精製マウス Gremlin (10 µg/ml)、精製ヒト Follistatin (10 µg/ml) あるいは抗ヒト BMP-2/4 抗体 (50 µg/ml) の同時刺激により有意に抑制された(Fig. 7A, 7B)。

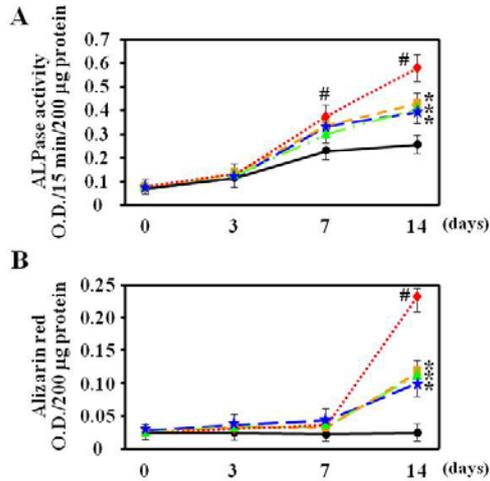


Fig. 6 BMP-2 で刺激したHPDL cells におけるALP活性と石灰化に及ぼす Gremlin, Follistatin, 抗BMP-2/4 抗体の作用
 ODM alone (red diamond)
 ODM+gremlin (blue star)
 ODM+follistatin (green triangle)
 ODM+anti-BMP-2/4 antibody (orange square)
 Control (black circle)

本研究では、骨分化誘導や BMP-2 刺激した HPDL cells における Twist と種々の BMP antagonist の発現動態と、これらの分子がこの細胞の骨芽細胞様分化に及ぼす作用を検討した。HPL cells を ODM で培養すると明確な骨芽細胞様分化の促進が認められたが、この骨芽細胞様分化の促進には内因性の BMP-2/4 が関与していた。HPDL cells は恒常的に Twist と BMP antagonist である Gremlin と Follistatin を発現していた。この内 Twist の発現は ODM で培養あるいは BMP-2 で刺激することにより増加した。一方、Gremlin と Follistatin の発現は ODM で培養すると減少したが、BMP-2 はこれを変化させなかった。また、これら 2 つの BMP antagonist の精製蛋白は共に、ODM で培養することにより誘導される HPDL cells の骨芽細胞様分化を抑制した。

したがって、歯根膜細胞は恒常的に Twist と BMP antagonist である Gremlin と Follistatin を発現して、自らの骨芽細胞様分化を抑制的に制御することにより、組織の恒常性を維持している可能性がある。また、創傷治癒過程

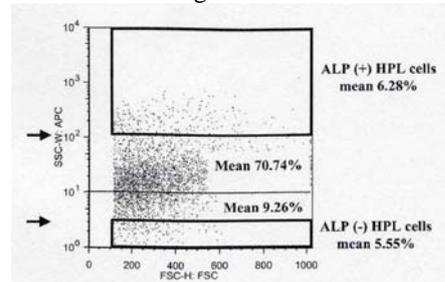
で局所に産生分泌される BMP-2/4 などの骨形成因子の刺激を受けた歯根膜細胞では骨芽細胞様分化が促進されるが、Twist と Gremlin/Follistatin の発現はそれぞれ促進的、抑制的に制御され、この骨芽細胞様分化の促進作用を調節していると考えられる。

③培養ヒト歯根膜細胞中に存在する ALP 陽性細胞と陰性の特徴の検討

1. ALP (+) HPDL cells と ALP (-) HPDL cells の分取

5 つの HPDL cells (P2) 其々を MEM α でコンフルエントに達するまで培養した後、さらに 3 日間培養した。その後、其々 4×10^6 個の細胞を APC 標識抗ヒト ALP 抗体で染色し、FACS 解析を行った。その結果、解析を行った細胞中の ALP 陽性細胞率は平均 70.74%、ALP 陰性細胞率は平均 29.26%であった (Fig. 1)。さらに、各 HPDL cells から、蛍光強度が著しく強い (APC 蛍光強度 100 以上) ALP 陽性の細胞分画 [ALP (+) HPDL cells] と蛍光強度が著しく弱い (APC 蛍光強度 2 以下) ALP 陰性の細胞分画 [ALP (-) HPDL cells] を分取したところ、ALP (+) HPDL cells の割合は平均 6.28%、ALP (-) HPDL cells の割合は平均 5.55%であった (Fig. 1)。

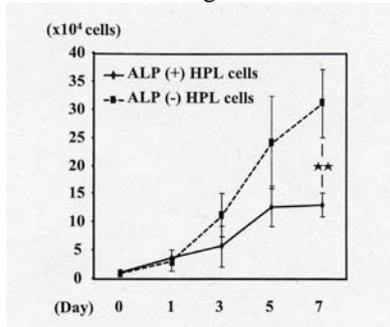
Fig. 1



2. 細胞増殖能

3 つの HPDL cells から分取した両細胞集団を MSCGM で 1, 3, 5, 7 日間培養後、細胞数をカウントした。ALP (+) HPDL cells は培養開始 5 日後まで、ALP (-) HPDL cells は培養開始 7 日後まで、時間依存的に細胞数の増加が認められたが、3 日後以降では、ALP (+) HPDL cells と比較して ALP (-) HPDL cells で細胞数が多く、7 日後では有意な差が認められた (Fig. 2)。

Fig. 2



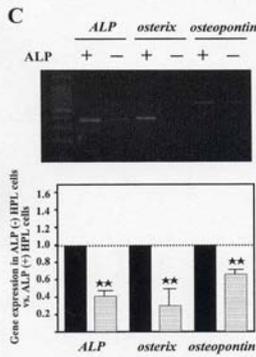
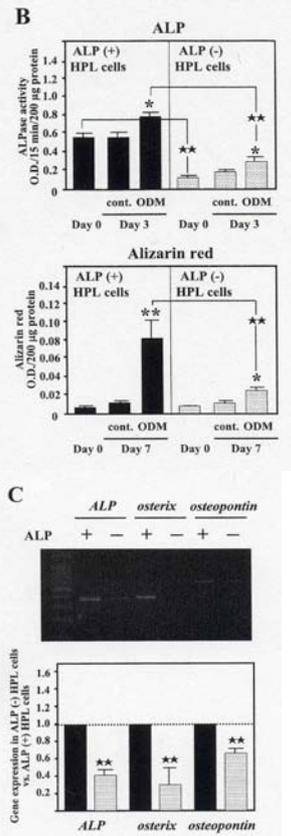
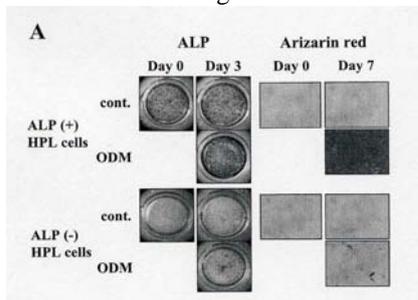
3. 骨芽細胞様分化能

3つのHPDL cellsから分取した両細胞集団をMSCGMでコンフルエントに達するまで培養すると (Day 0)、ALP (+) HPDL cellsはALP (-) HPDL cellsと比較して有意に高いALP活性を示していた (Fig. 3A, 3B)。これら2つの細胞集団におけるALP活性値は、分取後2代継代した細胞 (4代目)でも変化しなかった (data not shown)。また、両細胞集団をさらにODMで3日間培養すると、コントロール培地で培養した場合と比較してALP活性の有意な増加が認められたが、その活性値はALP (+) HPDL cellsと比較してALP (-) HPDL cellsで有意に低かった (Fig. 3A, 3B)。

ODMで培養開始7日後において、ALP (+) HPDL cellsでは、コントロール培地で培養した場合と比較して著しい石灰化結節の形成と有意な細胞層中のalizarin red量の増加が認められた。一方、ODMで培養したALP (-) HPDL cellsにおける石灰化結節の形成とalizarin red量の増加は極めて微弱であり、そのalizarin red量はALP (+) HPDL cellsと比較して有意に少なかった (Fig. 3A, 3B)。

また、両細胞集団をODMで7日間培養すると、ALP (+) HPDL cellsと比較してALP (-) HPDL cellsで種々の骨マーカー遺伝子 (ALP, osterix, osteopontin) の発現が有意に弱いことが確認された (Fig. 3C)。

Fig. 3

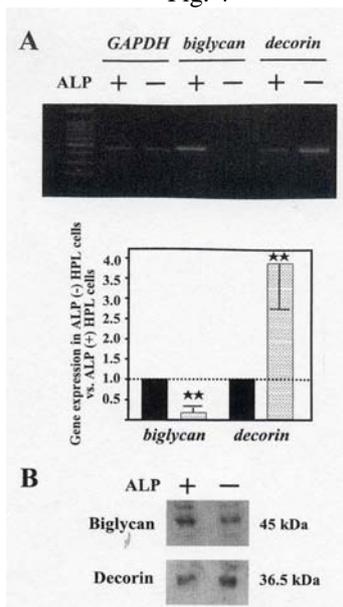


4. Decorin と Biglycan の発現

3つのHPDL cellsから分取した両細胞集団をMSCGMでコンフルエントに達するまで培養後、DecorinとBiglycanの発現を遺伝子レベルで確認したところ、Decorinの遺伝子発現はALP (-) HPDL cellsで、一方、Biglycanの遺伝子発現はALP (+) HPDL cellsで有意に強いことが明らかになった (Fig. 4A)。

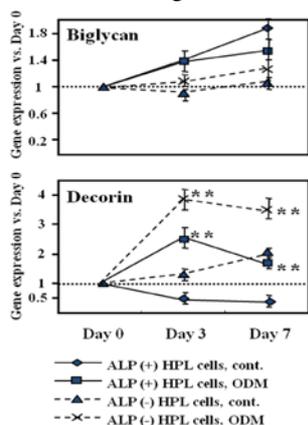
また、HPDL-3 cellsから分取したALP (+) HPDL cellsとALP (-) HPDL cellsのみならず (Fig. 4B)、HPDL-4, -5 cellsから分取した両細胞集団において (data not shown)、同様の結果がタンパク質レベルで確認された。

Fig. 4



5. 骨芽細胞様分化の誘導に伴う Decorin と Biglycan の遺伝子発現の変化
 3つの HPDL cells から分取した両細胞集団を MSCGM でコンフルエントに達するまで培養後、さらに ODM あるいはコントロール培地で 3, 7 日間培養した後、Decorin と Biglycan の遺伝子発現を確認した。ODM で培養すると、ALP (+) HPDL cells と ALP (-) HPDL cells 共に、Decorin の遺伝子発現はコントロール培地で培養した場合と比較して、培養開始 3, 7 日後で有意に増加したが、Biglycan の遺伝子発現は、培養期間を通して有意な変化は認められなかった (Fig. 5)。

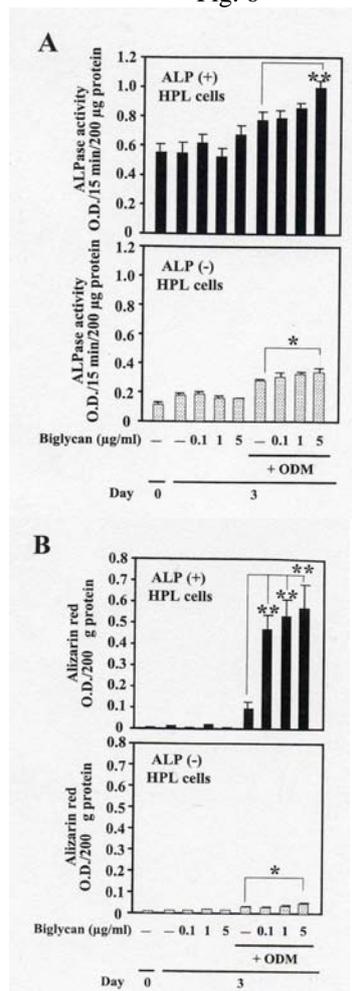
Fig. 5



6. Biglycan が骨芽細胞様分化に及ぼす作用
 3つの HPDL cells から分取した両細胞集団を MSCGM でコンフルエントに達するまで培養後、更に精製ヒト Biglycan の存在あるいは非存在下において、ODM あるいはコントロール培地で 3, 7 日間培養した。その結果、両細胞

集団共、ODM で 3 日間培養した細胞で認められる ALP 活性の上昇と 7 日間培養した細胞で認められる細胞層中の Alizarin red 量の増加は、精製ヒト Biglycan の同時刺激により [Biglycan 濃度 : ALP (+) cells では ALP 活性は 5 $\mu\text{g/ml}$ で、Alizarin red 量は 0.1-5 $\mu\text{g/ml}$ で、ALP (-) cells では ALP 活性、Alizarin red 量共に 5 $\mu\text{g/ml}$ で] 有意に促進された (Fig. 6A, 6B)。また、この Biglycan の促進作用は ALP (+) cells で顕著であった (Fig. 6A, 6B)。

Fig. 6



以上の結果から、ALP (+) HPDL cells は骨芽細胞様の細胞集団であり、一方、ALP (-) HPDL cells は細胞増殖能が高く、骨芽細胞様の分化能が乏しい線維芽細胞様の細胞集団であることが明らかになった。

Biglycan は ALP (+) HPDL cells で、Decorin は ALP (-) HPDL cells でより強く発現していた。また、精製ヒト Biglycan は、特に ALP (+) HPDL cells において、ODM が誘導する骨芽細胞様分化を有意に亢進した。さらに、両細胞集団を ODM で培養すると、Decorin の発現は促進されたが、Biglycan の発現は変化しな

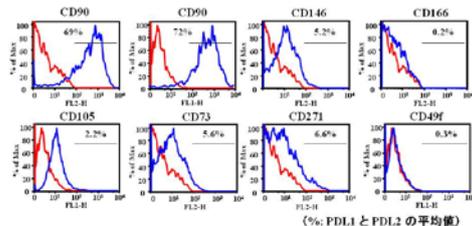
かった。したがって、Biglycan は特に ALP (+) HPDL cells における骨芽細胞様分化を促進的に制御しており、一方 Decorin は特に ALP (-) HPDL cells における石灰化を恒常的に抑制している可能性がある。

本研究の結果は、歯根膜組織の再生や恒常性の維持に果たす ALP 陽性と陰性の歯根膜細胞の役割の違いを、これら 2 つの SLRP の発現パターンと機能から明確にしたと考える。

④ヒト歯根膜からの間葉系幹細胞クローン採取の試み

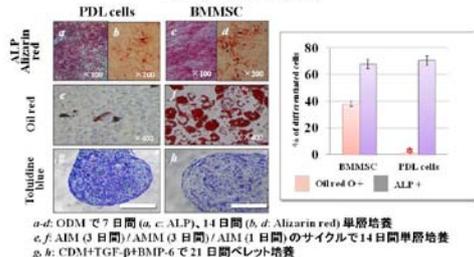
抜去歯の歯根からコラゲナーゼ処理で回収した PI- 細胞における種々の MSC マーカー分子 (CD90, CD146, CD105, CD166, CD73, CD49f, CD271) の発現を FACS Calibur で確認したところ、CD90 以外の MSC マーカーの陽性細胞率はいずれも低かった (Fig. 1)。

Fig. 1 PDL cells における各種 MSC マーカー分子の発現 (PDL1, PDL2; P0)



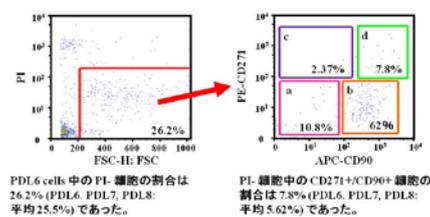
ヒト歯根膜からコラゲナーゼ処理で回収した PI- 細胞における、骨芽細胞と脂肪細胞への分化能を骨髄間葉系幹細胞 (BMMSC) と比較検討したところ、ヒト歯根膜 PI- 細胞は効率良く骨芽細胞と軟骨細胞に分化したが、脂肪細胞への分化能を有する細胞は BMMSC と比較して著しく少なかった (全細胞中の 0.26%) (Fig. 2)。

Fig. 2 ヘテロな PDL cells の各種間葉系細胞への分化能 (PDL3, PDL4, PDL5; P2)



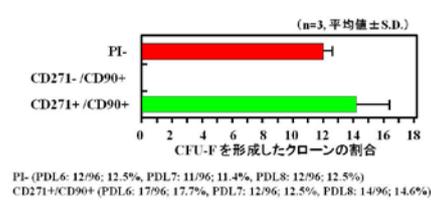
ヒト歯根膜 PI- 細胞中における CD271+/CD90+ 細胞の存在を FACS Vantage で検討すると、3 つの PI- 細胞中には、CD271+/CD90+ 細胞が平均 5.62% 存在していた (Fig. 3)。

Fig. 3 CD271 と CD90 の FACS 解析 (PDL6; P0)



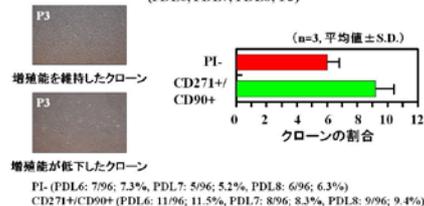
FACS で分取した PI- 分画、CD271+/CD90+ 分画、CD271-/CD90+ 分画の細胞を其々 96 well プレートで single cell culture すると、CD271+/CD90+ 細胞のみ高い CFU-F 活性を示した (CFU-F を形成したクローン数: 平均 14.3 個) (Fig. 4)。

Fig. 4 Single cell culture した細胞の CFU-F 活性 (PDL6, PDL7, PDL8; P0)



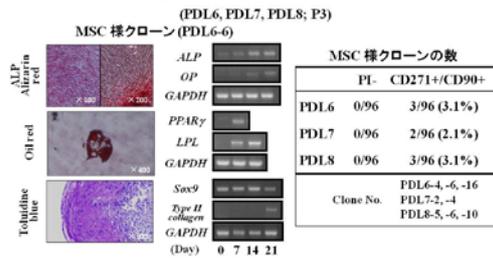
CD271+/CD90+ クローンの内、平均 9.3 個のクローンは P3 まで増殖能を維持していた (Fig. 5)。

Fig. 5 P3 まで増殖が維持された CFU-F (クローン) の割合 (PDL6, PDL7, PDL8; P3)



P3 まで増殖能を維持した PI- クローンと CD271+/CD90+ クローンにおいて、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を検討すると、PI- クローンでは MSC 様のクローンは認められなかったが、CD271+/CD90+ クローンでは、平均 2.7 個のクローンが MSC 様であった (Fig. 6)。

Fig. 6 P3 まで増殖が維持されたクローンの
各種間葉系細胞への分化能



また、CD271+/CD90+ MSC 様クローン (PDLMSC) は、P0-P3 までほぼ一定の増殖率を示した (Fig. 7)。

ヘテロな PDL cells は、効率良く骨芽細胞と軟骨細胞に分化したが、脂肪細胞への分化能が著しく低いことから、MSC はごく僅かしか存在しないと考えられる。実際、この細胞集団中における MSC マーカー (CD146, CD166, CD105, CD73, CD271, CD49f) の陽性細胞率は低く、また、PDL cells (分画前の PI- 細胞) を single cell culture して獲得した CFU-F 形成クローンのいずれもが MSC 様の特徴を有していなかった。

PDL から回収した生細胞 (PI- 細胞) 中には平均 5.62% (FACS 解析した全細胞中の平均 1.43%) の CD271+/CD90+ 細胞が存在していたが、single cell culture すると、この分画の細胞のみ CFU-F を形成した。また、これらの CFU-F を形成するクローンの内、平均 2.7 個のクローンが MSC 様であった。さらに、この MSC 様クローン (PDLMSC) は、継代培養後も高い増殖能を維持していた。したがって、ヒト骨髄と同様に、MSC はヒト歯根膜から採取した細胞の CD271+/CD90+ 分画中に濃縮されている可能性が高い。

また、CD271 は neural crest 前駆細胞のマーカーであることから、ヒトの歯根膜や骨髄中に存在する MSC の一部は neural crest 由来であると考えられる。

本研究では、ヒト歯根膜から採取した細胞から FACS で分取した CD271+/CD90+ 細胞を single cell culture し、MSC 様のクローン (PDLMSC) を獲得することに成功した。

したがって、CD271 と CD90 は歯根膜から MSC を純化するためのマーカーになり得ると考える。

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 3 件)

1. ヒト歯根膜細胞中に存在するアルカリフォスファターゼ陽性細胞と陰性細胞の特徴. 鶴見亜有子, 小林 誠, 村山怜一郎ら (2 番目), *Dental Med Res* (査読あり),

29(1):28-39, 2009.

2. 培養ヒト歯根膜細胞における Twist と各種 BMP antagonist の発現制御. 森高俊一郎, 小林 誠, 三井 将ら (2 番目), *Dental Med Res* (査読あり), 28(2):67-76, 2008.
3. 培養ヒト歯根膜細胞における各種腱・靭帯マーカー遺伝子の発現制御. 三井 将, 小林 誠, 森高俊一郎ら (2 番目), *Dental Med Res* (査読あり), 28(3):137-149, 2008.

[学会発表] (計 3 件)

1. 鶴見亜有子, 小林 誠, 奥津朋彦ら: ヒト歯根膜細胞中のアルカリフォスファターゼ陰性細胞の特徴. 第 129 回日本歯科保存学会秋期学術大会, 2008 年 11 月, 富山.
2. 小出容子, 小林 誠ら: 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.
3. Koide Y, Kobayashi M et al.: Characteristics of side cell population cells existing in periodontal ligament cells. The 86th General Session & Exhibition of the IADR, 2008 Jun., Toronto, Canada.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
小林 誠 (Kobayashi Makoto)

研究者番号：80186767

(2)研究分担者

臼井通彦 (Usui Michihiko)

研究者番号：10453630

高田貴虎 (Takada Takatora)

研究者番号：20384323

(3)連携研究者

()

研究者番号：