

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592373

研究課題名（和文） 骨髄に存在する神経堤幹細胞のスフェロイド培養による歯の再生技術の確立

研究課題名（英文） Establishment of tooth regeneration using spheroid culture of neural crest-derived cells in bone marrow

研究代表者

須澤 徹夫（SUZAWA TETSUO）

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：60271285

研究成果の概要（和文）：

神経堤細胞は成体各所に潜伏し、一部多分化能を有することから、再生医療への応用が期待されている。本研究では成体から採取可能な細胞ソースを用いた歯胚再生を目標とし、神経堤に由来する細胞を標識できる、*P0-Cre/CAG-CAT-EGFP* 成体マウスを用いて、口腔顎顔面部における神経堤由来細胞の分布と、神経堤由来細胞の細胞増殖ならびに分化能について検討した。成体内の分布について検索したところ、毛包、口腔粘膜、鼻甲介に高密度で局在していた。毛包あるいは口腔粘膜から純化した神経堤由来細胞を、低付着プレート上で培養すると、spheroidを形成し細胞増殖は促進された。培養条件によって毛包あるいは口腔粘膜の神経堤由来細胞は、骨芽細胞様細胞や、象牙芽細胞様細胞へと分化することが明らかになった。本研究結果から、毛包や口腔粘膜など成体から低侵襲で採取できる神経堤由来細胞を細胞ソースとした、象牙質や骨を含む硬組織再生の可能性が示唆された。さらに、神経堤由来細胞が歯胚再生における、歯原性間葉系細胞の供給源になりうることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Neural crest (NC) cells migrate ventro-laterally and populate the branchial arches during vertebrate development. Some NC cells are maintained in an undifferentiated state as NC-derived cells (NCDCs) throughout the life of the animal. We utilized *P0-Cre/floxed-EGFP* mice (*P0* mice), in which NCDCs remain labeled with green fluorescent protein (GFP) even after birth. We observed the distribution of NCDCs in adult *P0* mice and isolated them from other cells to form high concentrations of these cells. GFP-positive NCDC cells were found in tissues of the whisker pad, oral mucosa, and nasal conchae of the adult *P0* mice. When isolated from other cells in these tissues, they were shown to form spheres under low-adherent conditions. Our findings demonstrate that GFP-positive NCDCs have the potential to differentiate into odontoblast-like cells or osteoblast-like cells. NCDCs from the whisker pad or oral mucosa, which are easily accessible in the oral and maxillofacial regions, can be cultured and may be a useful cell source for regeneration of these regions.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011 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：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：神経堤細胞、毛包、口腔粘膜、鼻甲介、象牙芽細胞、骨芽細胞、歯胚再生

1. 研究開始当初の背景

神経堤細胞は胎生初期に神経管癒合部から発生して広く胚内を遊走後、定着先の環境で多様に分化する。神経堤由来細胞は成体各所に潜伏し、一部多分化能を有することから、再生医療への応用が期待されている。本研究では、成体マウス骨髄に存在する神経堤由来細胞から、口腔顎顔面部について解析範囲を広げ検討した。

2. 研究の目的

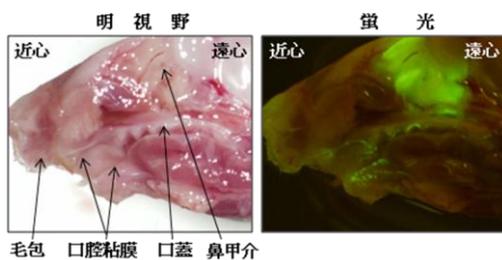
- (1) 成体から採取可能で外科的侵襲の少ない細胞ソースを利用した歯胚を含む硬組織再生を目標として、神経堤由来細胞の成体内における分布を明らかにする。
- (2) 高密度に神経堤由来細胞が存在する組織より細胞を純化して、細胞増殖能や多分化能について解析する。
- (3) 神経堤由来細胞から歯原性間葉系細胞である象牙芽細胞や骨芽細胞など硬組織形成細胞への分化誘導について解析する。さらに、神経堤由来細胞を用いた歯胚再生の可能性を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 神経堤に由来する細胞を green fluorescent protein (GFP) で標識できる、P0-Cre/CAG-CAT-EGFP 成体マウスの口腔顎顔面部における GFP 陽性細胞の分布を解析した。
- (2) 毛包あるいは口腔粘膜からセルソーターを用いて GFP を指標に神経堤由来細胞を純化し、種々の培地を用いて細胞増殖ならびに分化について検討した。

4. 研究成果

- (1) 陽性細胞は口腔顎顔面部で広範囲に認められ、特に毛包、口腔粘膜、鼻甲介、顎下腺に高密度で局在していた (図)。



図：口腔顎顔面領域における神経堤由来細胞の分布

(2) 毛包あるいは口腔粘膜に存在する GFP 陽性細胞をセルソーターにより純化後、細胞における遺伝子発現について解析すると、神経堤細胞関連遺伝子 p75、Snail、Twist、Musashi 1 の発現が認められた。

(3) FGF2 と EGF 添加の無血清培地で培養した細胞は、特に 7 日後以降細胞の増殖が促進した。低付着プレート上で培養すると、継代可能な spheroid を形成した。

(4) アスコルビン酸、 β -グリセロリン酸等を添加した骨芽細胞分化培地で培養すると、強い ALP 活性染色と石灰化能の指標である Alizarin red 染色陽性を示した。GFP 陽性細胞はインスリン、トランスフェリン等を添加した脂肪細胞分化培地によって Oil-red O 染色陽性の脂肪滴を細胞質内に含む脂肪様細胞へと分化した。

(5) 高濃度血清の象牙芽細胞分化培地は、象牙芽細胞マーカー Dentin sialosphoprotein の発現を上昇させた。また、Dentin matrix protein-1 の発現上昇や、ALP 活性染色と Alizarin red 染色陽性を示した。さらに BMP-2 添加すると石灰化能は亢進した。

本研究結果から、毛包や口腔粘膜など成体から低侵襲で採取できる神経堤由来細胞を細胞ソースとした、象牙質や骨を含む硬組織再生の可能性が示唆された。

神経堤由来細胞が歯胚再生における、歯原性間葉系細胞の供給源になりうることが示された。

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)

[雑誌論文] (計 17 件)

(1) Ono M, Suzawa T (14 名 2 番目) et al. : Identification and isolation of neural crest derived cells in nasal concha. Jpn. J. Tissue Cult. Dent. Res., 20: 29-35, 2011 (査読有)

(2) Yoshimura K, Miyamoto Y (12 名 2 番目), Suzawa T (12 名 8 番目) et al. : Monocarboxylate transporter-1 is required for cell death in mouse

- chondrocytic ATDC5 cells exposed to interleukin-1 β via late phase activation of nuclear factor κ B and expression of phagocyte-type NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 286: 14744-14752, 2011 (査読有)
- (3) Tsukasaki M, Yamada A (12名2番目), Suzawa T (12名7番目) et al.: Expression of POEM, a positive regulator of osteoblast differentiation, is suppressed by TNF- α . *Biochem Biophys Res Commun*, 410: 766-770, 2011 (査読有)
- (4) Tachi K, Takami M (14名2番目) et al.: Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced ectopic bone formation by transforming growth factor β 1. *Tissue Eng Part A*, 17: 597-606, 2011 (査読有)
- (5) Michio Yamamoto, Takami M (14名7番目) et al.: Shared and Distinct Functions of the Transcription Factors IRF4 and IRF8 in Myeloid Cell Development. *PLoS One*, 6, e25812, 2011 (査読有)
- (6) Wang X, Suzawa T (11名2番目) et al.: Carbonic anhydrase II regulates differentiation of ameloblasts via intracellular pH-dependent JNK signaling pathway. *J Cell Physiol*, 225: 709-719, 2010 (査読有)
- (7) Miyauchi T, Suzawa T (8名5番目) et al.: The enhanced characteristics of osteoblast adhesion to photofunctionalized nanoscale TiO₂ layers on biomaterials surfaces. *Biomaterials*, 31:3827-3839, 2010 (査読有)
- (8) Tachi K, Takami M (9名2番目) et al.: Bone morphogenetic protein 2 enhances mouse osteoclast differentiation via increased levels of receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts. *Cell Tissue Res*, 342: 213-220, 2010 (査読有)
- (10) Takami M (12名1番目) et al.: Osteoclast differentiation induced by synthetic octacalcium phosphate through receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts. *Tissue Eng Part A*, 15: 3991-4000, 2009 (査読有)
- (11) Dai Suzuki, Yamada A (15名2番目) et al.: Essential mesenchymal role of small GTPase Rac1 in interdigital programmed cell death during limb development. *Dev Biol*, 335: 394-406, 2009 (査読有)
- (12) Okano A, Miyamoto Y (5名2番目) et al.: Change in salivary levels of chromogranin A in children by hearing dental air turbine noise. *Pediatr Dent J*, 19: 220-227, 2009 (査読有)
- (13) Zhao B, Takami M (12名2番目) et al.: Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nat Med*, 15: 1066-1071, 2009 (査読有)
- (14) Yasuhara R, Miyamoto Y (7名2番目) et al.: Lysine-specific gingipain promotes lipopolysaccharide- and active-vitamin D₃-induced osteoclast differentiation by degrading osteoprotegerin. *Biochem J*, 419:159-166, 2009 (査読有)
- (15) Odaira M, Miyamoto Y (20名3番目) et al.: Cold preservation of the liver with oxygenation by a two-layer method. *J Surg Res*, 152:209-217, 2009 (査読有)
- (16) Yamada A (12名1番目) et al.: IFN- γ down-regulates Secretoglobin 3A1 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 379: 964-968, 2009 (査読有)
- (17) Tomita T, Yamada A (9名2番目) et al.: Oncostatin M regulates Secretoglobin 3A1 and 3A2 expression in a bidirectional manner. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40: 620-630, 2009 (査読有)
- [学会発表] (計 39 件)
- (1) 宮内知彦、須澤徹夫 他. 毛包から純化した神経堤細胞による象牙芽細胞への分化誘導. 日本歯科補綴学会 第120回記念学術大会 (広島、2011. 5. 20)
- (2) 小野美樹、高見正道、須澤徹夫 他. 神経堤由来細胞を用いた顎顔面再建方法確立のための基礎的研究. 第70回東京矯正歯科学会記念大会 (東京、2011. 7. 20)
- (3) 小野美樹、高見正道、須澤徹夫、山田 篤、

- 宮内知彦、馬場一美、中村雅典、榎宏太郎、上條竜太郎. 成体における神経堤由来細胞の分布とそれを用いた骨芽細胞の分化誘導. 第29回日本骨代謝学会学術集会 (大阪, 2011. 7. 30)
- (4) 宮本阿礼、高見正道 他. 二本鎖 RNA アナログはインターフェロン β /STAT1 経路を介して破骨細胞分化を抑制し骨粗鬆症モデル動物の骨量を増加させる. 第29回日本骨代謝学会学術集会 (大阪, 2011. 7. 28)
- (5) 秋山智人、宮本洋一 他. リシン特異的ジンジパインによる炎症性骨破壊促進機構の解明. 第29回日本骨代謝学会学術集会 (大阪, 2011. 7. 29)
- (6) 塚崎雅之、山田 篤 他. TNF- α は骨芽細胞においてPOEMの発現を抑制し、骨芽細胞分化を抑制する. 第29回日本骨代謝学会学術集会 (大阪, 2011. 7. 29)
- (7) 吉村健太郎、宮本洋一 他. Monocarboxylate transporter-1は骨芽細胞分化を正に制御する. 第29回日本骨代謝学会学術集会 (大阪, 2011. 7. 30)
- (8) 須澤徹夫、宮内知彦、小野美樹、高見正道、榎宏太郎、馬場一美、大隅典子、上條竜太郎. 口腔・顎顔面部に存在する神経堤由来細胞を用いた硬組織再生法の確立. 第11回東京骨関節フォーラム (東京, 2011. 8. 6)
- (9) 宮内知彦、須澤徹夫 他. 象牙質再生に向けた毛包神経堤細胞による象牙芽細胞分化誘導. 第41回日本口腔インプラント学会学術大会 (名古屋, 2011. 9. 16)
- (10) Ono M, Takami M, Suzawa T et al. Distribution of neural crest-derived cells in adult mice and their induction into osteoblastic cells. The ASBMR 2011 Annual Meeting (San Diego, CA, USA, 2011. 9. 1)
- (11) 小野美樹、高見正道、須澤徹夫 他. 口腔および食道上皮を構成するケラチノサイトの一部は神経堤に由来する. 第53回歯科基礎医学会学術大会 (岐阜, 2011. 10. 1)
- (12) 宮本阿礼、高見正道 他. Toll-like receptor 3 リガンド Poly(I:C)はInterferon- β /STAT1 経路を介して破骨細胞分化を抑制し骨粗鬆症モデルマウスの骨量増加をもたらす. 第53回歯科基礎医学会学術大会 (岐阜, 2011. 10. 1)
- (13) 相澤 怜、山田 篤 他. Cdc42は四肢形成における軟骨形成と肢芽指間域のアポトーシスを制御する. 第53回歯科基礎医学会学術大会 (岐阜, 2011. 10. 1)
- (14) 須澤徹夫. Carbonic Anhydrase IIによるエナメル芽細胞内pH制御. 日本臨床分子形態学会総会・学術集会 (静岡, 2010. 9. 24)
- (15) 吉村健太郎、宮本洋一 他. Monocarboxylate transporter-1は、IL- β 刺激後の軟骨細胞で後期NF- κ B活性化を起こし、NOX-2発現とそれに依存した細胞死を誘導する. 日本骨代謝学会学術集会 (東京, 2010. 7. 22)
- (16) 宮内知彦、須澤徹夫 他. 毛包神経堤細胞の分離とその細胞からの象牙芽細胞への分化誘導. 日本骨代謝学会学術集会 (東京, 2010. 7. 23)
- (17) 松本貴志、山田 篤 他. ホメオボックス遺伝子Alx3はBMP-2による骨芽細胞分化を制御する. 日本骨代謝学会学術集会 (東京, 2010. 7. 21)
- (18) 宮園あがさ、須澤徹夫 他. エナメル芽細胞分化に伴うCaspase-14の発現をTGF- β が促進する. 歯科基礎医学会学術大会 (東京, 2010. 9. 22)
- (19) 吉村健太郎、宮本洋一 他. Monocarboxylate transporter-1は、IL- β 刺激後の軟骨細胞で後期NF- κ B活性化を起こし、NOX-2発現とそれに依存した細胞死を誘導する. 歯科基礎医学会学術大会 (東京, 2010. 9. 22)
- (20) 小野美樹、須澤徹夫、高見正道 他. 顎顔面口腔組織における神経堤由来細胞の分布とその性質. 日本矯正歯科学会大会 (横浜, 2010/9/29)
- (21) Matsumoto T, Yamada A et al. Alx3, a paired-type homeodomain containing transcription factor, regulates osteoblast differentiation induced by BMP-2. The ASBMR 2011 Annual Meeting (Toronto, ON, Canada, 2010. 10. 17)
- (22) Maruyama T, Miyamoto Y et al. Carbonic anhydrase 9 suppresses hypertrophic differentiation of

chondrocytes. The ASBMR 2011 Annual Meeting (Toronto, ON, Canada, 2010. 10. 17)

(23) 小野美樹、高見正道、須澤徹夫 他. 顎顔面口腔組織における神経堤由来細胞の分布解析とそれを用いた骨芽細胞様細胞の分化誘導. 日本口腔組織培養学会学術大会 (高知、2010. 11. 13)

(24) 宮内知彦、須澤徹夫 他. 毛包から純化した神経堤細胞による象牙芽細胞への分化誘導. 日本口腔組織培養学会学術大会 (高知、2010. 11. 13)

(25) 小野美樹、高見正道、須澤徹夫 他. 顎顔面口腔組織に存在する神経堤由来細胞の分布および性質の解析とその細胞を用いた骨芽細胞の分化誘導. 昭和歯学会例会 (東京、2010. 12. 4)

(26) 小野美樹、高見正道、須澤徹夫 他. 顎顔面口腔組織における神経堤由来細胞の分布とその性質. 日本分子生物学会年会 (神戸、2010. 12. 8)

(27) 宮内知彦、須澤徹夫 他. 毛包から純化した神経堤細胞による象牙芽細胞への分化誘導. 日本分子生物学会年会 (神戸、2010. 12. 8)

(28) 宮内知彦、須澤徹夫 他. Induction of differentiation of odontoblast-like cells from neural crest-derived cells isolated from mouse whisker pads. 口腔先端応用医科学研究会学術会議 (東京、2011. 1. 22)

(29) 丸山敏史、宮本洋一 他. 軟骨細胞分化における炭酸脱水酵素 IX 型の役割. 日本骨代謝学会学術集会 (大阪、2009. 7. 23)

(30) 鈴木 大、山田 篤 他. Gremlin は BMP-2 による骨芽細胞分化を制御する. 日本骨代謝学会学術集会 (大阪、2009. 7. 25)

(31) 松本貴志、山田 篤 他. Gas6 は BMP-2 による骨芽細胞分化過程で発現が誘導される. 日本骨代謝学会学術集会 (大阪、2009. 7. 25)

(32) 宮内知彦、山田将博、山本玲子、須澤徹夫、上條竜太郎、小川隆広、馬場一美. UV 照射した TiO₂-coated Glass 上における単一骨芽細胞の初期接着力定量的評価. 日本骨代謝学会学術集会 (大阪、2009. 7. 25)

(33) 佐藤 華、高見正道 他. iPS 細胞からの破骨細胞分化誘導. 日本骨代謝学会学術集会 (大阪、2009. 7. 25)

(34) 舘 慶太、高見正道 他. TGF- β は BMP-2 による異所性骨化を強力に促進する. 日本骨代謝学会学術集会 (大阪、2009. 7. 25)

(35) 宮園あがさ、須澤徹夫 他. エナメル芽細胞における Caspase-14 の役割. 歯科基礎医学会学術大会 (新潟、2009. 9. 11)

(36) Suzuki D, Yamada A et al. Essential Roles of Rac1 during Limb Development. The ASBMR 2010 Annual Meeting (Denver, Colorado, USA, 2009. 9. 15)

(37) Yoshimura K, Miyamoto Y et al. Monocarboxylate transporter-1 is involved in the activation of NF- κ B and expression of phagocyte-type NADPH-oxidase in mouse chondrocytes exposed to interleukin-1 β . The ASBMR 2010 Annual Meeting (Denver, Colorado, USA, 2009. 9. 15)

(38) 舘 慶太、高見正道 他. TGF- β は BMP-2 による骨形成を促進する. 日本口腔組織培養学会学術大会 (東京、2009. 12. 5)

(39) 佐藤 華、高見正道 他. iPS 細胞を用いた破骨細胞分化誘導方法の確立. 日本口腔組織培養学会学術大会 (東京、2009. 12. 5)

[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

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須澤 徹夫 (SUZAWA TETSUO)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：60271285

(2) 研究分担者

宮本 洋一 (MIYAMOTO YOICHI)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：20295132

高見 正道 (TAKAMI MASAMICHI)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：80307058

山田 篤 (MAYADA ATSUSHI)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：50407558

中村 雅典 (NAMAKURA MASANORI)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：50180394

(3) 連携研究者

大隅 典子 (OSUMI NORIKO)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00220343