

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 4 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659359

研究課題名（和文）：歯肉中幹細胞による簡便な歯槽骨再生への挑戦

研究課題名（英文）：Selection of osteogenic progenitor cells in gingival tissue

研究代表者

西村 正宏（NISHIMURA MASAHIRO）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00294570

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は歯肉中の骨分化能をもつ細胞を採取することである。ヒト歯肉細胞はその採取部位と状況によって多様性があり、磁気ビーズ法によっても一様には分離できなかった。様々な抗体を検討する中で、CD166 が一部の歯肉細胞群と間葉系幹細胞の石灰化を促進したことから、CD166 は骨分化可能細胞の受容体に結合し、石灰化を誘導すると考えられる。磁気ビーズ法はこの細胞含有率を高めるために、相加的に作用すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this project was to discover the method to collect osteogenic cells in gingival tissues. Phenotype of human gingival cells was heterogenic, and we could not uniformly divide them by MACS. Among tested antibodies, anti-CD166 induced one of gingival cells and mesenchymal stem cells as well. Anti-CD166 might bind to the receptor of the cells which have the ability for osteogenic differentiation. MACS might show additive role for selection of these osteogenic progenitor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

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：歯肉幹細胞、骨再生、歯槽骨再生

1. 研究開始当初の背景

高齢者、歯周病患者の歯の喪失後に高度に歯槽骨（顎堤）が吸収することは、その後の歯科治療を困難にさせ、治療後の予知性を大きく低下させる。歯槽骨の高度吸収はインプラントの埋入を困難とし、義歯も不安定にさせる。最近の再生医療では、腸骨から採取した骨髄液から間葉系幹細胞を培養し、これをβ-TCP にロードして上顎洞挙上術に適応する

方法が報告されていた（文献：Shayesteh YS et al, 2008.）。しかし腸骨からの骨髄液採取は歯科医の日常業務からはかけ離れており、幹細胞の簡便な確保が歯科領域での再生医療の普及のための課題であった。そのために近年では歯の周囲組織細胞を用いた硬組織再生についての検討（Huang GT-J et al. J Dent Res, 2009, 88, 792-806）も行われていた。一方、眼科領域では口腔内の上皮細胞

を利用して角膜の再生に成功し、臨床応用も始まっていた(文献:Nakamura T et al. Br J Ophthalmol 2004, 88, 280-284.)。我々は、骨膜、骨や骨髄からの幹細胞以外にも歯肉組織には、骨に分化できる細胞が多く存在している可能性が非常に高いと考えた。近年はiPS細胞の研究が盛んに行われているが、遺伝子導入後の細胞の催奇形性、癌化などの安全性の担保は出来ていない。その点歯肉は歯科医にとって最も簡便に採取できる組織であり、遺伝子導入無しでも骨再生用の細胞ソースとして用いることが出来れば、早く・安全・確実な再生医療への応用が期待できると考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は歯肉中の骨分化能をもつ細胞を採取し、これを用いた歯槽骨再生医療を開発するための基礎的知見を得ることである。そのためには、まずヒト培養歯肉細胞のキャラクターを解析し、さらには石灰化を促進する分取方法を決定することが必要であった。

3. 研究の方法

(1)ヒト歯肉細胞のキャラクターゼーション
3名のヒトの歯肉線維芽細胞を抗生物質-抗真菌剤 (10,000U/ml penicillin G, 10,000 μ g/ml streptomycin sulfate, 25 μ g/ml amphotericinB in saline) (以下 Antibiotic-Antimycotic) (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) を最終濃度1%になるように添加した10% ウシ胎仔血清 (以下FBS) 含有Dulbecco's Modified Eagle's Medium(以下DMEM) (SIGMA, St. Louis, MO) を用いてにて37°Cで5% CO₂気相下にて培養し、最大5継代まで増殖させた。コンフルエントに達した後、各細胞をAccutaseにて分散させ、0.5% HSA (Human serum albumin) / PBSに懸濁した。0.5% HSA / PBS+4%パラホルムアルデヒドで固定後、CD29, CD74, CD90, CD146, CD166 に対する抗体により標識し、FACSにて陽性率を解析した。CD29, CD74 およびCD146 はそれぞれの一次抗体に対してFITC標識の2次抗体をそれぞれ用いた。CD90 と CD166 はFITC標識された一次抗体を用い、FACS Cantoにて蛍光強度を分析した。

(2)磁気分離システム(MACS)による細胞分離と分離細胞の解析

各細胞をAccutaseにて分散させ、0.5% HSA (Human serum albumin) / PBSに懸濁した状態で上記の一次抗体を添加した。2次抗体として、磁気ビーズを結合させた抗体を反応させ、これらの細胞をMACSのMSカラムに通して、結合細胞と非結合細胞を分離した。それぞれの細胞を5000cells/cm²で培養皿に播

種し、コンフルエントまで培養後、1% Antibiotic-Antimycotic, 10⁻⁸M Dexamethasone (SIGMA), 10mM β -glycerophosphate (SIGMA), および50 μ g/ml ascorbic acid 2-phosphate (SIGMA), 10% FBSを添加したMinimum Essential Alpha Medium (GIBCO BRL) の骨分化培地で培養後、一定期間後にアリザリンレッド染色により骨分化の状態を検討した。

(3)ヒト歯肉細胞株(9株)のCD166とCD146抗体陽性率による分離と分離細胞の解析
9名のヒトから分離培養した歯肉細胞を用いて、磁気ビーズで標識されたCD166およびCD146抗体を用いて歯肉細胞を分離し、MSカラムに吸着しない細胞と吸着した細胞の数を計測し、吸着した細胞数の割合を分離陽性率として算出した。

(4)CD166抗体が様々な細胞の石灰化に与える影響の検討

歯肉細胞以外にも、購入した皮膚線維芽細胞、骨髄由来間葉系幹細胞を5000cells/cm²で培養皿に播種し、CD166抗体を添加してコンフルエントまで培養し、アリザリンレッド染色により骨分化の状態を検討した。

4. 研究成果

(1)ヒト歯肉細胞のキャラクターゼーション
3名の個体由来の3株の歯肉細胞において陽性率は異なるが、CD29とCD90に強陽性細胞群と弱陽性細胞群の2群が存在することが示された(以下の図参照)。

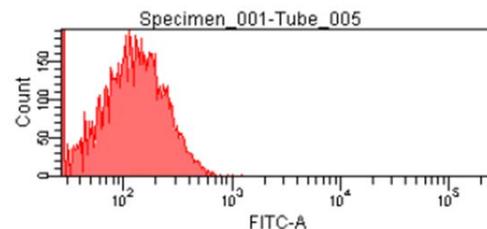
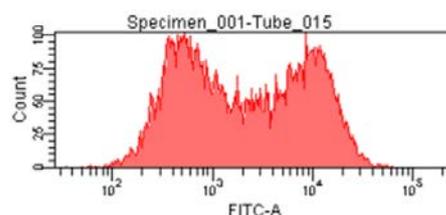
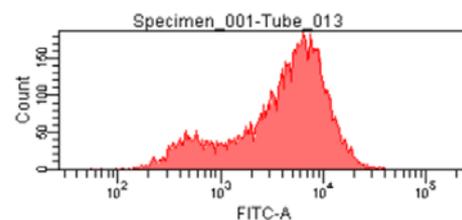


図1: 代表的なネガティブコントロール (2次抗体のみの蛍光分布)



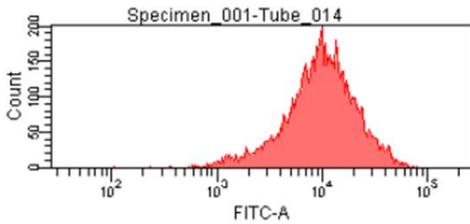


図 2: 三名の個体由来の歯肉細胞の CD29 の発現パターン

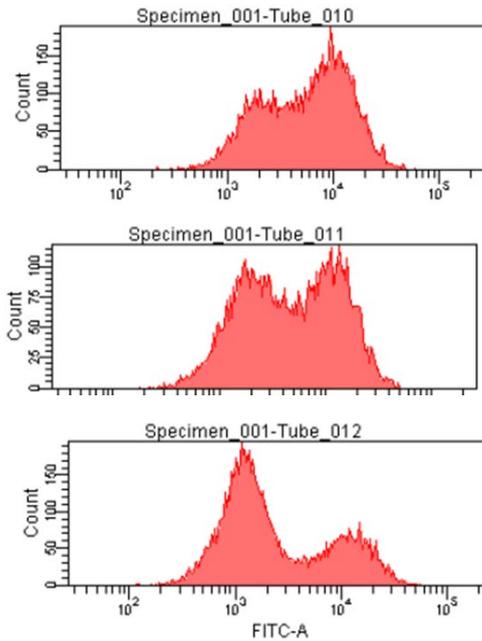


図 3: 三名の個体由来の歯肉細胞の CD90 の発現パターン

一方ヒト歯肉細胞は 3 株とも CD74 と CD146 はほぼ陰性で CD166 は弱陽性でであった(以下の図参照)。

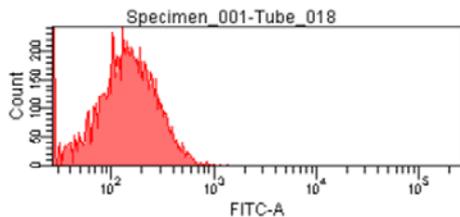


図 4: 代表的な CD74 の発現パターンで、ほぼすべての細胞が陰性 (三名の個体由来とも同様のパターンを示す)。

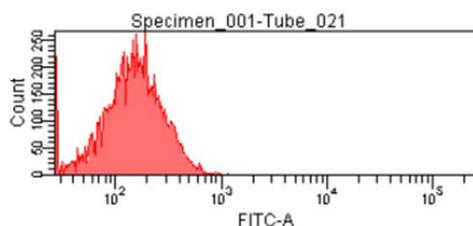


図 5: 代表的な CD146 の発現パターンで、ほぼすべての細胞が陰性 (三名の個体由来とも同様のパターンを示す)

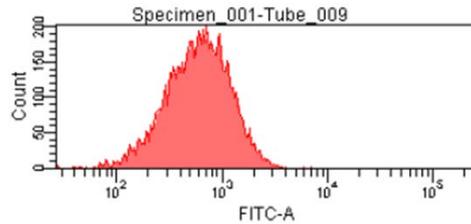


図 6: 代表的な CD166 の発現パターンで、約 7 割の細胞が陽性 (三名の個体由来とも同様のパターンを示す)。

上記の結果から、ヒト歯肉細胞はヘテロジナスな細胞集団であり、採取の方法によってその集団は大きく異なることが示された。

(2) 磁気分離システム (MACS) による細胞分離と分離細胞の解析

ヒト歯肉細胞を (1) と同様の抗体を用いて MACS によって分離したところ、CD 29, CD 90, CD 166 の陽性率は、FACS のそれよりも低かった。そして分離した細胞を培養継続し、コンフルエントに達した後に骨分化誘導培地で培養したところ、いずれの抗体陽性細胞群でも明らかな石灰化は認められなかった。以前の研究結果では CD166 陽性細胞群は高い石灰化を示していたが、今回の細胞株では同様の現象が認められなかったため、このパラツキは歯肉細胞のヘテロジェニシティに依るものであることが示唆された。そこで細胞株をさらに増やして検討することとした。

(3) ヒト歯肉細胞株 (9 株) の CD166 と CD146 抗体陽性率による分離と分離細胞の解析次に、異なる 9 株のヒト歯肉細胞を磁気ビーズ付きの CD166 と CD146 抗体で標識して MACS により分離し、分離陽性率を算出した。その結果、CD166 抗体では比較的安定して 1.7%~4.1% の割合で陽性細胞が得られたが、CD146 抗体では 2.2%~56.4% とその陽性率には大きな差が認められた (以下表 1 参照)。(1) で行った FACS での解析同様、歯肉細胞の株によって CD146, CD166 による分離陽性率も大きく異なることが示された。

個体番号	A	B	C	D	E	F	G	H	I
CD166	3.0	2.2	1.7	4.1	3.6	4.1	2.4	1.6	2.8
CD146	9.6	3.1	6.9	5.9	2.1	56.4	-	2.2	4.9

表 1: 異なる 9 名由来の歯肉細胞 (A~I) の CD166 と CD146 抗体を用いて分離した細胞の

分離陽性率 (単位: %).

(4)CD166 抗体が様々な細胞の石灰化に与える影響の検討

上記の方法で分離した細胞を 5000cells/cm² で培養皿に播種し、継続培養後、骨分化誘導したところ、1 株で明らかにCD166 陽性細胞群が、陰性細胞群に比べて強い石灰化を示した。同様の実験をCD146 抗体を用いて行ったが、明らかな差は認められなかった。一方、CD166 の抗体を添加するのみで、MACSで分離しない細胞群でも比較的強い石灰化を示した(図7)。

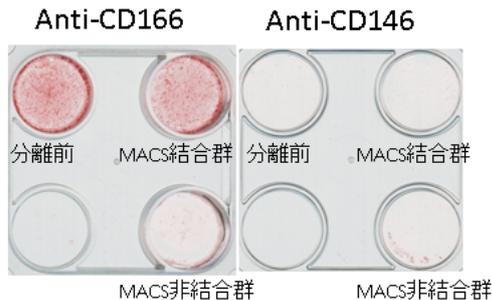


図7: 個体番号1の歯肉細胞のCD166とCD146抗体を添加した細胞群(分離前)と、MACSにて分画し、結合した細胞群(MACS結合群)および結合しなかった細胞群(MACS非結合群)を4週間骨分化培養した後のアリザリンレッド染色像。

そこで次に、CD166抗体が歯肉線維芽細胞の石灰化を特異的に促進するのかを確認するため、骨髄由来間葉系幹細胞と皮膚由来の線維芽細胞に対して、CD166抗体添加による石灰化の促進効果を確認した。その結果、CD166抗体添加は皮膚由来線維芽細胞の石灰化には影響を与えず、骨髄由来間葉系幹細胞の石灰化は促進した。

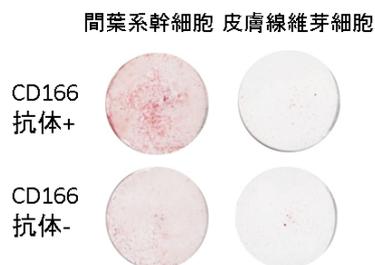


図8: 間葉系幹細胞と皮膚線維芽細胞をCD166抗体を添加あるいは非添加状態でDMEM含有の骨分化培地で2週間培養後のアリザリンレッド染色像。

これは1998年のBruderらの結果と一致する。つまり、CD166抗体は骨芽細胞に分化する能力をもつ細胞のCD166受容体に結合し、特異

的に石灰化を誘導すると考えられる。そして9株の歯肉線維芽細胞のうち1株には骨芽細胞に分化しうる細胞が多く含まれており、CD166抗体によって何らかのシグナルが伝わって、この細胞を骨分化誘導したと考えられる。MACSはこの細胞含有率を濃縮するために、さらに有効な手段となったと考えられる。つまり、ヒト歯肉細胞には株によってバラツキはあるが、CD166抗体によって骨分化可能細胞が分取でき、CD166抗体自身が相加的にその細胞の骨分化能を高めることができることが判明した。しかしながら口腔内のどの部位の歯肉をどのように分離した場合に最も骨分化可能細胞が多く培養できるのかは、本研究を臨床へ展開する際の課題となる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.geocities.jp/prosth2/Nishimuragaiyou.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 正宏 (NISHIIMURA MASAHIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号: 00294570

(2) 研究分担者

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

末廣 史雄 (SUEHIRO FUMIO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 40524781

(3) 連携研究者

なし