

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6月7日現在

機関番号：32667

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：平成21年度～平成23年度

課題番号：21890267

研究課題名（和文）上皮陥入によるヒト再生歯三次元モデルの構築および再生促進漢方薬剤の開発

研究課題名（英文）Reconstructing tooth early stage using human cells and screening the potential Chinese herbs for tissue-regeneration

研究代表者

肖 黎 (Xiao Li)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：80548256

研究成果の概要（和文）：

上皮陥入は歯の発生初期にみられる重要な特徴である。本研究ではヒト口腔上皮細胞OECs及び歯髄由来間葉系幹細胞DPSCsを用いて、歯の発生初期における上皮陥入様構造物を世界で初めて三次元的に再構築した。この三次元上皮陥入モデルでは、歯の発生初期における典型的な上皮陥入と間葉凝集、すなわち上皮組織が間葉組織への陥入及び陥入部位の周囲に間葉細胞の凝集が立体的に観察された。初期歯の上皮陥入および間葉凝集に関する分子マーカーはこのモデルに検出されたことから、このモデルは忠実に上皮陥入を再現することがわかった。この上皮陥入三次元モデルが歯の発生・再生に関わる分子メカニズムの解析に有用なツールとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

Epithelium invagination is the key feature of early tooth development. In this study, we first built a three dimensional model to represent epithelium invagination-like structure by tissue engineering using human normal oral epithelial cells (OECs) and dental pulp stem cells (DPSCs). OEC-DPSC co-cultures on matrigel showed typical invagination of epithelial cells and condensation of the underlying mesenchymal cells in a three-dimensional manner. Epithelial invagination related molecules, *CD44* and *E-cadherin*, and mesenchymal condensation involved molecules, *N-cadherin* and *Msx1* expressed at a high level in the tissue model, suggesting the epithelial invagination is functional. Our results suggest that co-cultivated OECs and DPSCs on matrigel under certain conditions can build an epithelium invagination-like model. This model might be explored as a potential research tool for epithelial-mesenchymal interaction and tooth regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,040,000	312,000	1,352,000
2010年度	730,992	219,297	950,289
2011年度	189,008	56,702	245,710
総計	1,960,000	587,999	2,547,999

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯モデル・上皮陥入・上皮間葉相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢化に伴う難治性疾患の根本的な原因は組織の自己修復、再生能力の低下にある。超高齢社会の日本にとって、組織再生メカニズムの解明および再生促進薬剤の開発が重要かつ急務である。

(2) 上皮陥入は歯の発生初期にみられる重要な特徴である。ヒト歯の発生においては、発生6週目から、第1鰓弓由来の口腔粘膜上皮細胞と神経堤由来の間葉細胞が互いに連続的に、重複的にシグナル分子を交換する上皮-間葉相互作用によって、歯の細胞分化・形態形成が進行する。歯の発生の第一段階では、上皮細胞と間葉細胞は Integrins や CD44s などの細胞表面分子を通して、互いに認識し、粘着する。その後、上皮-間葉の間に BMP、FGF、SHH、WNT や TNF などのシグナルグループは複雑な分子ネットワークを形成する。この分子ネットワークの制御を受けて、上皮細胞の一部が急速に増殖、上皮から間葉への陥入が行われ、器官の誘導（歯の発生）が起こると考えられている。ただし、上皮陥入を誘導する上皮-間葉相互作用の全容について、いま不明な点がまだ多く残している。

(3) 現在、歯の再生研究は主に上記の歯の発生過程を模倣して、動物胎児の歯胚細胞をティッシュエンジニアリングの方法で再構築することである。Nakao らはマウス 14.5 日齢胎児の歯胚から酵素処理によって単一化した上皮細胞と間葉細胞を三次元的に培養した上でマウス腎臓皮膜下に移植し、歯の再生に成功した。また、ヒト歯髓由来の間葉系細胞を用いた研究から歯髓様組織の形成について多くの研究報告がある。そして、自己口腔粘膜上皮細胞を利用して、組織工学的に作製した培養上皮細胞シート移植による角

膜の再生はすでに臨床に応用されている。しかし、優れた再生能力を持っているヒト口腔粘膜上皮細胞と歯髓由来間葉系細胞を組み合わせることで上皮陥入を再現する研究はまだ報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、組織再生能力の向上を目指し、ヒト口腔粘膜上皮幹細胞やヒト歯髓由来間葉系幹細胞を用いて、歯発生初期に起こる上皮陥入を誘導し、再生歯の三次元モデルを構築し、歯再生過程における分子メカニズムを解明し、歯を初めとする組織の再生を促す漢方薬剤を開発する。国民の健康増進と総合的な Quality Of Life (QOL) 改善および医療費の削減を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト口腔粘膜上皮細胞と歯髓由来間葉細胞を用いて、歯の発生初期における上皮陥入の三次元モデルを組織工学法で構築する。

(2) 上記の三次元上皮陥入モデルを用いて、再生歯の経時的な組織学的検査を行い、歯の再生過程における遺伝子やタンパク質の発現を分子生物学的に解析し、上皮-間葉相互作用における重要なシグナルなどを解明する。

4. 研究成果

(1) ヒト口腔上皮細胞 OECs 及び歯髓由来間葉系幹細胞 DPSCs を用いて、歯の発生初期における上皮陥入様構造物を世界で初めて三次元的に再構築した。この上皮陥入モデルを構築するために、BD MatrigelTM と Collagen gel の 2 種類の Scaffolds を用いた (図 1)。

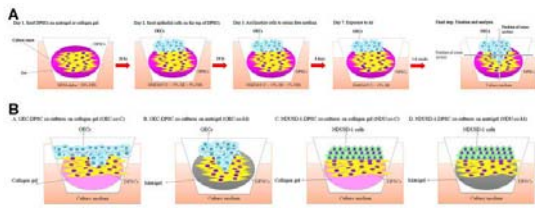


図 1 . Concept of three-dimensional epithelial-mesenchymal co-culture systems. A: Culture schedule of three-dimensional epithelial-mesenchymal co-cultures. B: Difference among four types of epithelial-mesenchymal co-cultures. (J Cell Biochem. 2012; 113:1875-1885)

BD Matrigel™ を Scaffold として構築された三次元上皮陥入モデルでは、歯の発生初期における典型的な上皮陥入と間葉凝集、すなわち上皮組織が間葉組織への陥入及び陥入部位の周囲に間葉細胞の凝集が観察された (図 2、図 3)。

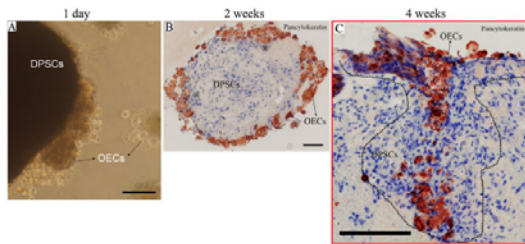


図 2 . Three-dimensional co-cultivated OECs and DPSCs on the matrigel. (J Cell Biochem. 2012; 113:1875-1885)

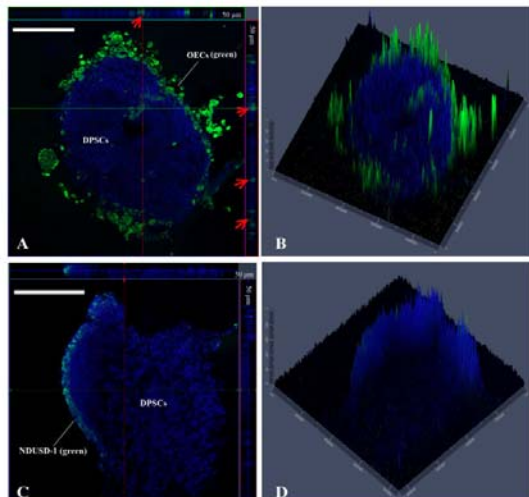


図 3 . 3D structure of epithelial invagination in OEC-co-M tissue model. Epithelial and mesenchymal cells were co-cultivated on matrigel for 4 weeks and followed by whole

mount fluorescent immunohistochemistry staining with anti-pan-cytokeratin antibody for OECs or anti-K8 antibody for NDUSD-1 cells. 3D images were taken and analyzed with confocal laser scanning microscopy. Between 40 and 50 slices were acquired for each image (left panel). Thickness of the side is 50 μm. A: 3D structure of OEC-co-M tissue model. OEC mass (green) migrated inside DPSC mass. Red arrows indicate 3D epithelial invagination from different angles. C: 3D structure of NDUSD-1 co-cultures. NDUSD-1 cells (green) formed a thin layer adjacent to DPSC mass. No NDUSD-1 cell invagination was observed. DAPI stained nuclei present blue color. Scale=50 μm. Right panel, 3D reconstruction from confocal laser scanning optical stacks of OEC-co-M tissue model (B) and NDUSD-1 co-cultures (D). (J Cell Biochem. 2012; 113:1875-1885)

(2) 歯の発生初期における分子マーカーの BMP4 や BMP2、CD44、E-cadherin (CDH1)、N-cadherin (CDH2)、integrin beta 1 (ITGB1) は発現されることに対して、歯の発生後期における分子 DSP と DMP1 は発現していないことが分かった (図 4)。

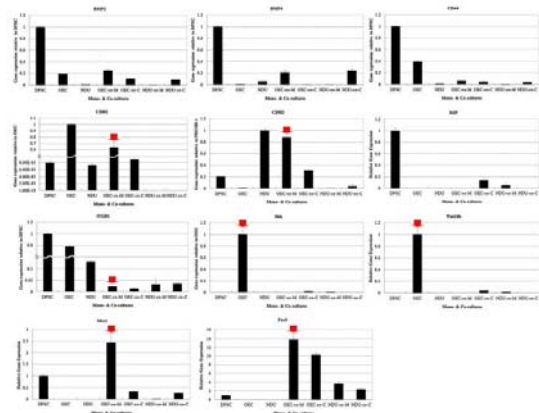


図 4 . Comparison of gene expression of tooth early stage markers among monolayer and three-dimensional co-cultivated mesenchymal and epithelial cells. qRT-PCR analysis showed that there are big differences of gene expression among monolayer DPSC, OECs, and NDUSD-1 cells, and four types of epithelial-mesenchymal co-cultures after 2 weeks cultivation. Red arrows indicate the expression of important molecules. CDH1 is essential for epithelial invagination. CDH2 and Msx1 are key molecules involved in mesenchymal condensation. CDH1, CDH2, and Msx1 showed high level expression in OEC-co-M tissue model. ITGB1 is involved in preventing

differentiation in stem cells. Both DPSCs and OECs showed higher expression of ITGB1, nevertheless OEC-co-M, OEC-co-C, and NDU-co-M co-cultures showed lower expression that indicates differentiation was in process. Shh and Wnt are important molecules for regulating epithelial stem cells functions. OECs expressed Shh and Wnt10b genes which were absent in NDUSD-1 cells.

Msx1 and Pax9 are tooth-specific genes. OEC-co-M tissue model showed the highest expression levels of Msx1 and Pax9 genes among monolayer DPSCs and the four types of co-cultures. Epithelial cells, OECs and NDUSD-1 cells did not express Msx1 and Pax9. Shown are the averages and standard deviations of three independent experiments.

(J Cell Biochem. 2012; 113:1875-1885)

それに対して、Collagen gelを用いたものでは、上皮陥入が観察されたものの、間葉凝集が認められなかった。また、ヒト不死化口腔上皮細胞NDUSD-1とDPSCsを用いた三次元培養物では、上皮組織の陥入及び歯の発生初期における分子マーカーが観察されなかった (図5)。

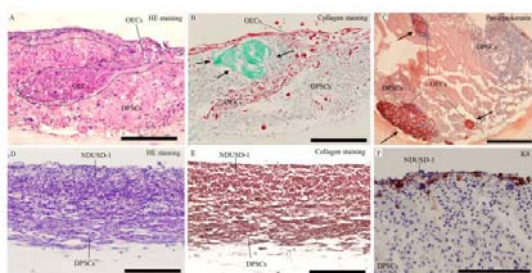


図5 . Three-dimensional epithelial-mesenchymal co-cultures on the collagen gel. Epithelial and mesenchymal cells were co-cultivated on collagen gel for 4 weeks and followed by immunostaining with anti-pan-cytokeratin antibody for OECs or anti-K8 antibody for NDUSD-1 cells. A: HE staining for OEC and DPSC co-cultures. Black dotted line indicates invagination of epithelial cells. B: Gomori's aldehyde fuchsin staining for identify collagen formation in OEC-co-C co-cultures. Arrows indicate collagen fibers (green). C: Pan-cytokeratin expression in OEC-co-C co-cultures. Arrows indicate epithelial colonies formed inside the mesenchyme. D: HE staining for NDU-co-C co-cultures. NDUSD-1 cells and DPSCs formed two layers without interference. E: Gomori's aldehyde fuchsin staining for NDU-co-C co-cultures. No collagen fibers were observed. F: K8 expression in

NDU-co-C co-cultures. K8 (b) epithelial cells did not invaginate into mesenchymal cells. (J Cell Biochem. 2012; 113:1875-1885)

(3) p75抗体を用いて免疫染色を行った結果、OECs-DPSCsで構築した三次元モデルではp75の発現が培養早期で観察された。NDUSD-1-DPSCs三次元培養物ではp75の発現が観察されなかったことから、p75が再構築した初期歯モデルの上皮陥入に参与する可能性が示唆された (図6)。

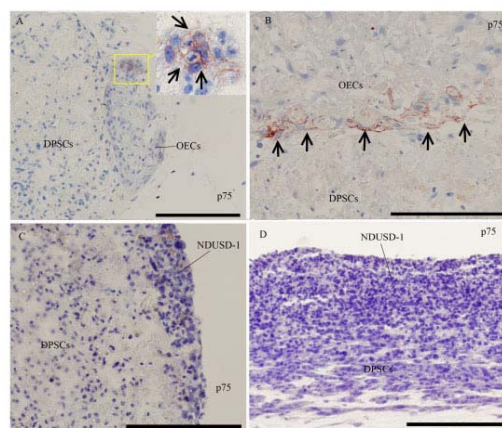


図6 . The p75 expression in three-dimensional co-cultivated epithelial-mesenchymal cells. Epithelial and mesenchymal cells were co-cultivated for 3 weeks, and followed by immunostaining for p75 expression. A: DPSCs and OECs were co-cultivated on matrigel. p75 (+) cells were observed inside OEC mass. B: DPSCs and OECs were co-cultivated on collagen gel. The p75 (+) cells were observed the boundary of which is between epithelial and mesenchymal tissue. C: DPSCs and NDUSD-1 cells were co-cultivated on matrigel. D: DPSCs and NDUSD-1 cells were co-cultivated on collagen gel. No positive signal was detected in C and D. Arrow indicates p75 (+) cells. (J Cell Biochem. 2012; 113:1875-1885)

(4) 本研究ではヒト口腔粘膜上皮細胞と歯髓細胞を共培養して、歯の発生初期における上皮陥入様構造物を世界で初めて三次元的に再構築した。この上皮陥入三次元モデルが歯の発生・再生に関わる分子メカニズムの解析に有用なツールとなることが期待される。上記の内容の論文は特に優秀なため、注目論文としてJ Cell Biochem, Vol

113, No 6 の“Features” sectionに掲載された。

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1件)

① Xiao L, Tsutsui T. Three-dimensional epithelial and mesenchymal cell co-cultures form early tooth epithelium invagination-like structures: expression patterns of relevant molecules. J Cell Biochem. 2012; 113:1875-1885. (上記の論文は特に優秀なため、注目論文として“Features” sectionに掲載された。)

[学会発表] (計2件)

① 肖 黎, 筒井健夫, 筒井健機: Serum Replacement™(SR)含有培地下でのヒト歯髄細胞スフェロイドの形成と特徴. 口腔組織培養学会誌, 2010年第19巻19-20頁

② Xiao L, Tsutsui TW, Tsutai T. Co-cultivated normal human oral epithelial cells (OECs) and dental pulp stem cells (DPSCs) build an epithelial invagination model. J Oral Biosci. 2010 (suppl); 52: 127.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 細胞または物質の定量用試薬

発明者: 肖 黎、筒井 健機

権利者: 肖 黎

種類: 特許

番号: 特願 2010-166268

出願年月日: 2010-7-23

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

肖 黎 (Li Xiao)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号: 80548256