

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390375

研究課題名(和文) 歯髄・歯根膜由来浮遊幹細胞の系統的初期化とその中枢神経性疾患への応用

研究課題名(英文) Tooth-derived mesenchymal cells as a cell replacement source in the treatment of neurological

研究代表者

住田 吉慶 (Sumita, Yoshinori)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：50456654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ヒト歯牙間葉系細胞から神経堤細胞に近い状態までへの初期化を、様々な培養条件を中心とした簡便な方法で試み、その可塑性を評価することである。その結果、PDLCsを低酸素環境下での浮遊培養に置くことで、骨や軟骨、腱などへの高い可塑性を発揮し得る未分化細胞を得ることが可能であった。ただし、ドーパミン細胞を含めた神経細胞への誘導については、低酸素刺激の有無に関わらず浮遊培養を経ることがその誘導性を高めるのに有用であることが示唆された。一方で、scleraxisの発現など歯根膜を構成する細胞の表現型も依然として一部維持されていたことから、未分化細胞への誘導性が十分でないことも示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this project is to isolate and to derive neural crest like cell fractions from dental mesenchymal tissues that will be capable of producing dopaminergic neurons for use in cell therapy treatments of Parkinson's disease. As results, when cultured human periodontal ligament derived cells (PDLCs) were exposed to transient hypoxic conditions in the floating culture, the stem cell and neural crest related-genes were up regulated markedly in the surviving cells, and these cells showed the highest plasticity. In particular, floating culture condition was effective to induce the neural cells, such as dopaminergic cells, from PDLCs rather than hypoxic condition. However, these surviving cells in floating culture maintained some typical phenotypes of periodontal ligament cells. We are currently investigating whether PDLCs exposed to these conditions can differentiate into dopamine producing neural cells in vivo.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：口腔組織幹細胞 初期化 浮遊培養 神経

1. 研究開始当初の背景

われわれは、歯髄や歯根膜の間葉系幹細胞 (MSCs) を用いて、歯や骨の硬組織の再生に関連した研究を行ってきた。これらの幹細胞は骨髄由来 MSCs と類似の性質を示し、骨や軟骨など複数の組織への分化が示されている。しかしながら、これらの体性幹細胞には既に一定の分化傾向が刷り込まれており、多分化能を発揮するには大きなハードルがあると考えられた。例えば、Stro-1 陽性のヒト歯根膜幹細胞においては、alkaline phosphatase (ALP) や osteopontin (OP) 等の骨系マーカーと共に、靱帯系のマーカーである scleraxis が発現しており、一定の分化傾向が既に内在している (Itaya T, et al. 2009)。しかしながら、その一方で、近年の遺伝子マーカーによる発生学的検討では、歯牙由来の間葉細胞の多くは、神経堤に由来することが示されている。発生期には神経堤細胞は驚くほどの可塑性を示し、末梢神経や支持細胞の大部分、色素細胞、内分泌細胞、頭部骨格など様々な細胞種に分化する。従って、神経堤細胞に近い段階にまで歯牙間葉系細胞の初期化が可能になれば、従来の歯牙由来の幹細胞には見られない高い可塑性を獲得できる可能性がある。

一方、中枢神経系疾患においては、その治療法として神経幹細胞移植の効果が期待されているが、成体における適当な幹細胞源は見つかっていない。現在 iPSCs を含む胚型の幹細胞に最も期待が寄せられているが、その分化の制御性の問題から、実用化の段階に至ってはいない。そこで、申請者らは、初期化を誘導した歯牙間葉系細胞の可塑性や機能補完能力を、中枢神経系細胞への分化や疾患モデルにて評価することを計画した。例えば、代表的な神経性疾患であるパーキンソン病は、ドーパミン産生 (DA) 神経が変性・欠落することで起こる神経変性疾患であるが、近年 *in vitro* において、浮遊培養後の骨髄 MSCs から DA 細胞の誘導が示されている (Suon S, et al. 2004, 2006)。しかしながら、DA 神経の機能蛋白であるチロキシン水酸化酵素 (TH) に陽性を示す細胞は約 15% に過ぎず、細胞源としては確立されていない。骨髄中の MSCs の一部も神経上皮に由来する体幹部の神経堤細胞にあることが示されているが、主要な供給源は別にあることが示唆されている。一方、歯牙の間葉系細胞は、マウスにおいてその約 60% が神経堤由来であることが示されており (Yamazaki H, et al. 2007)、骨髄 MSCs と比較して、神経堤細胞への初期化や、分化の系譜上の近縁に当たる中枢神経系への分化には有利である可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、lineage reprogramming の発想により、ヒトの歯牙間葉系細胞から神経堤細胞への初期化を行うことにある。具体的には、様々な幹細胞選択的条件を神経堤細胞

の維持に用いる培養法に応用することで、初期化を試み、得られた細胞の可塑性をパーキンソン病モデルにて評価を行う。神経堤細胞への発生を遡る形での初期化は、その系譜に属する細胞への分化制御が容易な安全性の高い多能性幹細胞の獲得に繋がると考えられる。そして、歯牙組織からそれが達成されれば、顎骨や唾液腺などの口腔組織はもとより、分化系譜の近縁に当たる中枢神経系組織などに対して、早期に実現可能な再生医療を構築できる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究では、下記の 3 つの順に実験を行なうことを計画した。

浮遊培養に低酸素刺激による幹細胞選択的条件を応用することで、歯牙の間葉系細胞から神経堤への初期化条件を検討する。われわれは、歯髄の間葉系幹細胞を重度低酸素下にて培養すると、胚性幹細胞の維持に関わる初期化因子の発現が誘導されることを既に確認している (Agata H, et al. 2008)。

MSCs や ESCs で示されている誘導条件を用い、得られた細胞から DA 細胞への分化誘導を試みる。その際、その誘導効率を MSCs や ESCs と比較する。

初期化された細胞や誘導された DA 細胞をパーキンソンモデルに移植し、その組織補完能力を評価する。

1) 歯牙の間葉系細胞の初期化の誘導、もしくは抽出・濃縮；

ヒト歯根膜組織からコラゲナーゼとセルストレーナーを用いて細胞を単離した後、接着培養にて増殖させた細胞群を、10ng/ml hbFGF と 20ng/ml hEGF を添加した無血清培地に移し、1 週間程度培養を続けることで、浮遊細胞塊を得た。

次に、その浮遊細胞塊を低酸素 ($O_2 < 3\%$)、もしくは重度低酸素 ($O_2 < 0.1\%$) の 2 種類の低酸素刺激環境下に数時間晒すことで、歯根膜細胞の初期化や多能性幹細胞の抽出・濃縮を試みた。低酸素刺激に晒された細胞群は、その特性を未分化性の維持に関わる因子 (oct4 など) や神経堤細胞 (p75^{ntr} など)、神経細胞 (β 3tublin や TH など) のマーカーなどの遺伝子や蛋白の発現について解析を行なった。また、低酸素刺激を与えた細胞群について、骨や軟骨、脂肪、腱への分化誘導を行ない、その可塑性を評価すると共に、神経細胞への分化誘導も行なった。

2) DA 細胞への分化誘導；

Suon らにより示されている MSCs の分化誘導条件 (Suon S, et al. 2004) を用いて、低酸素刺激を与えた細胞から DA 細胞への分化を図った。条件は、PORN/Ln-coated culture slide を用いて、200nM TPA や 250 μ M TBMX、50 μ M Forskolin などによる DA differentiation cocktail

を含んだ無血清培地にて7日間培養を行なった。その後、得られた細胞は、神経細胞マーカーである β 3tublin 陽性細胞中に占める tyrosine-Hydroxylase (TH)陽性細胞 (DA 細胞マーカー) の割合を計測した。

3) パーキンソンモデルへの移植；

パーキンソン病モデルは、アスコルビン酸添加生理食塩水に溶かした 6-OHDA を F344 immunocompromised ラットの脳の線条体へ投与することで作出することにした。投与1週間後に低酸素刺激を与えた後に単離した細胞群、および DA へ分化誘導した細胞を脳の線条体へ移植する。その後、移植後12週にて脳の凍結切片を作成し、TH や β 3tublin、Dopa Decarboxylase、Nurr1、Nestin、GFAP など組織特異的な抗体による免疫組織学的評価を行なう。さらに、移植した細胞の生体内での挙動を解析するために、免疫染色とヒト性染色体特異的プローブを用いた FISH の 2重染色を施し、観察を行なうこととした。

4. 研究成果

1) 歯牙間葉系細胞に対する浮遊培養下での低酸素刺激による初期化の誘導、もしくは未分化細胞の抽出・濃縮；

ヒト抜去歯から歯根膜組織を採取後、3~4継代培養した歯根膜細胞 (Periodontal Ligament Cells; PDLCs) を無血清の浮遊培養下に1週間程度置き、形成された浮遊細胞 (Floating-PDLCs; F-PDLCs) の特性を解析したところ、nestin や sox2、sox10、bmi1 などの神経堤細胞や幹細胞関連因子の上昇を確認した。これにより、通常の接着培養を行なった細胞群より浮遊培養した細胞群の方が、未分化性の高い細胞が抽出できていると考えられた。

次に、F-PDLCs に低酸素 ($O_2 < 3\%$)、もしくは重度低酸素 ($O_2 < 0.1\%$) の2種類の低酸素刺激を与え、それによる細胞の未分化性の獲得、もしくは未分化細胞の抽出を試みることにした。われわれは、歯髓細胞の平面培養において、12~24時間程度の重度低酸素刺激、一過性の未分化マーカーの発現上昇を誘導することを明らかにしている (Agata H, et al. 2008)。そのため、短期間の重度低酸素刺激が、細胞の初期化の誘導や未分化細胞の抽出により大きな影響を与える可能性があると考えた。その結果、6時間の重度低酸素、および24時間の低酸素環境に晒された PDLCs では、oct4 や sox2、p75ntr などの幹細胞関連因子の発現上昇を認めた。しかしながら、重度低酸素では、6時間を超える刺激では細胞死に至る細胞が多数認められるようになり、24時間の刺激では、上記の幹細胞関連因子の発現は低下傾向にあった。一方、F-PDLCs では、48時間までの刺激において特性変化を解析したところ、24時間低酸素環境に晒した F-PDLCs では、上記の幹細胞関連因子の発現がさらに上昇しており、浮遊培養に低酸素刺

激を組み合わせた条件の有用性が示唆された。しかしながら、重度低酸素刺激では、6時間以上では細胞死に至る細胞塊を多く認め、6時間の時点における幹細胞関連因子の発現に有意な変動は認めなかった。尚、歯根膜細胞に恒常発現している scleraxis や msx2 の発現は、浮遊培養や低酸素刺激による大きな変動は観察されず、PDLCs や F-PDLCs に一定の分化傾向が依然として内在したままであることも示唆された。

次に、浮遊培養や低酸素刺激を与えた PDLCs の可塑性を評価するため、骨や軟骨、脂肪、腱への分化誘導を *in vitro* において試みた。その結果、低酸素刺激に晒された後、再酸素化して各成熟細胞への誘導を行なった場合、24時間の低酸素刺激後の PDLCs が最もこれらの成熟細胞への誘導性に優れていることが分かった。特に、骨分化誘導において、この傾向が顕著であった。

2) 神経系細胞への誘導；

上記の可塑性の評価と同様に、浮遊培養や低酸素刺激を与えた PDLCs の神経細胞への誘導を行なった。誘導は、マトリゲルをコートした培養皿において行なったが、これに関しては、24時間の低酸素培養を行なった F-PDLCs において、nestin や β 3tublin などの神経細胞マーカーの発現が、他の条件下に晒された PDLCs と比較して増加していることが分かった。浮遊培養が神経系の細胞への誘導に有利であることが示唆された。

次に、DA 細胞への誘導を試みた。過去に報告されている骨髄 MSCs からの誘導条件である DA differentiation cocktail を使用した無血清培地にて誘導を行なったところ、神経細胞マーカー陽性細胞中に占める TH 陽性細胞率は、F-PDLCs が PDLCs と比較して有意に高かったものの、低酸素刺激の有無や酸素濃度 ($O_2 < 3\%$ or $O_2 < 0.1\%$)、時間などの条件による顕著な差は認められなかった。そこで、F-PDLCs の DA 細胞への分化能や生着率などを *in vivo* において評価を行なうこととした。

3) パーキンソンモデルへの移植

ラット脳線条体に 6-OHDA を投与したモデルに、投与後1週間で F-PDLCs を移植する実験を計画した。現在、試料の一部を回収し、移植した F-PDLCs の生着や分化の状態を組織学に評価を行なっているところである。今後、移植条件の適正化を行ないつつ、F-PDLCs 移植の効果についても検討を行なっていく予定としている。

以上のことから、PDLCs を低酸素環境下での浮遊培養に置くことで、高い可塑性を発揮しうる未分化細胞の誘導、もしくは抽出が可能であることが明らかになった。ただし、DA 細胞を含めた神経分化については、短時間の低酸素刺激の有無に関わらず浮遊培養を経た PDLCs が有利であることが示唆された。一

方で、これらの細胞では、scleraxis の発現など歯根膜を構成する細胞としての表現型も依然として一部維持されていることから、未分化性の誘導が十分でないことも示唆される。ここまでの結果については、浮遊培養と低酸素刺激を与えた PDLCs の可塑性獲得の状態について論文を作成し、現在投稿中である。

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 18 件)

1. I T, **Sumita Y***, Minamizato T, Umebayashi M, Tran SD, Asahina I. Bone marrow-derived cell therapy for oral mucosal repair after irradiation. J Dent Res (査読有) ., *in press*, 2014.
2. Khalili S, Faustman DL, Liu Y, **Sumita Y**, Blank D, Peterson A, Kodama S, Tran SD*. Treating salivary gland hypofunction at both initial and advanced stages of sjogren's-like disease: a comparative study of bone marrow- versus spleen-cell therapy with a one-year monitoring period. Cytotherapy(査読有) ., vol.16(3):412-23, 2014. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.10.006. Epub 2014 Jan 9.
3. Agata H, **Sumita Y**, Asahina I, Tojo A, Kagami H*. Ischemic culture of dental pulp-derived cells is a useful model in which to investigate mechanisms of post-ischemic tissue recovery. Histol Histopathol(査読有) ., vol.28(8):985-91, 2013.
4. Xia D, **Sumita Y***, Liu Y, Tai Y, Wang J, Uehara M, Agata H, Kagami H, Fan Z, Asahina I, Wang S, Tran SD. GDFs promote tenogenic characteristics on human periodontal ligament-derived cells in culture at late passages. Growth Factors (査読有) ., vol.31(5):165-73, 2013. DOI: 10.3109/08977194.2013.830611.
5. Yoshida K, **Sumita Y***, Marukawa E, Harashima M, Asahina I. Effect of platelet-rich plasma on the bone engineering with the alloplastic substitute containing BMP2. Biomed Mater Eng (査読有) ., vol.23(3):163-72, 2013. DOI: 10.3233/BME-130741.
6. Zhong W, **Sumita Y**, Ohba S, Kawasaki T, Nagai K, Ma G, Asahina I*. *In vivo* comparison of the bone regeneration capability of human bone marrow concentrate vs. platelet-rich plasma. PLoS One (査読有) ., vol.7(7):e40833, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0040833. Epub 2012 Jul 12.
7. Uehara M*, Inokuchi T, Sano K, **Sumita Y**, Asahina I. Reconstruction of the mandible bone by treatment of resected bone with pasteurization -Long-term follow-up-. J Craniofac Surg(査読有) ., vol.23(6):1773-5, 2012. DOI: 10.1097/SCS.0b013e318266fd4c.
8. Agata H*, Yamazaki M, Uehara M, Hori A, **Sumita Y**, Tojo A, Kagami H. Characteristic difference in the composition of osteogenic cell populations of BMSCs isolated from untreated, hemolysed, or Ficoll-treated rat bone marrow. Cytotherapy (査読有) ., vol.14(7):791-801, 2012. DOI: 10.3109/14653249.2012.674639. Epub 2012 Apr 12.
9. Shiraishi T, **Sumita Y***, Wakamatsu Y, Nagai K, Asahina I. Formation of engineered bone with adipose stromal cells from buccal fat pad. J Dent Res (査読有) ., vol.91(6):592-599, 2012. DOI: 10.1177/00220345124445633. Epub 2012 Apr 26.
10. Inoue M, Ebisawa K, Itaya T, Sugito T, Ymawaki A, **Sumita Y**, Narita Y, Agata H, Kagami H*, Ueda M. Effect of GDF-5 and BMP-2 on the expression of tendo/ligamentogenesis-related markers in human PDL-derived cells. Oral Dis (査読有) ., vol.18(2):206-212, 2012. DOI: 10.1111/j.1601-0825.2011.01871.x. Epub 2011 Nov 18.
11. Uehara M*, Ikeda H, Nonaka M, **Sumita Y**, Nanashima A, Nonaka T, Asahina I. Predictive factor for photodynamic therapy effects on oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia. Arch Oral Biol (査読有) ., vol.56(11):1366-1372, 2011. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.04.012. Epub 2011 May 19.
12. Tran SD*, Redman RS, Barrett AJ, Pavletic SZ, Key S, Liu Y, Carpenter A, Nguyen HM, **Sumita Y**, Baum BJ, Pillemer SR, Mezey E. Microchimerism in salivary glands after blood- and marrow-derived stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant (査読有) ., vol.17(3):429-433, 2011. DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.09.021. Epub 2010 Dec 4.
13. **Sumita Y**, Liu Y, Khalili S, Maria OM, Xia D, Key S, Cotrim AP, Mezey E, Tran SD*. Bone marrow-derived cells rescue salivary gland function in mice with head and neck irradiation. Int J Biochem Cell Biol (査読有) ., vol.43(1):80-87, 2011. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.09.023. Epub 2010 Oct 7.
14. Tran SD*, **Sumita Y**, Khalili S. Bone Marrow Derived Cells: a potential approach for the treatment of xerostomia. Int J Biochem Cell Biol(査読有) ., vol.43(1):5-9, 2011. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.10.010. Epub

2010 Oct 28.

15. Ikeda H, **Sumita Y**, Ikeda M, Ikeda H, Okumura T, Sakai E, Nishimura M, Asahina I*. Engineering Bone Formation from Human Dental Pulp- and Periodontal Ligament-Derived Cells. Ann Biomed Eng (査読有) ., vol.39(1): 26-34, 2011.
DOI: 10.1007/s10439-010-0115-2. Epub 2010 Jul 8.
16. **Sumita Y**, Kagami H*, Honda MJ, Ueda M. Differential effects of growth/ differentiation factor-5 on the porcine dental papilla- and follicle-derived cells. Growth Factors (査読有) ., vol.28:56-65, 2010.
DOI: 10.3109/08977190903373380.
17. Tonomura A, Mizuno D, Hisada A, Kuno N, Ando Y, **Sumita Y**, Honda MJ, Satomura K, Sakurai H, Ueda M, Kagami H*. Differential effect of scaffold shape on dentin regeneration. Ann Biomed Eng (査読有) ., vol.38:1664-1671, 2010.
DOI: 10.1007/s10439-010-9910-z. Epub 2010 Jan 20.
18. Khalili S, Liu Y, **Sumita Y**, Maria OM, Blank D, Key S, Mezey E, Tran SD*. Bone marrow cells are a source of undifferentiated cells to prevent Sjogren's syndrome and to preserve salivary glands function in the non-obese diabetic mice. Int J Biochem Cell Biol(査読有) ., vol.42(11):1893-1899, 2010.
DOI: 10.1016/j.biocel.2010.08.008. Epub 2010 Aug 21.

〔学会発表〕(計5件)

1. Kawasaki T, **Sumita Y**, Agata H, Kagami H, Taran SD, Asahina I. Effect of transient hypoxic stimulation on cultured human periodontal ligament derived-cells. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR) (Yokohama, Japan), 2012年6月15日.
2. 川崎貴子、住田吉慶、懸秀樹、各務秀明、Tran SD、朝比奈泉. 虚血環境モデルとしての重度低酸素培養条件がヒト歯根膜由来細胞の生存、可塑性、分化に与える影響について. 第11回日本再生医療学会総会(横浜)2012年6月12日.
3. **Sumita Y**, Xia D, Wakamatsu Y, Kawasaki T, Liu Y, Maria OM, Khalili S, Agata H, Kagami H, Tran SD, Asahina I. Growth/differentiation factors (GDFs) maintain tendogenic characteristics of human periodontal ligament-derived cells in culture. 9th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR) (Toronto, Canada), 2011年6月15日.
4. 川崎貴子、住田吉慶、懸秀樹、各務秀明、朝比奈泉. 重度低酸素条件による歯根膜由来細胞の選択的培養の試み. 第56回日本口腔外科学会総会・学術大会(大阪)

2011年10月21日.

5. 川崎貴子、住田吉慶、若松由香、懸秀樹、各務秀明、朝比奈泉. ヒト培養歯根膜由来細胞における GDF5, GDF7 添加刺激による腱分化能の制御. 第65回日本口腔科学会学術集会(東京)2011年4月21日.

〔図書〕(計1件)

1. 住田吉慶、朝比奈泉. 歯・歯槽骨(歯槽骨の再生医療/歯の再生医療)第2節; 臓器・器官ごとの再生医療研究の動向、再生医療における臨床研究と製品開発～医工連携に向けた「自社技術」と「再生医療」の接点を探る～. 情報技術協会 2013. (総頁数; 9頁)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

住田 吉慶 (SUMITA YOSHINORI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 50456654

(2)研究分担者

朝比奈 泉 (ASAHINA IZUMI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 30221039

各務 秀明 (KAGAMI HIDEAKI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 80242866

懸 秀樹 (AGATA HIDEKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20511177

西村 正宏 (NISHIMURA MASAHIRO)

鹿児島大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・
教授
研究者番号：00294570

(3)連携研究者

()
研究者番号：