様式Ｃ－１９

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　6　月 18　日現在

機関番号：32667
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2010～2011
課題番号：２２７９１９４３
研究課題名（和文）　神経・筋疾患に対する新規細胞医療法の開発：歯根膜の細胞ソースとしての可能性を探る
研究課題名（英文）Development of the new cell therapy for a neurologic and muscular disorder: considering the possibility of the cell source of the periodontal membrane
研究代表者
富永徳子（TOMINAGA　NORIKO）
日本歯科大学・生命歯学部・助教
研究者番号：９０５４６５３２

研究成果の概要（和文）：我々は、ラット歯根膜由来細胞から筋細胞と神経細胞（ニューロン）の分離を行った。分離した歯根膜由来筋細胞集団に骨格筋細胞、心筋細胞様の活動電位を持つ細胞が存在することがパッチクランプ法により確認された。また、免疫染色から、骨格筋マーカーである ToroponinT 陽性細胞、心筋マーカーである ToroponinI 陽性細胞、また、平滑筋マーカーsmooth muscle actin に陽性を示す細胞が存在することが確認された。骨分化能評価では、歯根膜由来線維芽細胞では石灰化ノジュールの形成が確認されたが、歯根膜由来筋細胞、ニューロンではほとんど観察されなかった。

研究成果の概要（英文）：The muscle and nerve cells(neurons) were isolated from rat periodontal ligament cells. The muscle cells were confirmed by patch‐clamp method, their action potential were similar to the skeletal muscle cells or the cardiac muscle. In immunostaining, there are positive cells for the skeletal muscle marker, toroponin T; or the myocardial marker, toroponin I; or the smooth muscle marker, α-smooth muscle action.In the evaluation of bone differentiation potential, the formation of calcification nodule were formed in the fibroblast from primary culture of periodontal ligament. But almost none of such calcification was observed in muscle cells and neurons.

交付決定額
（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
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
キーワード：再生歯学

１．研究開始当初の背景

(1) 歯根膜は、多様な細胞で構成される組織であるため、培養下での歯根膜も高い heterogeneity を有する。したがって、歯根膜細胞を構成する各種細胞群の生物学的特性や機能解析の研究が盛んに行われている。

さらに、移植治療にむけた応用研究を進める上で効果的な分離法が求められてきた。申請者は、ろ紙を用いたコロニアルクローニング法によりラット歯根膜初代培養シャーレから筋細胞とニューロンを分離することに成功した。これらの細胞は初代培養から特殊な分化誘導を行わずに分離したもので、分離後も獲得した表現型を失わずに継代培養が可能であり、さらに正常核型も維持していた。
(2)本研究で分離した歯根膜由来筋細胞は、多核の合胞体細胞に単核の細胞が混在する集団で免疫染色、RT-PCR にて筋の特異的マーカーである MyoD, Myogenin, myosin, α-sarcomeric actin の発現を認めた。歯根膜細胞から筋細胞の分化誘導は、Techawattanawisal ら(Biochem Biophys Res Commun, 2007; 357(4): 917-23)が、ラット歯根膜から neurosphere-forming culture 法により分離した細胞を化学物質などにより誘導し、MyoD 陽性の多核の筋細胞に分化させた報告がある。我々の分離法は、誘導を行わずとも筋の分離に成功している。また、Yoshida ら(J Cell Sci, 1998; 111(Pt6): 769-79)によると、マウス由来の筋芽細胞(C2C12)を 2%ウマ血清の培養環境下で、MyoD 陽性の成熟した筋細胞と、MyoD 陰性の単核細胞に分化することが報告されている。申請者が分離した細胞も成熟した多核の筋細胞の中に MyoD 陰性の単核細胞が存在した。しかし、継代すると再び MyoD 陽性細胞が現れた。このことから、申請者が分離した細胞は筋細胞にコミットした前駆細胞と成熟した細胞が共存していると考えられる。この新知見は、従来の強制的な分化誘導による成熟筋細胞を移植に用いるという再生療法とは異なり、新たな筋再生療法の開発に貢献すると考えられる。
(3)本研究で分離した神経細胞は、ニューロン特異的マーカーである NSE, NF150 の他、神経前駆細胞マーカーである nestin の発現が確認された。筋細胞同様、神経細胞も継代培養が可能であることから、この nestin 陽性細胞が、新生ニューロンの供給源となっていると考えられる。Techawattanawisal らは、ラット歯根膜から分離した細胞に分化誘導を行うことで、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを分化させた。しかし、終末分化した細胞は増殖しないため、継代培養は不可能であると言われている。さらに、本手法で得た細胞は高い正常 2 倍体性を核型解析にて維持していることを確認している。
(4)近年、iPS 細胞を目的の細胞へ分化誘導した細胞を移植する研究が活発だが、移植する細胞の中に iPS 細胞が残存し腫瘍化する危険性がある。また、iPS 細胞は、骨、軟骨、脂肪の 3 胚様へと分化することがわかっている。

２．研究の目的
(1)分離したラット歯根膜由来筋細胞、神経細胞が電気生理学的に機能を持つか検討する。
(2)分離したラット歯根膜由来筋細胞、神経細胞の構成細胞を検討する。
(3)本研究で分離した細胞に、幹細胞が残存しているかを検討する。
(4)細胞移植による運動機能の回復の評価と細胞動態を確認するために、移植する細胞に標識がある細胞が望ましい。そのため、GFP 発現ラットから歯根膜由来筋細胞、神経細胞を分離し、移植に用いる。

３．研究の方法
(1)ホールセルパッチクランプ法(カレントクランプ)の検討
①歯根膜由来筋細胞を、トリプシン/EDTA にて 60ｍｍシャーレから剥がし、回収した細胞の一部を 24×24mm のスライドガラスに播種し培養をおこなった。培養 14 日後の細胞の活動電位を測定した。
②歯根膜由来筋細胞トリプシン/EDTA にて 60ｍｍシャーレから剥がし、回収した細胞の一部を 24×24mm のスライドガラスに播種し培養をおこなった。2, 6, 12 日後の細胞の活動電位を測定した。
③歯根膜由来筋細胞をトリプシン/EDTA にて回収し、3 シャーレに細胞を播種した。15% FBS 含有 DMEM/F12 にて培養した 2、6、12 日後の細胞を活動電位測定に用いた。細胞をシャーレから剥離し、セルストレーナーにて細胞を単離した後、コラーゲン/ポリエルリジンコートしたスライドガラスに播種した。30 分 37℃にてインキュベート後、活動電位を測定した。
④歯根膜由来筋細胞をトリプシン/EDTA にて剥がし、3 シャーレに細胞を播種し、2%ウマ血清含有 DMEM/F12 にて 2、6、12 日培養を行った。細胞をシャーレから剥離し、セルストレーナーにて細胞を単離した後、コラーゲン/ポリエルリジンコートしたスライドガラスに播種した。30 分 37℃にてインキュベート後、活動電位を測定した。

(2)免疫染色
歯根膜由来筋細胞をラブテックチャンバースライドに播種し、骨格筋マーカーである ToroponinT、心筋マーカーである ToroponinI、平滑筋マーカーである smooth muscle actin にて免疫染色をおこなった。免疫染色後、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

(3)腫瘍化する幹細胞の残存の検討
①骨分化誘導
ラット歯根膜の初代培養細胞と、分離した筋細胞、ニューロンの骨分化誘導を行った。

dexametazone, ascorbic acid, glycelophosphate 含有αMEM にて 3 週間培養後、アリザリン染色を行った。

(4)GFP ラットからの細胞の分離
GFP 発現ラット臼歯を抜歯し、60mm シャーレにて静置培養を行う。抜去歯から outgrowth した目的細胞を採取するため、トリプシン/EDTA 含浸ろ紙を目的細胞上におき、ろ紙に付着する細胞を分離した。

４．研究成果
(1)ホールセルパッチクランプ法の検討
①本研究で分離した筋細胞の一部を 24×24mm のスライドガラスに播種し培養をおこなった。4 継代目の培養 14 日後の活動電位を測定したところ、心筋細胞様(図 1a,1b)と骨格筋様（図 2a,b）の活動電位を持つ細胞が確認された。

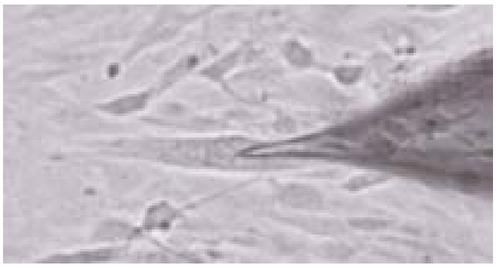


図 1a:心筋様活動電位を持つ細胞の位相差像

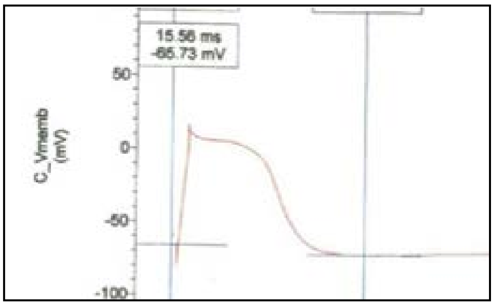


図 1b:心筋様活動電位

図 2a:骨格筋様活動電位を持つ細胞の位相差像

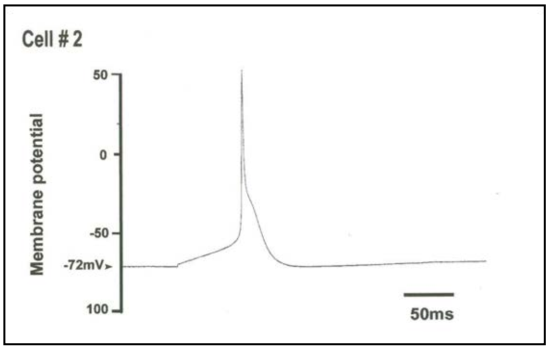


図 2b:骨格筋様活動電位を持つ細胞の位相差像

②本研究で分離した筋細胞を、トリプシン/EDTA にて 60ｍｍシャーレから剥がし、回収した細胞の一部を 24×24mm のスライドガラスに播種し培養をおこなった。3 継代目の 2, 6, 12 日後の細胞の活動電位を測定した。
2, 6 日後の細胞は骨格筋の活動電位のみ測定できたが、機械の設定上、培養 12 日後の細胞が大きすぎるため閾膜電位に達するまでの電流刺激を与えることができなかった(図 3a,b)。そのため、活動電位は測定できなかった。

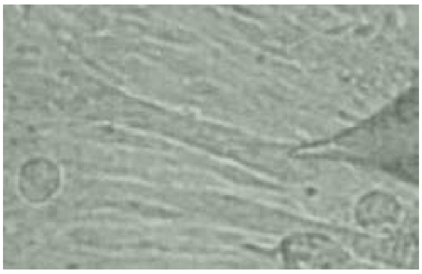


図 3a:活動電位測定不可能な細胞の位相差像

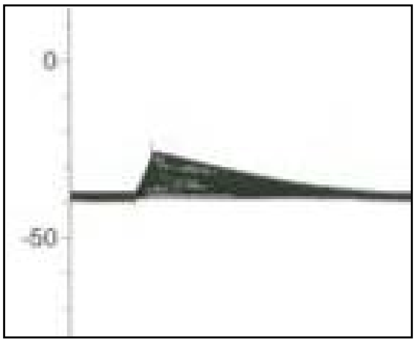
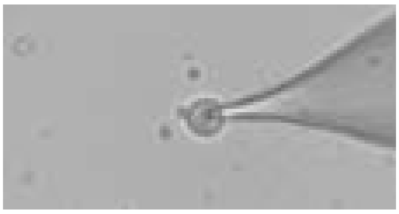


図 3b:閾膜電位に達していない活動電位

①,②から、歯根膜由来筋細胞が多核細胞を形成すると、刺激が不足し活動電位を測定できない可能性があった。そこで電位測定のための条件を再検討して、改良を行った。

③新たに活動電位を測定した細胞はすべて骨格筋様の活動電位を示していたが、静止膜電位はほとんど0〜+mVを示していた(図4)。



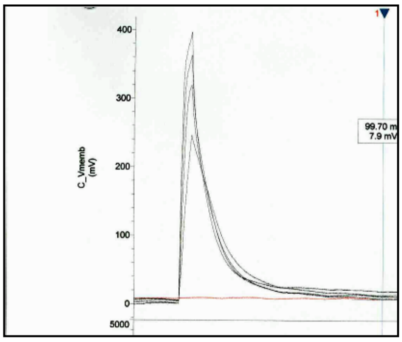


図4：静止膜電位が0mVを示す活動電位

③の結果から、マウス下腿由来C2C12筋芽細胞が、未成熟であると静止膜電位が0mV近くを示し、成熟するとともに生体で観察される-70mV へ近づくという報告(大西優貴, 生体工学,2008;46(1):64-68)と一致することがわかった。そのため、我々の維持する歯根膜細胞由来筋細胞も同様に 2%ウマ血清にて分化誘導をおこない、活動電位を測定した。

④2%ウマ血清にて分化誘導し、活動電位を測定したところ、骨格筋様の活動電位が測定された。さらに、静止膜電位も-70mV へと近づくことがわかった。

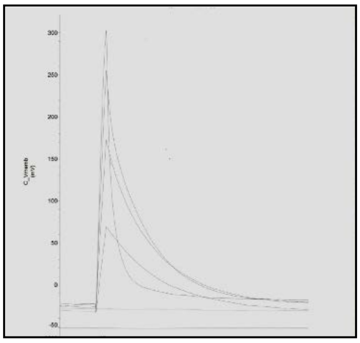


図5：－25mvの静止膜電位を示す歯根膜由来筋細胞

本研究で分離した歯根膜由来筋細胞が、C2C12 と大変類似することが確認された。今後は、活動電位を測定した細胞のシングルセルPCRを行い、機能だけでなく骨格筋の遺伝子の発現をしているかの確認を行う。

(2)免疫染色
培養 4, 6, 14 日目にて免疫染色をおこなった(図 6)。培養 4 目では、骨格筋マーカーである ToroponinT 陽性細胞が数%確認され、培養日数が増えるとともに、その数は増加した。特に、ToroponinT 陽性細胞は多核の細胞であることが多かった。また、心筋マーカーである ToroponinI も培養日数が増えるとともに増えたが、どれも弱陽性を示していた。また、平滑筋マーカーである SMA 陽性細胞は、単核で常に 10%存在することが分かった(図 7)。

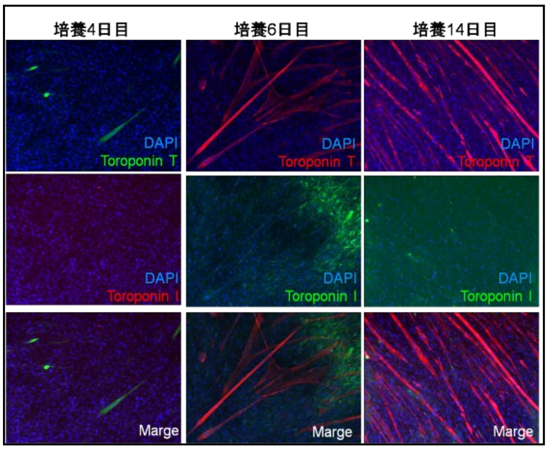


図6:免疫染色によるToroponinT,ToroponinI陽性細胞

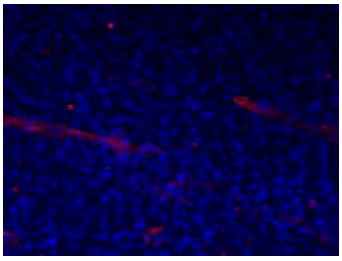


図7:SMA陽性細胞

(1)、(2)の結果から、骨格筋様の活動電位が明らかに多く測定できたのは、(2)の免疫染色の結果からもわかるように、本研究で分離された筋細胞の中には、骨格筋が多く含まれること示唆された。また、免疫染色では平滑筋も存在することから、本研究で分離された筋細胞は骨格筋、心筋、平滑筋の3種類が存在する可能性が示された。今後は、フローサイトメトリーを用い、分離した細胞に含まれる3種類の細胞の割合を定量化していこうと考えている。

(3)骨分化評価
近年、iPS 細胞を目的の細胞へ分化誘導した細胞を移植する研究が活発だが、移植する細胞の中に iPS 細胞が残存し腫瘍化する危険性がある。本研究で分離した細胞にも腫瘍化する可能性がある多能性幹細胞の存在を、多能性を評価する１手法である、骨分化誘導を行った。ラット歯根膜由来線維芽細胞は骨分化誘導１週間から石灰化ノジュールの形成が確認され、3 週間ではシャーレ内すべてに石灰化が確認された。ラット歯根膜由来筋細胞、ニューロンにおいては、ほとんど石灰化ノジュールは確認されなかったが、アリザリン染色を行うと、一部赤く染まる石灰化物が確認された。骨分化誘導だけでは、多能性を証明するには不十分なため、今後は脂肪誘導、軟骨誘導を行い３胚葉へ分化すること、フローサイトメトリーにより幹細胞の表面抗原を持つ細胞が存在するかを確認する。

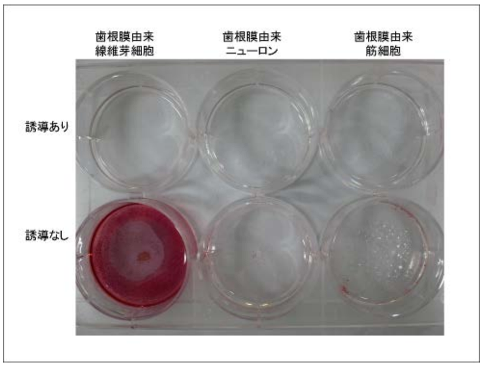


図 8:骨分化誘導後、アリザリン染色を行った。

(4)GFP ラットからの細胞の分離
分離した細胞を用いて、移植による運動機能の回復の評価と細胞動態を確認するために、GFP 発現ラットから歯根膜由来筋細胞、神経細胞の分離を試みた。しかしながら、敷石状の細胞の増殖が速く、形態学的に歯根膜由来筋細胞、ニューロンと考えられる細胞の分離はできなかった。今後は、分離した細胞に、PKH などの色素をつけるか、またはレトロウィルス、センダイウィルスを用いて GFP を遺伝子導入させ、移植細胞に用いようと考えている。

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３件）
①富永徳子，口のふしぎと歯のふしぎ　親知らずを抜くことを勧められましたが、抜きたくありません。抜いた親知らずは、何かの役に立ちませんか?，DHstyle，5，14-15，2011.
②Suzuki M，Tominaga N，Ide Y，Ohyama A，Nakahara T，Ishikawa H，Tanaka A，Mataga I，Establishment and characterization of the rhabdomyosarcoma cell line designated NUTOS derived from the human tongue sarcoma: Special reference to the susceptibility of anti-cancer drugs，Human cell，23(2)，65-73，2010.
③中原　貴，Nikolay Ishkitiev，富永徳子，井出吉昭：抜去歯由来の幹細胞にみる再生医療の未来，日本歯科医師会雑誌，Vol.62 No.12，21-29，2010.

〔学会発表〕（計 13 件）
①富永徳子，　抜去歯の新たな使い道―再生医療にむけて，平成23年東京都歯科医師会卒後研修会，東京，2011年，7月.
②富永徳子，中原　貴，再生医療における歯根膜細胞の細胞源としての可能性，日本歯科大学歯学会研究推進フォーラム，東京，2010年，9月.
③富永徳子，井出吉昭，安田　充，鈴木美奈子，那須優則，石川　博，中原　貴，Establishing HGCT cell lines derived from germ cell tumors of human ovary and production of IL-1□，IL-6 and VEGF，第２８回 日本ヒト細胞学会学術集会，茨城，2010年，8月.
④富永徳子，歯根膜細胞の再生医療にむけた自家細胞ソースとしての可能性，平成 22 年度OMSTアカデミア学術発表，東京，2010 年，4 月.

６．研究組織
(1)研究代表者
富永徳子（TOMINAGA　NORIKO）
（日本歯科大学・生命歯学部・助教）
研究者番号：９０５４６５３２