

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 22日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592584

研究課題名（和文）培養条件下における未分化維持機構の検索

研究課題名（英文）The research for the niche factor of stem cells in culture condition

研究代表者 菊入 崇 (KIKUIRI TAKASHI)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：10322819

研究成果の概要（和文）：本研究は、細胞培養条件下における幹細胞の未分化維持因子について検討するために、長期継代培養細胞群に対して、Wnt シグナル伝達の構成経路に対する阻害剤を作用させ、幹細胞の分化能力について検討を行った。長期細胞培養後の幹細胞に対して Wnt シグナル阻害剤を作用させた実験群では非作用群と比較して、分化能力が高くなっている事が確認された。このことから、Wnt シグナル阻害剤は、細胞培養条件下において幹細胞の未分化維持因子として作用している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) are stem cell that differentiate into osteocyte and adipocyte. In this study, we investigated whether the Wnt signaling inhibitor has a potency of the stemness of SHED after long-term cell culture or not. We demonstrated that SHED treated with the Wnt signaling inhibitor was capable of stemness *in vitro* experiment and generating bone structures at 8 weeks post-transplantation into nude mouse. These data suggested that the Wnt signaling inhibitor acts as a stemness factor on SHED after long-term cell culture.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,200,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科矯正学

キーワード：乳歯歯髄由来幹細胞、未分化維持、継代培養

1. 研究開始当初の背景

近年、iPS細胞に代表されるように、幹細胞を用いた再生医療への応用に対し社会的な期

待が高まっている。乳歯歯髄由来幹細胞 (SHED: Stem cells from human exfoliated

deciduous teeth)は、骨髄や臍帯血の幹細胞に比べて細胞の増殖能が高く、骨細胞、脂肪細胞、神経細胞などへの多分化能を有している。また、SHED交換期の脱落乳歯から分離することが可能であり、歯科領域における有用な幹細胞である。SHEDを用いてヒトの骨組織を再生する場合、広範囲の骨を再生するためには大量の幹細胞の調達が必須となる。しかし、一般に生体から採取できる幹細胞の数はごく少量であり、生体外で効率よく細胞数を増やす必要がある。しかし、長期間にわたり幹細胞の継代培養を行うと、幹細胞としての分化能が低下することが知られており、そのため、幹細胞を未分化の状態を保持して継代することが重要となるが、現在行われている通常の培養方法では、幹細胞を未分化状態で維持して培養することは困難とされている。

2. 研究の目的

生体内においては、幹細胞を未分化な状態で維持する機構 (niche) が存在している。niche細胞からは、未分化性を維持する因子および分化シグナルを抑制する因子が産生され、これらの分子によって幹細胞は未分化状態が維持されていることが知られている。そこで、本研究では、培養細胞条件下においてもniche環境を再現することが可能か検索した。

3. 研究の方法

(1) SHED の採取

交換期のため脱落した乳歯の歯髄から歯髄組織を採取、酵素処理によって単離した細胞群から、negative selection によって SHED を選抜し、初代培養細胞株を得た。初代培養細胞株に対し 10 代以上の継代を行った長期継代培養細胞群の SHED を実験に用いた。

(2) SHED の未分化状態の評価

長期継代培養細胞に対して、培養液に Wnt シグナル阻害剤を添加し、以下の実験を行い非添加群と添加群における SHED の分化能を

比較検討した。

- ① Cell viability assay
- ② CFU assay
- ③ Population doubling
- ④ BrdU assay
- ⑤ Cell migration assay
- ⑥ Osteoinduction assay

Well 上に播種した SHED が confluent 状態になった事を確認し、骨細胞誘導培地に変更し、骨細胞分化誘導を行なった。誘導培地交換 3 週間後に細胞を固定、von Kossa 染色を行い、形成された石灰化結節の大きさを骨細胞分化能力を比較した。

⑦ Adipoinduction assay

Well 上に播種した SHED が confluent 状態になった事を確認し、脂肪細胞誘導培地に変更。脂肪細胞分化誘導を行なった。誘導培地交換 1 週間後に Oil red O 染色を行い、脂肪滴を内包している細胞の数を計測し、脂肪細胞分化能力を比較した。

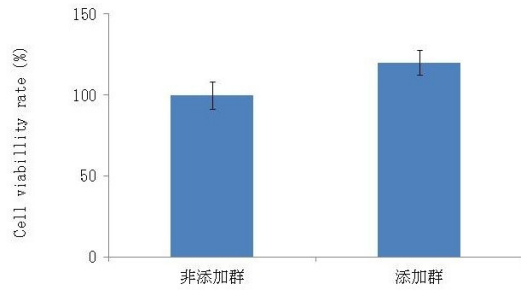
⑧ Transplant assay

培養した SHED を Hydroxyapatite (HA) (セラタイト®) と混和し、ヌードマウス (BALB/c Slc-nu/nu) 背部に移植した。移植 8 週間後にマウスを屠殺。移植した Transplant 体を固定、ギ酸を用いて硬組織の脱灰を行った。脱灰後の Transplant 体を通法に従い薄切片を作成。HE 染色を行い顕微鏡下にて形成された新生骨組織の状態を観察した。

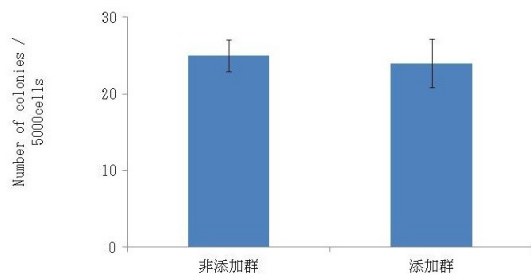
4. 研究成果

(1) SHED の未分化状態の評価

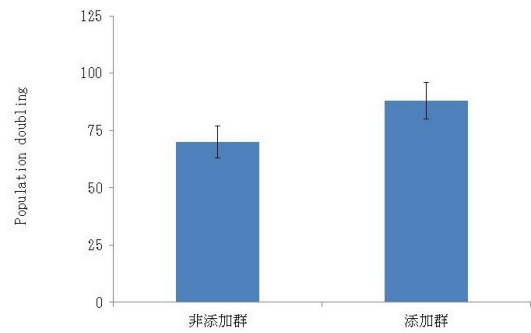
① Cell viability assay



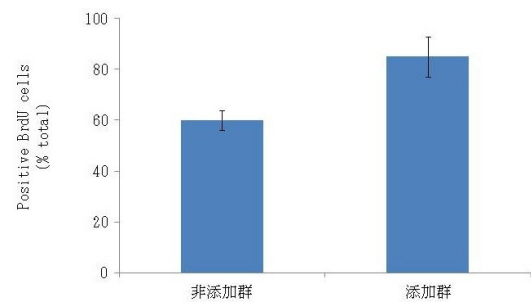
② CFU assay



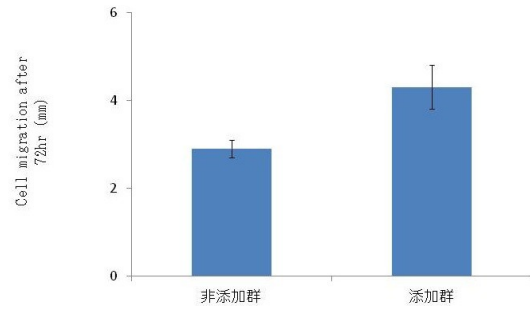
③ Population doubling



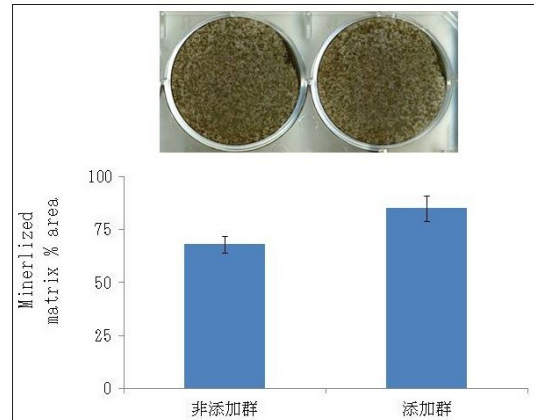
④ BrdU assay



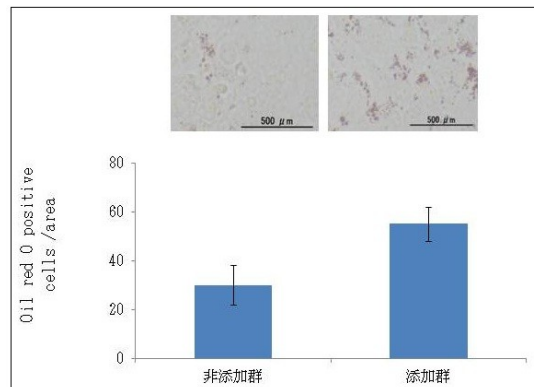
⑤ Cell migration assay



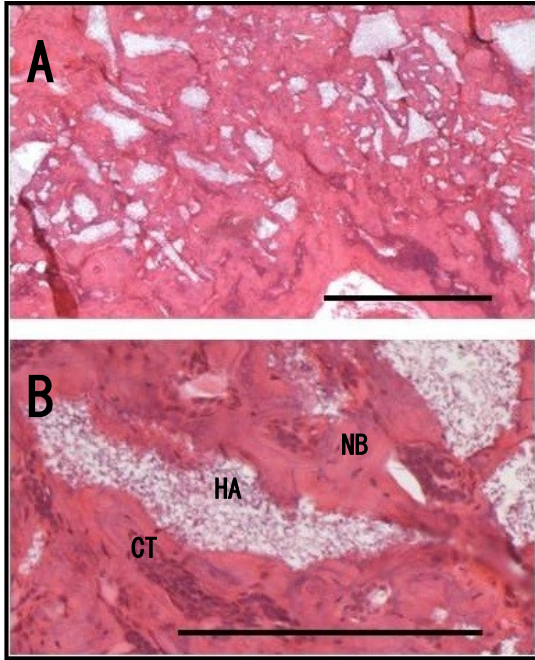
⑥ Osteoinduction assay



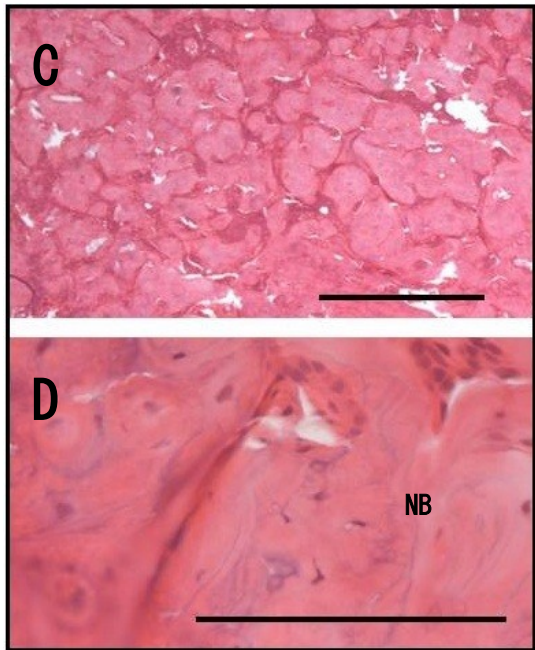
⑦ Adipoinduction assay



⑧ Transplant assay

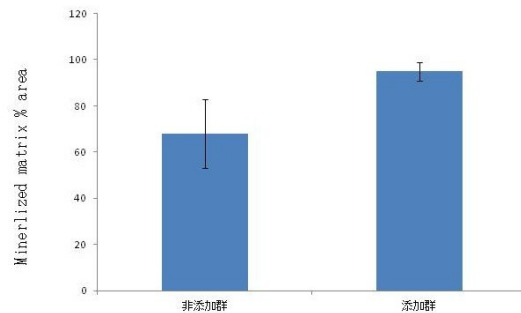


非添加群における Transplant の HE 染色写真。A：弱拡大 (bar 500 μ m)。B：((bar 100 μ m)。NB：新生骨。HA：Hydroxyapatite。CT：結合組織。



添加群における Transplant の HE 染色写真。C：弱拡大 (bar 500 μ m)。D：強拡大 (bar 100 μ m)。NB：新生骨。

上の写真は、HA と共に移植した SHED の Transplant 体の切片像である。Wnt シグナル阻害剤の非添加群および添加群の両方のグループにおいて新生骨の形成が確認された (A, B および C, D)。切片上で形成された骨量を測定した所、添加群 (C, D) における新生骨の面積は、非添加群 (A, B) に対し明らかに多いことが判明した。非添加群 (A, B) では、SHED とともに埋入した HA が吸収されずに残っているのに対し、添加群 (C, D) では HA が完全に消失していた。添加群において埋入した HA が消失している理由として、破骨細胞によって HA が吸収されたと考えられる。一旦形成した新生骨の吸収と添加による骨リモデリングが進行した際に、新生骨とともに HA も破骨細胞によって吸収されたものと推測される。添加群 (D) において形成している新生骨は層板状の構造を呈している事からも、骨のリモデリングが活発に行われている事を示唆している。



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 Kikuri Takashi, Yoshimura Yoshitaka, Tabata Futoshi, Hasegawa Tomokazu, Nishihira Jun, Shirakawa Testuo (2011) Stage-dependent suppression of the formation of dentin-resorbing

multinuclear cells with MIF in vitro.
Experimental and Therapeutic Medicine.
Experimental and Therapeutic Medicine.
3:37-43. 査読有

- ② Mayumi Nomura, Yoshitaka Yoshimura,
Takashi Kikuri, Tomokazu Hasegawa,
Yumi Taniguchi, Yoshiaki Deyama,
Ken-ichi Koshiro, Hidehiko Sano,
Kuniaki Suzuki and Nobuo Inoue (2011)
Platinum nanoparticles suppress
osteoclastogenesis through scavenging
of ROS productions in RAW264.7 cells.
Journal of Pharmacological Sciences
117: 243-252. 査読有
- ③ Kenjiro Shibata, Yoshitaka Yoshimura,
Takashi Kikuri, Tomokazu Hasegawa,
Yumi Taniguchi, Yoshiaki Deyama,
Kuniaki Suzuki and Junichiro Iida
(2011) Effect of the release from
mechanical stress on
osteoclastogenesis in RAW264.7 cells.
International Journal of Molecular
Medicine 28(1): 73-79. 査読有

[学会発表] (計1件)

- ① 松野 美乃、菊入 崇、佐藤 嘉晃、飯
田 順一郎、鈴木 邦明 (2011) 間葉系
幹細胞と造血系幹細胞の併用による骨組
織再生の試み第70回 日本矯正歯科学
会大会&第4回国際会議 (名古屋市・名
古屋国際会議場)
- ②

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊入 崇 (KIKURI TAKASHI)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：10322819

(2) 研究分担者

吉村 善隆 (YOSHIMURA YOSHITAKA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30230816

(3) 連携研究者

なし