

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 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：32667

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659384

研究課題名（和文）

幹細胞分化再生上皮・骨による人工歯肉の作製

研究課題名（英文）

Artificial gingival composed by regenerated epithelia and bone from stem cells

研究代表者

八重垣 健 (YAEGAKI KEN)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：40166468

研究成果の概要（和文）：口腔角化上皮幹細胞は組織の恒常性維持、創傷治癒、再生などで重要な役割を果たす。その一方、この細胞を分離・分析するのは難しく研究は進んでいない。本研究の目的は、先ず、磁石付抗体を用い口腔角化上皮幹細胞を分離分析することにある。口腔角化上皮細胞は、ヒトの角化口腔粘膜から採取し CD71 と $\alpha 684$ integrin をマーカーに上記の磁石を用い分離した。CD44H, Nestin, Nanog, Oct 3/4, CD117 の異なる幹細胞マーカーが、免疫染色にて確認された。 $\alpha 684$ pos CD71neg 分画の口腔粘膜形成能も検討した。その結果、3 種類の分画： $\alpha 684$ pos CD71neg, $\alpha 684$ pos CD71pos, $\alpha 684$ neg が得られた。 $\alpha 684$ pos CD71neg 幹細胞分画は Oct 3/4, CD44H, cytokeratin 19 に陽性で Nanog, Nestin, CD117 には陰性であった。 $\alpha 684$ pos CD71pos 分画、 $\alpha 684$ neg 分画は全ての幹細胞マーカーに陰性であった。 $\alpha 684$ pos CD71neg 分画は人工歯肉上皮の再生が可能で、層状に上皮が形成された。cytokeratin 19 と involucrin の発現状況はヒト歯肉上皮のそれと一致した。さらに、この磁石システムは口腔角化上皮幹細胞研究には重要なツールと考えられた。

研究成果の概要（英文）： Although oral keratinocyte stem cells play a key role in tissue homeostasis, wound healing, and neoplasia, they remain difficult to identify and characterize. The specific aim of the present study is to characterize an oral keratinocyte stem-cell population separated using a magnetic technique. Oral human keratinocytes obtained from keratinized oral mucosa were magnetically separated using a proliferation-related marker, CD71 and $\alpha 684$ integrin. The expression of different stem cell markers: CD44H, Nestin, Nanog, Oct 3/4, CD117 was checked by immunofluorescence. The ability of $\alpha 684$ pos CD71neg fraction to form oral epithelial equivalents was also assayed. Three different oral keratinocyte subpopulations were obtained following magnetic separation: $\alpha 684$ pos CD71neg, $\alpha 684$ pos CD71pos and $\alpha 684$ neg. Our $\alpha 684$ pos CD71neg stem cell fraction was positive for Oct 3/4, CD44H and cytokeratin 19 while Nanog, Nestin and CD117 expression was absent. At the same time, the other two cell fractions $\alpha 684$ pos CD71pos and $\alpha 684$ neg were negative for all stem cell markers. Also, $\alpha 684$ pos CD71neg fraction was able to regenerate a well stratified and organized oral epithelial equivalent. The distribution of cytokeratin 19 and involucrin in the oral epithelial equivalent reflected the in vivo situation in oral gingival epithelium. It is also suggested that a magnetic system may be an important tool in acquiring oral keratinocyte stem cells for research.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	540,000	3,340,000

研究分野：歯周病

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：上皮、幹細胞、角化細胞、上皮、インテグリン、CD71

1. 研究開始当初の背景

歯周病 *in vitro* 研究では通常、培養細胞のみの使用で *in vivo* からかけ離れている。そのため幹細胞を含む人工歯肉の実験モデルを必要とするが未だ確立されていなかった。一方、現在の歯周再生医療は、歯科学の最先端臨床・研究ながら歯肉上皮の *in vitro* 再生は不可能であった。再生医療のためかつて開発された人工歯肉上皮は、幹細胞を含まず再生力に乏しいため臨床応用には失敗している。そのため歯肉欠損に対しては、外科的侵襲の大きい遊離歯肉移植あるいは悪性化の可能性が極端に高まる幹細胞移植以外に手段は無かった。

さらに、歯肉上皮幹細胞には特異的マーカーが無く分離が難しいため幹細胞の分離・純粋培養した報告は少なかった。そこで本研究ではヒト歯肉幹細胞から人工歯肉上皮を作製した。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト歯肉バイオプシー（2×2 mm 大）から、基底細胞マーカーである $\alpha_6\beta_4$ インテグリン、また幹細胞は Cell Cycle の遅く transferrin receptor CD71 が欠如するため、これらの性質から抗体固定化磁気ビーズを用いて上皮幹細胞を分離する。下図のよう

に予備実験にて $\alpha_6\beta_4$ 陽性 CD71 陰性分画（幹細胞分画）を得たが、幹細胞マーカー（*印）陽性、上皮細胞マーカー（#印）陰性を確認した（未発表）。しかし proliferation の速い培養プロトコルへの改善が必要で、初年度はこの培養技術を確立する。2年度は歯肉線維芽細胞上で、3年度は再生骨上で3次的に歯肉上皮を再構築する。

3. 研究の方法

歯肉バイオプシーから上皮を分離し Primary Culture を無血清培地にて作製する。mouse monoclonal integrin $\alpha_6\beta_4$ antibody を作用させた後、2次抗体として抗体固定化磁気ビーズ goat anti-mouse IgG MicroBeads 作用させる。そして MACS® Separator で磁気 sorting し、 $\alpha_6\beta_4$ 陽性細胞を得る。次に、この分画から CD71 陰性細胞を分離し、 $\alpha_6\beta_4^{pos}$ CD71^{neg} 分画得て、p63 抗体や keratin 19 抗体、involucrin 抗体そして keratin 10 抗体などを用い純粋な Stem Cell 分画であることを確認する。Colony forming 等々の Stem Cell 機能も確認する。その後、Transwell system を応用して、biopsy から得た歯肉線維芽細胞上に、Stem Cells を播種し人工歯肉形成を行う。上皮形成に成功した後は、線維芽細胞 Stem Cells から骨芽細胞を分化させ

再生骨を作成した上に、同上の人工歯肉を作成する。以上から革新的な歯周再生医療法と歯周病実験モデルを完成する。

(1) Primary keratinocytes の分離と培養

歯肉上皮は智歯抜歯あるいは、その他の口腔外科手術時に余剰歯肉を採取する。組織を PBS で十分に洗浄した後、メスにて可及的に細片化して 4mg/mL Dispase II (Sigma, St. Louis, MO, USA) と 3mg/mL Collagenase (Sigma, St. Louis, MO, USA) 中 4°C で保存する。24 時間後、上皮は結合組織より剥離し浮遊するので、これを採取し 0.05% trypsin で 30 分 37°C インキュベーションする。得た細胞を 1.2mM calcium、EpiLife® Defined Growth Supplements (EDGS) (Cascade Biologics, Portland, OR)、0.250 µg/mL Fungizone、0.250mg/mL Kanamycin を加えた EpiLife® medium (Cascade Biologics,) 中に浮遊させ、35 mm diameter dishes pre-coated with human collagen type IV (20 µg/mL) (Sigma, St. Louis, MO, USA) で 36°C、5%CO₂ でインキュベーションする。

(2) Magnetic cell sorting と免疫染色

細胞を mouse monoclonal integrin alpha 6 beta 4 ($\alpha_6\beta_4$) [450-30A] FITC-conjugated antibody (Abcam) とインキュベート後、抗体固定化磁気ビーズ goat anti-mouse IgG MicroBeads (Miltenyi Biotec Inc., CA, USA), とインキュベートして MACS® Separator (Miltenyi Biotec Inc., CA, USA) のカラムに注入する。the $\alpha_6\beta_4$ negative ($\alpha_6\beta_4^{\text{neg}}$) 分画と $\alpha_6\beta_4$ positive ($\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$) 分画に分離後 3 日培養し、 $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ 分画を CD71 MicroBeads にて CD71 positive (CD71^{pos}) 分画と CD71 negative (CD71^{neg}) に分ける。cell sorting については、現在 CD71 以外も検索中

である。その結果 $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{neg}、 $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{pos}、 $\alpha_6\beta_4^{\text{neg}}$ の 3 分画が得られ、 $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{neg} 分画が stem-cell 分画である。これらの 3 分画について、keratinocyte stem cell markers である p63 と keratin 19、そして keratinocyte differentiation marker、involucrin と keratin 10 の免疫染色を行う。

(3) Flow cytometry

Primary culture を $\alpha_6\beta_4$ integrin 抗体で 1 時間室温に置き Alexa Fluor® 568-conjugated 2 次抗体を作用させ Flowcytometer にて陽性細胞数をカウントし Stem cell population を概算する。また、Guava EasyCyte flow cytometry (Guava Technologies, USA) にて生細胞数を毎回確認する。

$\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{neg} 分画について Guava® Cell Cycle reagent (Guava Technologies, USA) を用い Flowcytometer にて G0/G1、S、G2 を同定し分裂期にある細胞数を算出する。

(4) 人工歯肉の作製

人工歯肉は、人工皮膚作成実験のため確立された Transwell system (Transwell® Permeable supports, Costar Life Sciences, NY, USA) を応用する。これには、予め 1 well 1 あたり 5X10⁴ 個の歯肉線維芽細胞 (Primary keratinocytes の分離の採取し通法により培養) を含むコラーゲンを敷き、DMEM with 10% FBS で 7 日間培養する。その後、5 X 10⁴ oral keratinocyte stem cells ($\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{neg} 分画) を播種する。そして EpiLife® medium 中で 4 日間培養したのち、培養上皮組織を液面上まで引き上げる (ゲル部は液面に接触した状態)。そして 10 日間培養を行い HE 染色や免疫染色にて形態・機能を観察する。

(5) Osteoblast differentiation

歯肉線維芽細胞から「Primary keratinocytes の分離と培養」に記載した方法に準じ、CD44、CD90、CD166 陽性細胞を得る。現在、申請者らにより開発が終わった新たな無血清培地に 50 μ g/mL Vit. C, 10nM dexamethasone, 10mM β -glycerophosphate を添加して骨芽細胞を分化・石灰化を Transwell 中で行う（細胞数は well あたり 1×10^4 ）。その後、上記「*ex vivo* Produced oral mucosa equivalent」に記載した方法で人工歯肉を作成し、形態観察を行う。

4. 研究成果

(1) Primary keratinocytes の分離と培養

ヒト歯肉バイオプシーから上皮層を分離培養し、mouse monoclonal integrin alpha 6 beta 4 ($\alpha_6\beta_4$) antibody、抗体固定化磁気ビーズ goat anti-mouse IgG MicroBeads を用い MACS[®] Separato にて $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ 分画を得た。integrin alpha 6 beta 4 は基底細胞に特異的であり、基底細胞画分を得た。次に CD71 MicroBeads にて CD71 positive (CD71^{pos}) 分画と CD71 negative (CD71^{neg}) 分画を得たが、CD71 は細胞周期の早い細胞に陽性で、陰性の場合、細胞周期が遅い (G_0/G_1) 細胞が多いと考えられる。すなわち幹細胞である。そこで $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{neg} 分画が stem-cell 分画である可能性が高いことを確認した。 $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{neg} 分画が目的の stem-cell 分画であった。すなわち keratinocyte stem cell markers の p63 と keratin 19 に陽性であった。Primary culture を $\alpha_6\beta_4$ integrin 抗体で標識して、Alexa Fluor[®] 568-conjugated 2 次抗体を作用させ Flowcytometer にて陽性細胞数をカウントした。その結果 Stem cell population が概算でき、 $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ 分画は 8%

程度であった。その結果、3 種類の分画： $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{neg}, $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{pos}, $\alpha_6\beta_4^{\text{neg}}$ が得られた。 $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{neg} 幹細胞分画は Oct 3/4, CD44H, cytokeratin 19 に陽性で Nanog, Nestin, CD117 には陰性であった。 $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{pos} 分画、 $\alpha_6\beta_4^{\text{neg}}$ 分画は全ての幹細胞マーカーに陰性であった。

(2) Cell cycle

$\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{neg} 分画には $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{pos} 分画より多くの休止期細胞 (G_0/G_1 phase) があり (65.9 ± 1.1 vs. 51.8 ± 0.6 , $p < 0.01$; ANOVA test)、活動期の細胞も $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{neg} 分画より $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{pos} 分画に多かった (S phase: 24.4 ± 0.5 vs. 16.16 ± 0.2 , $p < 0.01$; G_2/M phase: 20 ± 1.4 vs. 10.18 ± 0.5 , $p < 0.01$)。すなわち CD71 は細胞周期の早い細胞に陽性で、陰性の場合、細胞周期が遅い (G_0/G_1) 細胞が多く、幹細胞と考えられる。すなわち $\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{neg} 分画が stem-cell 分画である可能性が高いことを確認した。

(3) 人工歯肉の作製

Transwell system (Transwell[®] Permeable supports, Costar Life Sciences, NY, USA) に、1 well 1 あたり 5×10^4 個の歯肉線維芽細胞 (上述) を含むコラーゲンを敷き、DMEM with 10% FBS で 7 日間培養した。その後、 5×10^4 oral keratinocyte stem cells ($\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{neg} 分画) を播種して、EpiLife[®] medium 中で 4 日間培養した。すなわち培養上皮組織を液面上まで引き上げ空気に曝露し上皮形成を試みたところ、上皮生成物が観察できた。

(4) 硫化水素の影響

$\alpha_6\beta_4^{\text{pos}}$ CD71^{neg} 分画に 50ng/mL の硫化水素を作用させたところ p53 リン酸化に始まるアポ

トーンシス発生が確認された。

(5)人工骨上での上皮再生

ヒト歯髄幹細胞より、骨芽細胞を分化誘導して、3次元での骨形成を試みた。さらに、再生骨上での上皮再生をめざし、上述の得られた人工歯肉を載せ生着を試みたが再生には成功しなかった。

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2件)

- ① Calenic B, Yaegaki K, Ishkitiev N, Kumazawa Y, Imai T, Tanaka T.
p53-Pathway activity and apoptosis in hydrogen sulfide-exposed stem cells separated from human gingival epithelium. J Periodontal Res. 2013 48:322-330.
- ② Calenic B, Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Kumazawa Y, Nasu M, Hirata T.
Magnetic separation and characterization of keratinocyte stem cells from human gingiva. J Periodontal Res. 2010;45:703-708.

[学会発表] (計2件)

- ① Calenic B, Yaegaki K, Greabu M, Didilescu A Oral keratinocyte stem cells and oral epithelial equivalents, The 45th Meeting of Continental European Division of IADR, Budapest, Hungary, September 1-3, 2011
- ② Calenic B, Okamura K, Yaegaki K, Tovar S, Apoptosis markers in oral lichen planus The 58 General Session of

Japanese Association for Dental Research (IADR Japanese Branch),
Kokura, Japan, November 27-28, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八重垣 健 (YAEGAKI KEN)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：40166468