

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：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791780

研究課題名（和文） 再生医療研究のための新規ヒト歯髄幹細胞マーカーの特定と歯髄内局在の解明

研究課題名（英文） Identification and localization of new human pulpal stem cell markers for regenerative medicine studies

研究代表者

小林 朋子（KOBAYASHI TOMOKO）

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：10548283

研究成果の概要（和文）：ヒト歯髄幹細胞の多分化能に関連する適切なマーカー遺伝子候補を探索するため、単一歯髄由来初代培養細胞より単離した 50 クローンを長期間継続培養し、各クローンの分化能と網羅的遺伝子発現を関連付けて解析した。石灰化能と軟骨分化能、脂肪分化能を有するクローンは、石灰化能と軟骨分化能があり脂肪分化能がないクローンに比べ、細胞周期や細胞分裂関連の遺伝子集団の発現が高かった。発現の高かった遺伝子の中からマーカー遺伝子候補が見つかることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Fifty clones derived from human dental pulp cells in primary culture were incubated for a long period until they senesced. Gene expression profiles were analyzed between representative 2 clones which had different differentiation capacities each other. One clone exhibiting osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation abilities displayed high expression of cell cycle- and cell division-relating genes compared with another clone with osteogenic, chondrogenic but not adipogenic differentiation abilities. New candidate genes for identifying human dental pulp stem cells may be included within the range of cell cycle- and cell division-relating genes and their transcriptional factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	200,000	60,000	260,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、形態系基礎歯科学

キーワード：マイクロアレイ、細胞・組織、再生医学、歯学、成体幹細胞

1. 研究開始当初の背景

体性幹細胞は様々な組織から分離されており (Koyama *et al.* J Oral Maxillofac Surg. 2009 (67) 501-6)、2000年には歯髄幹細胞の存在が報告されている (Gronthos *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 2000 (97) 13625-30)。

歯髄幹細胞は歯科治療時に本来廃棄される抜去歯を利用するため、理想的な再生医療リソースとして実用性が期待されている。歯髄幹細胞は高い増殖力と多分化能を持ち (Sloan *et al.* Int J Paediatr Dent. 2009 (19) 61-70)、再生医療応用へ向けた研究は現在までに数多く報告されている。実験動物では、歯への移植や (Iohara *et al.* Regen Med. 2009 (4) 377-85) 歯以外の組織への移植も行われてきた (Miura *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 (100) 5807-12)。

研究開始当初より、想定上の歯髄幹細胞のマーカーとして使用されてきたのは、骨髄や血管周囲細胞等のマーカーとして発見された CD44、CD106、CD146、3G5、STRO-1 等であるが (Shi *et al.* Orthod Craniofac Res. 2005 (8) 191-9)、適切な歯髄幹細胞マーカーは未だ決定されていない (Iohara *et al.* Stem Cells. 2006 (24) 2493-503)。このため、歯髄幹細胞の分離には蛍光色素の染色性の違いや他組織由来のマーカー、コロニー形成能等が利用されている (Iohara *et al.* Regen Med. 2009 (4) 377-85, Honda *et al.* Int Endod J. 2007 (40) 949-58, Laino *et al.* J Craniofac Surg. 2006 (17) 511-515, Gronthos *et al.* J Dent Res. 2002 (81) 531-5)。しかし、コロニー形成能を持

つ歯髄細胞から歯髄幹細胞として単離培養された細胞クローン間でも象牙質形成能に差異があることを示した報告もあり (Gronthos *et al.* J Dent Res. 2002 (81) 531-5)、crude な歯髄細胞から幹細胞として高度に純化し分離された細胞集団であっても、ヘテロな細胞集団である可能性がある。適切な歯髄幹細胞の分離法を開発するためには、まず適切な歯髄幹細胞マーカーを特定することが必要不可欠である。

2. 研究の目的

当研究室では、歯髄細胞から分離培養された多数のクローンを解析した結果、クローン間で増殖力や多分化能に差異があることを確認しており、歯髄幹細胞として分離された細胞クローンの中にも、増殖力が高く多分化能を持つ“幹細胞様クローン”と、増殖力が低く多分化能のない“非幹細胞様クローン”がある可能性をつかんでいた。歯髄から幹細胞を分離するために現在よりもさらに的確な方法を確立すれば、再生医療の治療効率を高め、再生医療研究の進展に貢献できると考えられる。そのためには、幹細胞と“非幹細胞”の差異を解析して明らかにすることにより適切な歯髄幹細胞マーカーを特定することが必要であると考えた。

そこで本研究は、ヒト成体歯髄初代培養細胞由来の幹細胞様クローンと非幹細胞様クローンを比較して DNA マイクロアレイで網羅的遺伝子発現解析を行い、幹細胞マーカーを特定すること、さらにその局在を

歯髄組織内で解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯髄細胞のクローニング

11歳女性埋伏智歯由来初代歯髄細胞を100mm dishに200個撒き、10日間インキュベートした。完全に孤立したコロニーを50個単離して長期間継続培養し、細胞集団倍加数(Population doubling levels: PDL)を算出した。播種時の単個細胞率は97%以上であった。

(2) 歯髄細胞の分化誘導

歯髄細胞を石灰化誘導培地、軟骨分化誘導培地、脂肪分化誘導培地で培養し、各分化誘導を行った。石灰化能をalizarin red S染色、軟骨分化能をAlcian blue染色、脂肪分化能をoil red OとNile blue染色で評価した。また、石灰化誘導した細胞表面のカルシウムとリンの蓄積をelectron probe microanalysisで調べた。

(3) Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

石灰化、軟骨分化、脂肪分化誘導した細胞からtotal RNAを抽出し、TaqMan® gene expression assaysで*Bone sialoprotein II (BSP II)*、*Lipoprotein lipase (LPL)*、*Collagen type X alpha 1 (COL10A1)*の発現を解析した。内在性遺伝子は*eukaryotic 18S rRNA*とした。

(4) 網羅的遺伝子発現解析

Total RNAよりDNAマイクロアレイ(Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST Arrays)で網羅的遺伝子発現を測定し、the Ingenuity pathway analysis (IPA)

とThe Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)で解析を行った。

4. 研究成果

(1) 歯髄由来初代培養細胞の分化能

歯髄由来初代培養細胞の分化能を解析するため、クローニングしていない初代培養細胞集団(約16PDL)を石灰化、軟骨分化、脂肪分化誘導培地で培養した。石灰化誘導した細胞は、alizarin red S染色が陽性であり、electron probe microanalysisにてカルシウムとリンの沈着が測定された。また、石灰化関連遺伝子の*BSP II*の発現が対照群に比べて高かった。

軟骨分化誘導は、単層培養法とペレット法の両方で検討したところ、どちらの培養法においても、細胞外基質のムコ多糖類がAlcian blueで強く染色された。また、軟骨分化関連遺伝子の*COL10A1*の発現が対照群に比べて高かった。

脂肪分化誘導した細胞では、oil red OおよびNile Blue染色が陽性となった。また、脂肪分化関連遺伝子の*LPL*の発現が対照群に比べて高かった。

以上より、歯髄由来初代培養細胞はcrudeな細胞集団として石灰化、軟骨分化、脂肪分化の多分化能を有することが確認された。

(2) 歯髄細胞由来クローンの培養初期の分化能

歯髄由来初代培養細胞より得たクローンの培養初期の細胞(約24PDL)を石灰化および脂肪分化誘導培地で培養し、分化能を解析した。

その結果、歯髄細胞由来クローンには、多

分化能を有する幹細胞様クローンや、より限定された分化能を持つ前駆細胞様クローンなど様々なステージのものがあることが判明した。また石灰化や脂肪分化誘導をしても分化しないクローンも存在した。

さらに、各クローンの分化能と、分化誘導開始から固定までの日数との関係を解析したところ、①分化誘導開始からの日数が長いほど石灰化が進む傾向があること、②脂肪分化しないクローンは、分化誘導開始からの日数が長くても脂肪を蓄積しないことがわかった。

(3) 歯髄細胞由来クローンの分化能の維持

各クローンを継続培養し、培養初期（約24PDL）と長期培養後（40PDL以上）とで分化能を評価し、石灰化能と脂肪分化能の長期保持能力について解析した。その結果、本研究で単離した50クローンの中には、①石灰化能と脂肪分化能をともに長期にわたって維持したクローンがあった。②石灰化能のみを長期にわたって維持したクローンがあった。③脂肪分化能のみを長期間維持したクローンはなかった。④石灰化能と脂肪分化能がともに長期間陰性のクローンもなかった。

(4) 歯髄細胞由来クローンの自発的分化

培養初期（約24PDL）には、各クローンの石灰化または脂肪分化の対照群はすべてalizarin red S染色またはoil red O染色に陰性であった。一方、長期培養後（40PDL以上）に分化能を解析したクローンの中には、対照群でもalizarin red S染色やoil red O染色に陽性のものがみられた。脂肪分化の対照群でoil red O染色に陽性になったクローンの方が、石灰化でalizarin red S染色に陽性になったクローンよりも多かつ

た。このことは、歯髄細胞では長期培養下において老化による細胞変性が起こることを示唆しているが、今後さらなる検討が必要である。また、老化の影響を受けていないクローンだけを考慮しても、多分化能を長期にわたり維持するクローンがあることが判明した。

(5) 歯髄細胞由来クローンの軟骨分化能の解析

石灰化能と脂肪分化能を解析した歯髄由来クローンの中から、“①石灰化能と脂肪分化能をともに長期にわたって維持したクローン”と“②石灰化能のみを長期にわたって維持したクローン”を1つずつ選出した。これら2つのクローンについて、新たに軟骨分化能の評価も行った。軟骨分化能の評価には、比較的手技が平易で短期間で結果が得られる単層培養法を採用した。その結果、①のクローンも②のクローンも軟骨分化能を有していた。

(6) 歯髄細胞由来クローンの網羅的遺伝子発現解析

今回用いたクローンはそれぞれ一個の細胞由来であるため、クローン内の細胞同士はほぼ同じ遺伝子発現プロファイルを呈していると考えられる。性質の異なる細胞集団同士の網羅的遺伝子発現データを比較する場合、クローン化した細胞集団同士を比較すれば、クローニング前の混合細胞集団同士を比較するより遺伝子発現プロファイルのばらつきを軽減できるため、精度の高いデータを得ることができる。本研究で用いた各クローンは単一歯髄由来であるため、性質の異なるクローン同士の網羅的遺伝子発現データを比較すれば、共通の遺伝的背景を持ち発現系だけが異なる高精度なデー

タとなり、適切なマーカー候補分子の選定が可能になると考えられる。クローニング前の混合細胞集団ではなくクローン化した細胞を用いることで、高精度な遺伝子発現データ解析を可能にすることが本研究の特色である。

そこで、上記(4)の“①石灰化能と軟骨分化能、脂肪分化能を長期間維持するクローン”と、“②石灰化能と軟骨分化能を長期間維持するクローン”の網羅的遺伝子発現の相違をDNAマイクロアレイで比較解析した。その結果、“①石灰化能と軟骨分化能、脂肪分化能を長期間維持するクローン”は“②石灰化能と軟骨分化能を長期間維持するクローン”と比べて、幹細胞維持や細胞周期ならびに細胞分裂関連遺伝子の発現が高かった。特に変動が大きかった遺伝子群とそれらを制御する転写因子は、歯髄幹細胞の新規マーカー候補となる可能性がある。今後、遺伝子の強制発現や発現抑制試験を行い分化能との関連を検討することにより、多分化能に関連する適切なマーカーとなる候補遺伝子の絞り込みを行う予定である。

本研究では、歯髄細胞由来クローンを用いて、多分化能に関連する遺伝子集団の解析を行った。それとともに、各クローンの培養初期および長期培養後の分化能を評価することにより、歯髄細胞の多分化能の維持や自発的分化についても解析を行った。このため、多分化能に関連する遺伝子集団から適切なマーカー候補遺伝子を絞り込む実験の実施には至らなかった。

本研究の課題名は「再生医療研究のための新規ヒト歯髄幹細胞マーカーの特定と歯髄内局在の解明」であり、申請当初の目的では、マーカー候補となる遺伝子・タンパク質の歯髄内での局在も解析する予定であっ

たが、マーカー候補遺伝子の絞り込みには至らなかったため、歯髄内での局在の解析は行えなかった。

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)

[学会発表] (計2件)

- ① Kobayashi T, Torii D, Tsutsui TW, Tsutsui T. Isolation of clonal dental pulp cells with different differentiation potentials. The 91st General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. March 22 2013. Washington State Convention Center, Seattle, U.S.A..
- ② 小林朋子、鳥居大祐、筒井健夫、肖黎、筒井健機. 培養ヒト歯髄細胞クローン解析: 多分化能と増殖能. 第53回 歯科基礎医学会学術開会. 2011年10月2日. 長良川国際会議場(岐阜県).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 朋子 (KOBAYASHI TOMOKO)
日本歯科大学・生命歯学部・助教
研究者番号: 10548283