

## 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 5 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究 B

研究期間：2010～2012

課題番号：22791875

研究課題名（和文）ヒト歯根膜由来・神経堤幹細胞によるセメント質／歯根膜複合体再生法の開発

研究課題名（英文）Development of Cementum/PDL complex using human neural crest derived stem cells from PDL.

研究代表者

加来 賢 (KAKU MASARU)

新潟大学 医歯学総合病院 講師

研究者番号：30547542

研究成果の概要（和文）：本研究は歯の発生段階において重要な役割を担う神経堤由来細胞について、これを追跡可能な遺伝子改変マウスを用いて、成体歯根膜より神経堤由来幹細胞を分離し、歯根膜の再生を期すものである。歯根膜中における神経堤由来細胞の分布は間葉系幹細胞マーカーの分布とは異なるものであった。神経堤幹細胞とこれまでに報告されている間葉系幹細胞は異なる細胞集団である可能性が示唆され、歯根膜再生の新たな幹細胞源として期待されるものであった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to characterize the neural crest (NC) derived cells in adult periodontal ligament by using NC-traceable transgenic mice. Our study revealed that the distribution and prevalence of NC derived cells in adult PDL. Furthermore, the distribution of NC stem cell marker and mesenchymal stem cell marker positive cells were distinct.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：歯科補綴学、細胞生物学、組織工学

科研費の分科・細目：歯科補綴学

キーワード：神経堤幹細胞、間葉系幹細胞、歯根膜

## 1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯と歯槽骨を強固に連結するのみならず、咬合力に対する感圧、緩衝機構を担い、隣在する硬組織（歯槽骨・セメント質）の恒常性に寄与している。歯根膜はその発生過程において、神経堤由来である歯小囊、間葉と神経堤に由来する歯乳頭より分化する事が知られている。神経堤由来細胞は歯の発生段階を通じて歯根膜に豊富に存在するばかりでなく、成体歯根膜にも残存することが報告されている。

近年、歯根膜と同様に神経堤由来の組織である皮膚、小腸、心臓、角膜等において、神経堤由来の幹細胞である“神経堤幹細胞”が成体の組織から同定されていることから、同様に神経堤由来の組織である歯根膜においても神経堤幹細胞の存在が推察される。これまでに歯根膜における幹細胞については多数の報告があるが、これらは間葉系幹細胞として、間葉系幹細胞マーカー(STRO-1, C29, CD105 etc.) や colony forming unit(CFU) assay によって分離されたものであった。歯根膜組織の少

なくともその一部は神経堤に由来する事から、間葉系幹細胞のみならず、神経堤幹細胞の存在の可能性が予測される。さらに、神経堤幹細胞は間葉系幹細胞の上流に位置づけられると考えられており、多岐にわたる分化能を有することが報告されている。

上述のように、発生段階においてセメント質および歯根膜の形成に神経堤由来細胞が寄与していることから、神経堤幹細胞を発生に準じた方法で分化させることにより、セメント質/歯根膜複合体の再生が可能となることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は、神経堤由来細胞を追跡可能な遺伝子改変マウス、および神経堤幹細胞に選択的な培養法を用い、歯根膜から従来の間葉系幹細胞ではなく、神経堤幹細胞を分離、同定しようとするものである。更に分離した神経堤幹細胞を用いて次世代インプラントの実現に不可欠であるセメント質/歯根膜複合体の再生を期するものである。

## 3. 研究の方法

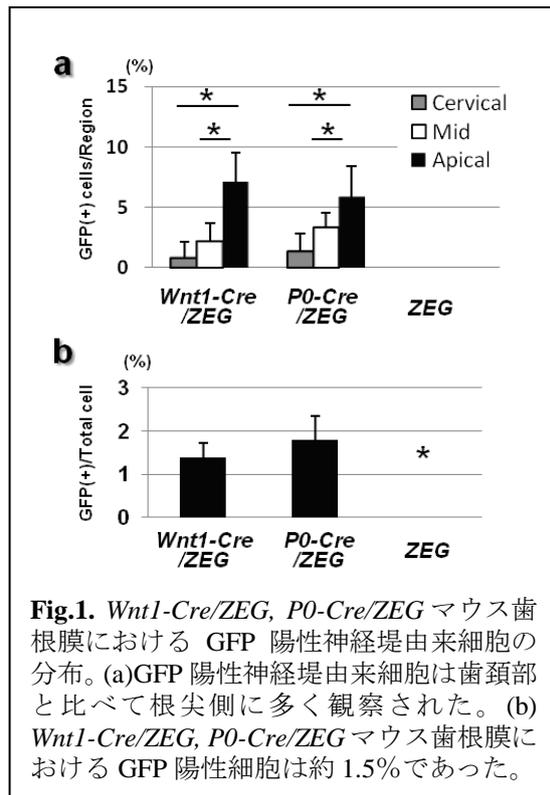
本研究では神経堤由来細胞を追跡可能な遺伝子改変マウスである *Wnt1-Cre/ZEG*, *P0-Cre/ZEG* マウスを用いた。4 週齢の *Wnt1-Cre/ZEG*, *P0-Cre/ZEG* マウス上顎より臼歯を含む歯周組織を取り出し、固定、脱灰後にパラフィン包埋組織標本を作製した。神経堤由来細胞を anti-rabbit GFP 抗体にて、神経堤細胞マーカー (*Slug*, *AP-2 alpha*, *HNK-1*, *p75NTR*, *Nestin*) 又は間葉系幹細胞マーカー (*CD29*, *STRO-1*) を mouse 由来の抗体にて標識し、多重蛍光染色を行った。核染色には DAPI を用いた。上顎第一臼歯の近心根歯根膜を観察領域とし、其々のマーカーについて陽性細胞を検出し、歯根膜の全細胞中、及び神経堤由来細胞中における陽性細胞率を算出した。GFP 陽性細胞についてはその分布について根尖側 1/3、中央部 1/3、歯頸側 1/3 においてそれぞれ計測を行った。

矯正治療のために抜歯したヒト小臼歯より歯根膜を剥離し、酵素液 (0.1% collagenase and 0.2% Dispase II in PBS) にて処理した後、遠心分離 (1,000 rpm for 10 min) にて歯根膜細胞を得た。ヒト歯根膜細胞の分離は新潟大学倫理委員会の承認を得て行った。分離したヒト歯根膜由来細胞を EGF (50 ng/ml)、FGF-2 (20 ng/ml) を添加した血清を含まない培地 (DMEM/F12, 1% penicillin/streptomycin) 中にて浮遊培養を行い、ニューロスフィアの形成を行った。培養皿には非接着性の hydrocell (CellSeed 社, Tokyo, Japan) を用いた。

## 4. 研究成果

*Wnt1-Cre/ZEG*, *P0-Cre/ZEG* マウスを用

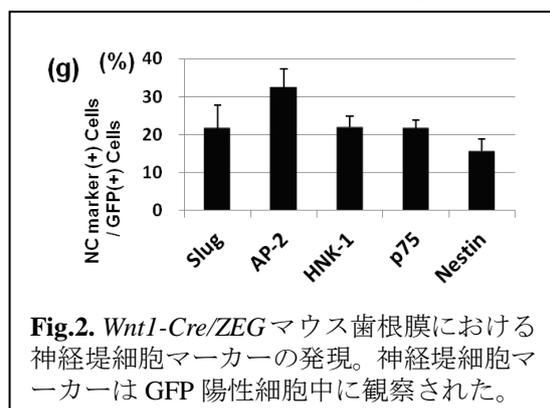
い、組織標本上にて神経堤由来細胞の歯根



**Fig.1.** *Wnt1-Cre/ZEG*, *P0-Cre/ZEG* マウス歯根膜における GFP 陽性神経堤由来細胞の分布。(a)GFP 陽性神経堤由来細胞は歯頸部と比べて根尖側に多く観察された。(b) *Wnt1-Cre/ZEG*, *P0-Cre/ZEG* マウス歯根膜における GFP 陽性細胞は約 1.5%であった。

膜中の根尖部1/3、中央部1/3、歯頸部1/3におけるの分布、更に各遺伝子改変マウスにおけるGFP陽性細胞率の解析を行った。結果をFig.1に示す。歯根膜中において、*Wnt1-Cre/ZEG*, *P0-Cre/ZEG*マウス共に約1.5%のGFP陽性、神経堤由来細胞を認めた。またGFP陽性細胞の分布は歯頸部側と比べて根尖側に多く観察された。神経堤細胞特異的なプロモーターを有さないZEGマウスではGFP陽性細胞は検出されなかった。

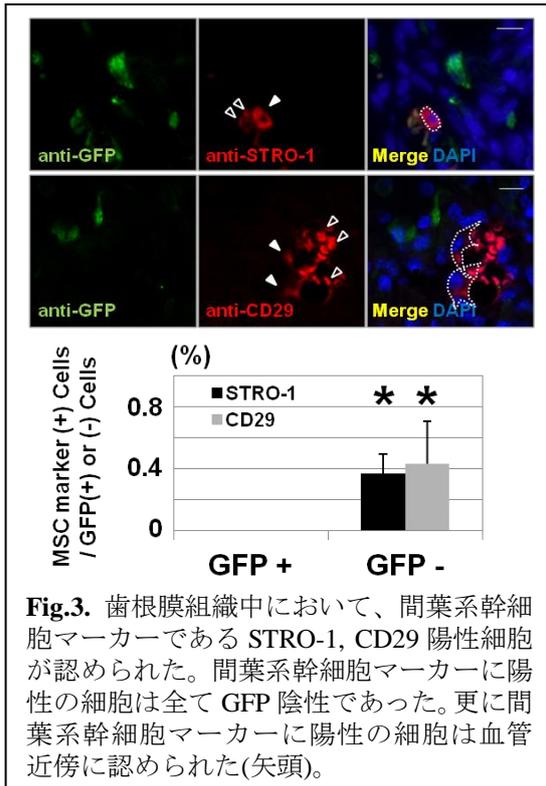
次にGFP陽性の神経堤由来細胞における神経堤細胞マーカーで(*Slug*, *AP-2 alpha*, *HNK-1*, *p75NTR*, *Nestin*)の発現について検索を行った。結果をFig.2に示す。神経堤細胞マーカーに陽性の細胞は、GFP陽性の神経堤由来細胞中のみを検出され、その陽性率はそれぞれ20~30%程度であった。神経堤細胞マーカーの中でも、*p75*,



**Fig.2.** *Wnt1-Cre/ZEG* マウス歯根膜における神経堤細胞マーカーの発現。神経堤細胞マーカーは GFP 陽性細胞中に観察された。

HNK-1, Nestinは神経提幹細胞マーカーとしても知られることから、神経提由来細胞の一部は依然として幹細胞様の性質を保持している可能性が示された。

間葉系幹細胞マーカーであるCD29, STRO-1陽性細胞は全歯根膜細胞中に対して、約0.4%検出され、過去の報告とも近い値を示した(Fig.3)。また、間葉系幹細胞マーカー陽性細胞はGFP陰性細胞中にもみ検出された。更に過去の報告にもあるように間葉系幹細胞マーカーに陽性の細胞は血管



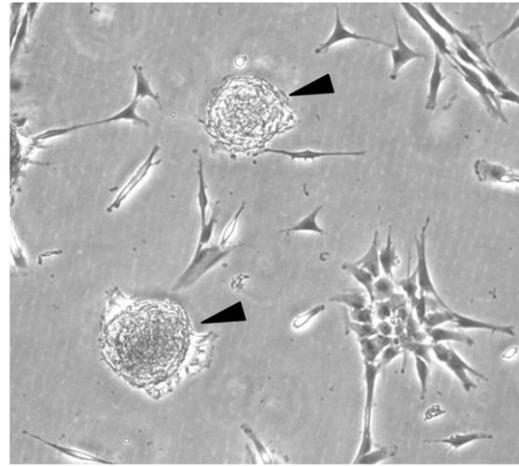
**Fig.3.** 歯根膜組織中において、間葉系幹細胞マーカーである STRO-1, CD29 陽性細胞が認められた。間葉系幹細胞マーカーに陽性の細胞は全て GFP 陰性であった。更に間葉系幹細胞マーカーに陽性の細胞は血管近傍に認められた(矢頭)。

近傍において検出された。

以上の結果より歯根膜中において神経提由来細胞が存在することが示され、この細胞群はこれまでに知られている間葉系幹細胞とは異なる幹細胞群である可能性を示唆するものであった。これらのGFP陽性細胞の幹細胞能については歯根膜より分離を行い、その多分化能について実際に検証する必要がある、現在引続き解析を行なっている。

更にヒト歯根膜由来細胞をEGF, FGF-2存在下の血清不含有培地中にてニューロスフィア法を用いて浮遊培養を試みた(Fig.4)。培養翌日には浮遊細胞塊を生じたものの、7日以上長期培養では細胞塊は生存不可能であった。EGF, FGF-2の濃度がニューロスフィアの形成効率に影響をおよぼすことが報告されていることからそれぞれ(0~100

ng/ml) の範囲内で異なる条件について、その形成能を検討した。しかしながら、増殖因子の濃度条件によるニューロスフィアの形成能、および長期生存率への影響は認められなかった。ニューロスフィア法の培養条件については、更なる培養条件の検討が



**Fig.4.** EGF, FGF-2 存在下の浮遊培養にて、ヒト歯根膜細胞からの Neurosphere の形成を認めた(矢頭)。

必要である。

ニューロスフィア法による培養が困難であったため、ヒト歯根膜細胞からの神経提幹細胞の分離に至らなかった為に、歯胚再生に関する実験は行なっていない。現在、ニューロスフィア法に代わる細胞の選択的分離法として、Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)を利用した分離法を検討している。組織標本上の解析から、神経提幹細胞マーカーであるp75, HNK-1, Nestinの発現が認められたことから、これらのマーカーを用いて細胞の分離を行う予定である。更に我々が組織標本上で検討した各種細胞マーカーを用いて、歯根膜細胞中に存在する異なる幹細胞群の特性評価について解析を行なっている。

本研究において歯根膜中において間葉系幹細胞とは異なる神経提幹細胞の存在が示唆されたが、その分離解析法には依然として明らかとすべき点が多く残されている。歯根膜におけるセメント質の再生法としては、臨床的にはGuided Tissue Regeneration (GTR)法やEnamel Matrix Derivative (Emdogain®)が用いられているが、その効果は依然として限定的である。組織再生を期す手段として、その発生過程を模倣する手段は非常に有効であるが、無細胞セメント質のようにリモデリングを行わない組織においてはその細胞源が問題となる。しかし

、セメント質には機械的刺激等に応答して2次的な有細胞セメント質を生じることがある。成体に存在する細胞源を用いての再生法としては、有細胞セメント質の生成過程を再現することが歯根膜の再生法として有効である可能性がある。

#### 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2件)

1. Kaku M, Komatsu Y, Mochida Y, Yamauchi M, Mishina Y, Ko CC; Identification and Characterization of Neural Crest-derived Cells in Adult Periodontal Ligament of Mice. Arch Oral Biol. (in press), 2012
2. Akiba Y, Tomizuka K, Kaku M, Kawasaki M, Nagasawa M, Takano R, Uoshima K: Analysis of patients visiting Niigata Medical and Dental Hospital with chief complaints of dental metal allergy and/or dental focal infection in the previous 8 years. The Indonesian Journal of Dental Research 1(2) (in press), 2011

[学会発表] (計20件)

1. Rocavado JM Rosales, Kaku M, Nozawa M, Akiba Y, Uoshima K: Osteoblastic Differentiation and Mineralization Ability of Periosteum Derived Cells *in vitro*. 新潟歯学会第2回例会, 新潟, 2011年11月12日, 抄録集: 14頁, 2011.
2. Kaku M, Nozawa M, Rocavado JM Rosales, Uoshima K. Localization of Type XII Collagen and Its Interacting Molecules in PDL at Normal and Hyper Occlusal Condition. The 7<sup>th</sup> Biennial Meeting of Asian Academy of Prosthodontics, Shanghai, China, October 28-30, 2011, Conference program: 180, 2011.
3. Nozawa M, Kaku M, Rocavado JM Rosales, Uoshima K: Gene expression of HSP27 During the course of osteoblast differentiation and mineralization. The 7<sup>th</sup> Biennial Meeting of Asian Academy of Prosthodontics, Shanghai, China, October 28-30, 2011, Conference program: 92, 2011.
4. 野澤恩美, 加来賢, Rocavado JM Rosales, 魚島勝美: 骨芽細胞分化過程における Small Heat Shock Protein の発現. 第120回日本補綴歯科学会, 広島, 2011年5月21日, 日本補綴学会誌 120(3):313頁, 2011.
5. 加来賢, Rocavado JM Rosales, 野澤恩美, 魚島勝美, 歯根膜における XII 型コラーゲンの局在と石灰化能への影響. 第120

- 回日本補綴歯科学会, 広島, 2011年5月20日, 日本補綴学会誌 120(3):308頁, 2011
6. Kaku M, Rosales JM., Akiba Y., Nozawa M., Uoshima K.: COL12A1 Gene Silencing Enhances Osteoblastic Differentiation of Human PDL Cells. IADR/AADR 89th General Session, San Diego, USA, 2011年3月16日, J. Dent. Res 90(A);1531, 2011
7. Kaku M, Rosales JM., Akiba Y., Nozawa M., Uoshima K.: Type XII Collagen Modulates Matrix Formation and Mineralization on Human PDL Cells. International Joint Symposium on Oral Science, Bali, INDONESIA, 2010年12月17日
8. Kawasaki M, Kaku M, Rocavado JM Rosales, Nozawa M, Uoshima K.: Mechanical Loading Induces the MMP-13 induction at Epithelial Rests of Malassez. International Joint Symposium on Oral Science, Bali, INDONESIA, 2010年12月17日
9. Kaku M, Kawasaki M., Rosales JM., Uoshima K.: Hyper-Occlusal Loading Affects to the Expression of Collagen Modifying Enzymes. JADR 58th General Session, 北九州, 2010年11月20日
10. Kaku M, Kawasaki M., Rocavado JM Rosales., Uoshima K.: Effect of Mechanical Loading on Post-translational Modifications of Collagen. IADR/AADR 88th General Session, Barcelona, SPAIN, 2010年7月15日, J. Dent. Res 89(B);3747, 2010
11. Akiba Y., Kaku M, Nagasawa M., Bhuiyan A.A., Uoshima K.: Effect of HDACIs on mesenchymal stem cell in osteogenic differentiation. IADR/AADR 88th General Session, Barcelona, SPAIN, 2010年7月15日, J. Dent. Res 89(B);1013, 2010
12. Kawasaki M., Kaku M, Rashid Md. M., Uoshima K., Detection of MMP-13 among Dental Follicle Cells during tooth eruption., IADR/AADR 88th General Session, Barcelona, SPAIN, 2010年7月15日, J Dent Res 89(B);1239, 2010 Rocavado JM Rosales., Kaku M, Akiba Y., Kawasaki M. Nagasawa M., Uoshima K.: Mineralization Ability of Periosteum Derived Cells. IADR/AADR 88th General Session, Barcelona, SPAIN, 2010年7月15日 J. Dent. Res 89(B);1732, 2010

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

加来 賢 (KAKU MASARU)

新潟大学医歯学総合病院 講師

研究者番号: 30547542