

平成23年 3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792071

研究課題名 (和文) ヒト乳歯幹細胞の同定および純化に関する研究

研究課題名 (英文) Investigation of identification and purification of human deciduous tooth-derived stem cells

研究代表者

川邊 紀章 (KAWANABE NORIAKI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：00397879

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、SSEA-4 がヒト乳歯由来の幹細胞を同定・純化するための特異的マーカーとして利用できるかについて検討を行った。SSEA-4 陽性乳歯歯根膜細胞の 68.4% および SSEA-4 陽性乳歯歯髄細胞の 85.7% が脂肪細胞と骨芽細胞への分化能を有していた。また、これらの SSEA-4 陽性細胞は、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化能を有していた。これらの結果から、SSEA-4 がヒト乳歯歯根膜・歯髄幹細胞の特異的マーカーであることが示された。

研究成果の概要 (英文)：

In the present study, we investigated if SSEA-4 could serve as a marker to distinguish human deciduous tooth-derived stem cells. Clonal assay demonstrated that 68.4% of SSEA-4-positive periodontal ligament (PDL) cells and 85.7% of SSEA-4-positive dental pulp (DP) cells exhibit either adipogenic or osteogenic potential. In addition, these cells showed adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiation. These results showed that SSEA-4 can be used to promote the enrichment of stem cells from the PDL and DP of human deciduous teeth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			0
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景

従来は治療が困難であった病気に

対する新しい医療として、再生医療への期待が高まってきている。再生医療とは、胎生期

にしか形成されることのない臓器を、人工的に形成した組織あるいは臓器を用いて機能回復を図る医療である。近年、骨髄をはじめとする様々な組織に幹細胞が存在することが分かってきており、この体性幹細胞を用いた臓器再生の研究が活発に行われている。

申請者は、再生医療に用いる幹細胞の候補として、乳歯の幹細胞に着目した。近年の研究により、歯の細胞の中にも、多分化能をもつ体性幹細胞が存在することが分かっている [Seo B.M. et al., 2004; Shi S. et al., 2003; Kawanabe N. et al., 2010]。自己の歯から取り出した幹細胞は、胚性細胞の利用に際して問題となる倫理的・宗教的問題や組織適合性などの問題がないという利点がある。また、特に乳歯は自然脱落するため、他の器官と異なり非侵襲的に採取できるという利点がある。このように、歯の細胞は幹細胞の供給源として非常に魅力的である。これまでの国内・国外の研究では、歯の幹細胞を同定・純化するためにSTRO-1が有用であることが示されている。しかし、STRO-1抗原の発現は不安定であり、歯の細胞において発現が認められないという報告もある [Trubiani O. et al., 2005]。申請者の実験でも、歯根膜細胞におけるSTRO-1の発現は1%前後しか認められなかった。このため、歯の幹細胞の同定・純化をより効率的に行うためには、STRO-1に替わる別の抗原を探す必要がある。

申請者はこれまでの研究において、Stage-specific embryonic antigen (SSEA)-4が歯根膜幹細胞を同定・純化することのできる新たな表面抗原マーカーとして有用であることを発見した。本研究では、この研究結果を応用し、SSEA-4抗原をマーカーとして乳歯幹細胞を同定・純化できるかどうかを検討する着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、SSEA-4をマーカーとして、ヒト乳歯由来の幹細胞を同定・純化する技術の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) SSEA-4をマーカーとして、ヒト乳歯幹細胞を同定することができるか。

申請者は、これまでの研究において、ヒト乳歯細胞もSSEA-4が発現していることを免疫細胞化学、およびフローサイトメトリーを用いて確認した。このSSEA-4陽性乳歯細胞が幹細胞としての性質を有しているかを調べるために以下について検討を行った。

①SSEA-4(+)細胞がSSEA-4(-)細胞と比較して高い増殖能を有しているか。

フローサイトメトリー (FACS Aria, BD Biosciences) を用いて、96穴プレートに同数のSSEA-4(+)細胞・SSEA-4(-)細胞を播種し、培養した。一週間後に、MTS化合物を用いた細胞増殖活性試験を行い、細胞増殖能の違いを調べた。

②SSEA-4(+)細胞がSSEA-4(-)細胞と比較して長いテロメアを有しているか。

テロメア長の測定は、Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry (Dako)を用いた。SSEA-4の発現は抗体で染色した。いずれの蛍光強度も、フローサイトメトリーにて検出した。

③乳歯細胞の分化段階に応じて、SSEA-4の発現が変化するか。

All-trans-retinoic acid (10^{-5} M) を添加した無血清培地にて、乳歯細胞の分化誘導を行った。対照群の細胞は、無血清培地のみで培養を行った。一週間後に細胞を回収し、SSEA-4発現の変化をフローサイトメトリーにて調べた。

(2) ヒト乳歯SSEA-4陽性細胞が多分化能を有しているか。

SSEA-4(+)ヒト乳歯細胞が多分化能を有するか、*in vitro*にて検討を行った。

Clonal assayを行うために、フローサイトメトリーを用いて単一SSEA-4(+)細胞由来の細胞株を樹立し、この細胞を用いて以下の実験を行った。

①中胚葉系組織への分化能の評価

脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞への分化誘導を行った。分化誘導の方法は、Pittengerら(1999)の報告に基づいて行った。脂肪細胞への分化は、oil red O染色により評価した。骨芽細胞への分化は、alizarin red S染色により評価した。軟骨細胞への分化は、alcian blue染色により評価した。各々の分化マーカーの発現は、RT-PCRにて調べた。

②外胚葉系組織への分化能の評価

神経細胞への分化誘導を行った。分化誘導の方法は、Woodburyら(2002)の報告に基づいて行った。神経細胞への分化は、neuron specific enolase (NSE)の免疫細胞化学により評価した。分化マーカーの発現は、RT-PCRにて調べた。

③内胚葉系組織への分化能の評価

肝細胞への分化誘導を行った。分化誘導の方法は、Ikedaら(2008)の報告に基づいて行った。肝細胞への分化は、albuminの免疫細胞化学により評価した。分化マーカーの発現は、RT-PCRにて調べた。

(3) ヒト乳歯SSEA-4陽性細胞が*in vivo*における組織再生能を有しているか。

SSEA-4(+)ヒト乳歯細胞が生体内において組織再生能を有しているかを調べるために、*in vivo* bone formation assayを行った。ハイドロキシアパタイトのスキヤフォールドとして、CELLYARD HA scaffold/pellet (PENTAX)を使用した。宿主としては、免疫不全マウス(NOD/ShiJic-scidJcl; CLEA)を使用した。実験方法は、Okamotoら(2006)の報

告に基づいて行った。得られた標本は切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色にて骨形成を評価した。

4. 研究成果

本研究では、まず培養ヒト乳歯歯根膜細胞および培養ヒト乳歯歯髄細胞の多分化能を調べた。その結果、乳歯歯根膜細胞は脂肪細胞と骨芽細胞への分化能を有していた(n=2)。一方、乳歯歯髄細胞は脂肪細胞と骨芽細胞への分化能を有している細胞(3/6)と脂肪細胞へは分化しないが骨芽細胞への分化能は有している細胞(3/6)が存在することが分かった。SSEA-4陽性クローン細胞を樹立した実験の結果、SSEA-4陽性乳歯歯根膜細胞では68.4%(13/19)の細胞が脂肪細胞と骨芽細胞への分化能を有していた。また、SSEA-4陽性乳歯歯髄細胞では92.3%(12/13)の細胞が骨芽細胞への分化能を有しており、脂肪細胞への分化能を有する乳歯歯髄細胞から樹立したSSEA-4陽性細胞では85.7%(6/7)の細胞で脂肪細胞と骨芽細胞への分化が認められた。

さらに、SSEA-4陽性乳歯歯根膜クローン細胞は脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞への分化能を有していることが示された。また、SSEA-4陽性乳歯歯髄クローン細胞は、脂肪細胞への分化能を有している細胞から樹立した細胞は脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞への分化能を有しており、脂肪細胞への分化能を有していない細胞から樹立した細胞は骨芽細胞・軟骨細胞への分化能を有していた。

これらの結果から、SSEA-4が乳歯歯根膜幹細胞および乳歯歯髄幹細胞を同定・純化しうるマーカーであることが示された。

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7件)

① Yasuyo Sugawara, Ryoko Ando, Hiroshi Kamioka, Yoshihito Ishihara, Tadashi Honjo, Noriaki Kawanabe, Hiroshi Kurosaka, Teruko Takano-Yamamoto, Takashi Yamashiro. The Three-Dimensional Morphometry and Cell-Cell Communication of the Osteocyte Network in Chick and Mouse Embryonic Calvaria. *Calcified Tissue International* 査読有, in press.

② Yuko Shintaku, Takashi Murakami, Takeshi Yanagita, Noriaki Kawanabe, Tomohiro Fukunaga, Kiyomi Matsuzaki, Setsuko Uematsu, Yasuhiro Yoshida, Hiroshi Kamioka, Teruko Takano-Yamamoto, Kenji Takada, Takashi Yamashiro. Sox9 Expression during Fracture Repair. *Cells Tissues Organs* 査読有, in press.

③ Yoshihito Ishihara, Shingo Kuroda, Noriaki Kawanabe, Teruko Takano-Yamamoto, Takashi Yamashiro. Intraoral vertical ramus osteotomy improved the stomatognathic function in an aged patient with mandibular protrusion: a case report. *Acta Medica Okayama* 査読有; 64: 2010, 345-349.

④ Noriaki Kawanabe, Satoko Murata, Kaoru Murakami, Yoshihito Ishihara, Satoru Hayano, Hiroshi Kurosaka, Hiroshi Kamioka, Teruko Takano-Yamamoto, Takashi Yamashiro. Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. *Differentiation* 査読有; 79: 2010, 74-83.

⑤ Srinivasan Shanmugarajan, Noriaki Kawanabe, Masanori Koide, Eichi Tsuruga, Jazmine E. Arroyo, Lyndon L. Key Jr., Sakamuri V. Reddy. IL-12 stimulates the osteoclast inhibitory peptide-1

(OIP-1/hSca) gene expression in CD4+ T cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 査読有; 107: 2009, 104-111.

⑥ 白賀のり子、上岡寛、片岡伴記、植田紘貴、安藤涼子、石原嘉人、柳田剛志、村上隆、黒坂寛、菅原康代、本城正、川邊紀章、山城隆、岡山大学病院矯正歯科における来院患者の実態調査、*岡山歯学会雑誌*、査読有、28巻、2009、107-114

⑦ 植田紘貴、上岡寛、川邊紀章、山城隆、外傷性咬合ならびに歯周疾患を伴う成人下顎前突症例、*中・四国矯正歯科学会雑誌*、査読有、第21巻、2009、47-53

〔学会発表〕(計15件)

① 吉川祐介、ヒト歯根膜細胞におけるギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションについて、第69回 日本矯正歯科学会大会、2010年9月27-29日、横浜

② 石原嘉人、骨組織内ライブイメージングを用いた機械的刺激に対する細胞内カルシウム応答の検討、第69回 日本矯正歯科学会大会、2010年9月27-29日、横浜

③ 早野暁、ヘパラン硫酸の糖残基修飾は象牙質形成に関与する、第69回 日本矯正歯科学会大会、2010年9月27-29日、横浜

④ 福島宏明、SSEA-4を用いたヒト乳歯歯根膜幹細胞の同定、第69回 日本矯正歯科学会大会、2010年9月27-29日、横浜

⑤ 川邊紀章、包括的矯正治療を行った骨格性下顎前突症例、第69回 日本矯正歯科学会大会、2010年9月27-29日、横浜

⑥ Noriaki Kawanabe. SSEA-4 identifies human periodontal ligament stem cells. 88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. July 14-17, 2010 Barcelona, Spain.

⑦Yoshihito Ishihara. Direct imaging of flow-induced oscillatory calcium rise in living bone. 88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. July 14-17, 2010 Barcelona, Spain.

⑧ 白賀のり子、岡山大学病院矯正歯科における来院患者の実態調査、第53回中・四国矯正歯科学会大会、2010年7月10-11日、米子

⑨ 川邊紀章、Stage-specific Embryonic Antigen-4を用いたヒト歯根膜幹細胞の同定、日本組織培養学会 第83回大会、2010年5月20-21日、岡山

⑩ 早野暁、歯の発生に対するWntシグナリングと糖鎖による修飾、日本組織培養学会 第83回大会、2010年5月20-21日、岡山

⑪ 川邊紀章、SSEA-4を用いたヒト歯根膜幹細胞の同定、第68回 日本矯正歯科学会大会、2009年11月16-18日、福岡

⑫ 村田智子、ヒト歯髓幹細胞の性質について、第68回 日本矯正歯科学会大会、2009年11月16-18日、福岡

⑬ 白賀のり子、関節円板位置異常と前方限界

運動の関連性について、第30回岡山歯学会総会・学術集会、2009年11月8日、岡山

⑭ 白賀のり子、関節円板位置異常と前方限界運動の関連性について、第52回中・四国矯正歯科学会大会、2009年7月4-5日、徳島

⑮ 植田紘貴、外傷性咬合ならびに歯周疾患を伴う成人下顎前突症例、第52回中・四国矯正歯科学会大会、2009年7月4-5日、徳島

[産業財産権]
○出願状況 (計1件)

名称：歯髓細胞から象牙芽細胞への分化誘導方法

発明者：山城隆、黒坂寛、川邊紀章

権利者：同上

種類：特許

番号：特願2009-262378

出願年月日：2009年11月17日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川邊 紀章 (KAWANABE NORIAKI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：00397879