

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 27 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791940

研究課題名（和文）神経堤由来としての歯根膜細胞の分化制御

研究課題名（英文）Differentiation control of neural crest-derived periodontal ligament cells

研究代表者

岩田 隆紀（IWATA TAKANORI）

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60431946

研究成果の概要（和文）：

ヒト歯根膜細胞の多分化能を検索する目的で神経分化能の解析をおこなった。コラゲナーゼ・ディスパーゼで酵素処理した歯根膜組織よりいわゆる間葉系幹細胞様な歯根膜幹細胞の抽出の系は非常に安定しており、未分化性を維持する目的で培地を DMEM/F-12 に換えたところ増殖は抑制傾向にあった。神経系への分化誘導培地を用いると歯根膜細胞は神経様細胞へ分化することが確認できた。また、イヌ歯周欠損に自己イヌ歯根膜細胞シートを移植したところ、神経関連タンパクである NFP 抗体陽性の新生神経組織が確認されたことから、インビボ・インビトロにおいて歯根膜細胞の神経再生への寄与の可能性が示唆された。また、非常に少ない集団ではあるが、造血幹細胞の維持に必須といわれる c-kit 陽性細胞が歯根膜由来細胞には存在し、また c-kit のリガンドである stem cell factor (SCF) を歯根膜細胞が発現していることが確認されたことから、間葉系組織における c-kit/SCF シグナリングを検討する必要が生じ、現在研究を進めている。また移植した細胞の動態を追跡するためにさまざまな手法を試したが、最終的にはレンチウイルスを用いて EGFP を導入する方法を最適化し、細胞治療の研究を行う際には細胞をラベリングしている。我々のターゲットとしている硬組織は組織切片を作製する際に脱灰・固定の際に蛍光色素が減退することが分かっているので、免疫組織学的に移植した細胞を評価する目的で脱灰・固定方法の最適化も併せて行った。

研究成果の概要（英文）：

Neural differentiation potential of human periodontal ligament (PDL) cells was examined. PDL tissue-derived cells showed mesenchymal stromal cells (MSC)-like properties and possessed neural differentiation capacities both *in vitro* and *in vivo*. In addition, we found out that c-kit, a key marker of hematopoiesis, was slightly (~0.5%) expressed in human PDL cells. Thus, we are studying the involvement of c-kit/stem cell factor signaling during cell differentiation. To trace the transplanted cells, we introduced lentiviral system and optimize the methods of decalcification and fixation to detect the GFP-labeled cells in immunohistochemical analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

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：歯根膜細胞、神経堤細胞、多分化能、細胞治療、細胞標識

1. 研究開始当初の背景

顔面骨の多くは神経堤細胞由来であることが知られており、顎骨由来の幹細胞は間葉系幹細胞とは異なり、ユニークな特性を持っていることが示唆されている。我々が追究している歯根膜細胞も神経堤細胞由来であり、間葉系幹細胞様性質だけでなく様々な特性を保持していることが示唆されている。顔面領域における神経堤細胞は主に神経細胞の形成を司るが、その他の機能に関しては不明な点が多い。我々はヒト歯根膜細胞の遺伝子発現をジーンチップを用いて網羅的に解析したところ、一般的に知られている periostin のみならず、今までに明らかにされていない高発現遺伝子が数多く存在することがわかった。その中には心筋修復に非常に重要な働きであることが近年報告されている IGFBP4 のみならず、トロポニンなど心筋組織に特異的に発現している遺伝子群が数多く検出された。発生学的な考察をすると歯根膜・心筋はいずれも神経堤細胞由来であり、最も負荷のかかる組織群であることに疑いはない。しかしながら、これらの組織の恒常性を維持する上で類似した遺伝子群が存在することは大きな驚きであった。

一方、心筋修復に関しては筋芽細胞シートや脂肪由来間葉系幹細胞シートが実験的梗塞モデルの心筋機能を有意に向上させることが示唆されている。これらの細胞が直接心筋に分化する頻度は極めて低いと考えられており、移植した細胞シートが液性因子を分泌し、周囲細胞の修復を長期的にサポートすることが考えられている。このような心筋パッチを歯根膜細胞で代替すれば、より効果的に心筋修復をなし得るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

私共は歯根膜由来組織幹細胞を用いて歯周組織の再生に有効であることを示してきたが、遺伝子発現解析の結果から、歯根膜由来細胞は驚くべきことに神経系と心筋修復に重要な遺伝子群を高発現していることを見いだした。そこで本研究では歯根膜細胞が他の神経堤由来の細胞に分化しうるかを、ヒト歯根膜細胞や動物実験にて検証し、簡便に入手しうる細胞ソースとして、その有効性・安全性を評価したいと考えた。

3. 研究の方法

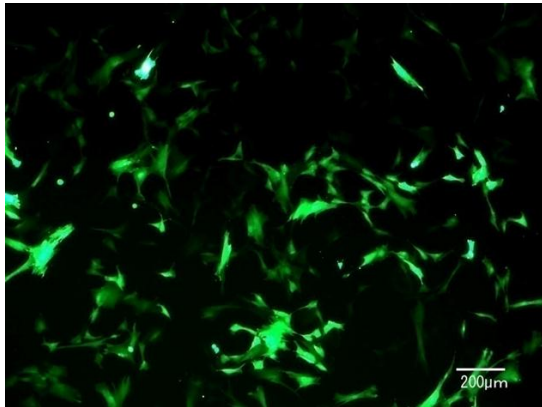
本学倫理委員会の承認得た上で、ヒト抜去歯より歯根膜細胞を酵素を用いて抽出した。培養した歯根膜細胞の性質を調査した。

イヌを用いた研究においては自己歯根膜細胞シートを1壁性欠損に貼付し、骨欠損部はリン酸カルシウム顆粒を充填した。8週後に屠殺し、標本作製した。神経系の再生を観察するため、抗神経線維タンパク抗体を用いた免疫染色を行った。

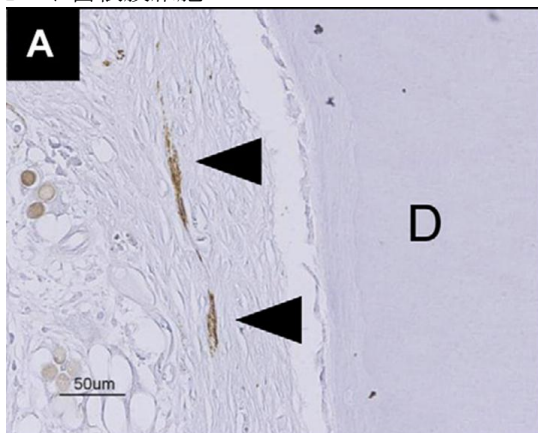
4. 研究成果

- (1) 歯根膜細胞を酵素消化し、未分化性を保つために DMEM/F-12 培地で培養したところ、その増殖能は従来より使用している α MEM と比べると遅かった。
- (2) DMEM/F-12 培地で培養された歯根膜細胞は造血系幹細胞のマーカーである c-kit とそのリガンドである stem cell factor を発現していることが分かった。
- (3) 歯根膜細胞は過去に報告があるように神経特異的マーカーを発現する細胞に分化した。また、イヌの歯周組織再生実験においては神経系の再生に寄与している可能性が示唆された。
- (4) イヌの移植実験において歯根膜細胞シートは骨髄由来、しそ骨膜由来の細胞シートと比べて厚いセメント質と強固な靭帯様組織の再生を有意に引き起こした。
- (5) レンチウイルスにより GFP を歯根膜細胞で発現させることにより細胞の追跡を行うことが出来るようになった。
- (6) レンチウイルスは濃度依存的に細胞毒性があるため、低濃度で感染させ細胞ソーターで蛍光強度の高い分画を集める必要があることが分かった。
- (7) 硬組織においては自家蛍光が強く、GFP を蛍光顕微鏡で観察することは困難であり、また脱灰操作も GFP と抗体の反応を阻害することから、さまざまな脱灰方法と固定方法を検討し、その最適化を実施した。
- (8) 骨芽細胞に分化誘導した細胞シートをマウスの皮下に移植すると、血管内皮細胞と共培養することにより、新生骨様組織の形成が促進した。
- (9) MEPE は furin によって活性化され細胞接着を促進した。
- (10) ヒト歯根膜細胞の特性を解析し、細胞治療にふさわしい潜在能力を持ち合わせていることを確認した。

- (11) GMP 準拠の CPC 内で作製されたヒト培養歯根膜細胞シートの有効性と安全性を評価した。



レンチウイルスにより GFP でラベリングされたヒト歯根膜細胞



歯根膜細胞シート移植群においては NFP (神経線維タンパク) 抗体陽性の神経様組織が再生された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

- ① Yoshida T, Washio K, Iwata T (他 2 名、3 番目), Current status and future development of cell transplantation therapy for periodontal tissue regeneration, *Int J Dent*. 2012;2012:307024, 2012, 査読有
- ② 岩田隆紀, 歯根膜チームの進捗状況, *未来医学*, 26:28-33, 2011, 査読無
- ③ 鷺尾薫、葭田敏之、妻沼有香、岩田隆紀 (他 2 名、4 番目), 歯根膜細胞シートを用いた歯周病治療, *治療*, 93:2130-35, 2011, 査読無
- ④ Tsumanuma Y, Iwata T (他 10 名、2 番目), Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. *Biomaterials*. 32:5819-25, 2011, 査読有
- ⑤ Izumi Y, Aoki A, Yamada Y, Kobayashi H, Iwata T (他 6 名、5 番目), Current and future periodontal tissue engineering, *Periodontol* 2000. 56:166-87, 2011, 査読有
- ⑥ Pirraco RP, Obokata H, Iwata T, (他 5 人、3 番目), Development of osteogenic cell sheets for bone tissue engineering applications, *Tissue Eng Part A*. 17:1507-15, 2011, 査読有
- ⑦ Wang HG, Kawashima N, Iwata T, (他 4 人、3 番目), MEPE activated by furin promotes pulpal cell adhesion. *J Dent Res*. 90:529-34, 2011, 査読有
- ⑧ Iwata T, (他 8 人、1 番目), Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. *J Clin Periodontol*. 37:1088-99, 2010, 査読有
- ⑨ Washio K, Iwata T, (他 5 名、2 番目), Assessment of cell sheets derived from human periodontal ligament cells: a pre-clinical study. *Cell Tissue Res*. 341:397-404, 2010, 査読有
- ⑩ Wang H, Kawashima N, Iwata T (他 4 人、3 番目), Differentiation of odontoblasts is negatively regulated by MEPE via its C-terminal fragment. *Biochem Biophys Res Commun*. 398:406-12, 2010, 査読有

〔学会発表〕 (計 13 件)

- ① Tatsumi K, Ohashi K, Matsubara Y, Kohori A, Kakidachi H, Horii A, Iwata T, Okano T, Tissue Factor-triggered Procoagulant Activity of Murine/Human Mesenchymal Stem Cells, The 2nd Meeting of Asian Cellular Therapy Organization, 2011.10.17, Miyazaki, Japan
- ② 岩田隆紀、歯根膜再生のバイオロジー、第一回日本外傷歯学会東日本地方会学術大会、2011.10.10、東京
- ③ Iwata T, et al., Periodontal regeneration with multi-layered periodontal cell sheets, 3rd Asian Biomaterials Congress, 2011.9.15, Busan, Korea.
- ④ Yamada A, Iwata T et al., Expression of WNT Related Genes in Human Periodontal Ligament Cells during Osteogenic Differentiation. 10th world congress on inflammation, 2011.6.27, Paris, France
- ⑤ Tsumanuma Y, Iwata T et al., Comparison of Different Tissue-derived Stem Cell Sheets for Periodontal Regeneration in a Canine 1-wall Defect Model, 10th

- world congress on inflammation, 2011.6.27, Paris, France
- ⑥ 岩田隆紀 他、細胞シートによる刺繡組織の再生－臨床試験と細胞治療の展望－、第10回日本再生医療学会総会、2011.3.2, 東京
 - ⑦ 妻沼有香、岩田隆紀 他、イヌ1壁性欠損モデルを用いた歯周組織再生における異なる組織由来細胞シートの比較、第10回日本再生医療学会総会、2011.3.2, 東京
 - ⑧ 山田梓、岩田隆紀 他、ヒト歯根膜細胞の骨芽細胞分化における WNT 関連遺伝子発現、第10回日本再生医療学会総会、2011.3.2, 東京
 - ⑨ Iwata T, et al. Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use, 98th American Academy of Periodontology Annual Meeting, 2010.10.31, Honolulu, USA
 - ⑩ Tsumanuma Y, Iwata T, et al., Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. 98th American Academy of Periodontology Annual Meeting, 2010.10.31, Honolulu, USA
 - ⑪ Yamada A, Iwata T, et al., Expression of WNT related genes in human periodontal ligament cells during osteogenic differentiation. 98th American Academy of Periodontology Annual Meeting, 2010.10.31, Honolulu, USA
 - ⑫ Yoshida T, Iwata T, et al., Periodontal Regeneration With Periodontal Ligament-Derived Cell Sheets: A Translational Research For The Clinical Trial. TERMIS-AP, 2010.9.17, Sydney, Australia
 - ⑬ Kawashima N, Xu J, Iwata T, et al., Promotive effects of Sp7 on Dsp expression. 88th General Session & Exhibition of the IADR, 2010.7.17, Barcelona, Spain

[図書] (計2件)

- ① Iwata T, et al., Artech House, Methods in Bioengineering: Cell Transplantation, 2011, 23-33.
- ② Iwata T, et al., Academic Press, Principles of Regenerative Medicine Second Edition, 2010, 517-527.

[その他]

ホームページ等

<http://www.twmu.ac.jp/ABMES/CSTEC/ja/sperio>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 隆紀 (IWATA TAKANORI)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：60431946

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし