

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 05 月 25 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791952

研究課題名（和文）：上皮—間葉相互作用を利用したヒト骨髄由来間葉系幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導

研究課題名（英文）：Induction of differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal stem cell to odontoblast using epithelial-mesenchymal interactions.

研究代表者

中田 憲（NAKATA AKIRA）

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：50400510

研究成果の概要（和文）：

2010年度は、*in vitro*における上皮—間葉相互作用を重層共培養法で再現し、間葉系細胞を播種した後、エナメル芽細胞を間葉系細胞の上に播種するときれいな上皮コロニーが形成された。そこで、間葉系細胞へ歯の形態形成に関与するツールキット遺伝子である Shh や Wnt 遺伝子を導入し、同様の実験を行い、Shh や Wnt がエナメル芽細胞に与える影響も解析した。

2011年度も解析を継続し、Shh や Wnt 遺伝子を導入した間葉系細胞をフィーダー細胞に使用すると、エナメル芽細胞のコロニー数が有意に増加し、コロニーの最大直径は有意に増大した。また、間葉系細胞をマイトマイシンCで処理した後にエナメル芽細胞を重層すると培養2週後にエナメル芽細胞の細胞塊が形成された。Shh や Wnt 遺伝子発現群では有意にその細胞塊が増大し、細胞分化を調節する Notch1 遺伝子の発現が抑制された。Wnt は、エナメル芽細胞の Runx2/Cbfa1 の発現を完全に抑制した。さらに本年度は、コラーゲンを移植用担体に間葉系細胞とエナメル芽細胞の複合体を作製し、ヌードマウス背中皮下に複合体を移植したが、癌化する傾向にあり、歯の再生には至っていない。

研究成果の概要（英文）：

In 2010, epithelial colonies were formed after I reconstructed epithelial-mesenchymal interactions *in vitro* by double-layer co-culture method that inoculated ameloblasts on mesenchymal cells. Therefore I introduced recombinant Shh and Wnt gene of tool kit genes these related odontogenic morphogenesis to mesenchymal cells and carried out similar experiment, analyzed influences those signals of Shh and Wnt gave adamantoblast.

I continued analyses as for 2011, when using mesenchymal cells introduced recombinant Shh and Wnt gene as feeder cells, epithelial colony count of ameloblasts increased dominantly, and diameter of a colony at the maximum was enlarged significantly. In addition, ameloblasts formed the nodules after two weeks culture when ameloblasts were inoculated on mesenchymal cells treated mitomycin C. Nodules were bigger significantly, Notch1 gene expression was inhibited that regulated cell differentiation in Shh and Wnt signaling groups. Wnt signal completely inhibited Runx2/Cbfa1 gene expression of ameloblasts. More this year, I produced the mixture of collagen scaffold, mesenchymal cell and ameloblast, and transplanted the mixtures into back of nude mice subcutaneously. I do not reached tooth regeneration, because of oncogenic change of transplanted mixture.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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・外科系歯学

キーワード：歯の再生医療

1. 研究開始当初の背景

21世紀の歯科医学における戦略的研究課題の一つは歯の再生と考えられる。近年、マウス歯胚細胞を用いた歯の再生医療の研究が活発に行われるようになり、失われた歯を取り戻すことが現実となりつつあり、今後、ヒト細胞を用いた歯の再生医療への応用が期待される。再生医療の細胞源として注目を浴びている間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪、骨格筋などの様々な間葉系細胞への分化能を有する細胞である。当教室では、間葉系幹細胞を用いた顎骨再生医療を目指し、ヒト骨髓から間葉系幹細胞を分離・培養し、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化可能な骨髓由来間葉系幹細胞を保持している(図1)。

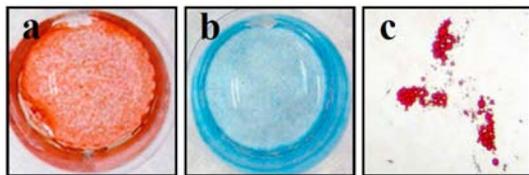


図1 当教室で樹立したヒト骨髓由来間葉系幹細胞株は、培養系で骨分化能(a)、軟骨分化能(b)、脂肪分化能(c)を有する。

最近、ヒト骨髓から分離した細胞が象牙芽細胞への分化能を有することが明らかにされた。しかしながら、骨髓由来間葉系幹細胞の歯原性細胞への分化能を示した報告は非常に少ない。

象牙芽細胞はエナメル上皮に接する間葉系の歯乳頭細胞から分化するが、この象牙芽細胞の分化にはエナメル芽細胞との上皮-間葉相互作用が重要であり、エナメル芽細胞から分泌されるエナメル蛋白やエナメル芽細胞との接触を介した何らかのシグナルが象牙芽細胞の分化に関与していると考えられる。申請者は、歯由来細胞株を用いた歯の再生医療の開発を目指した基礎的研究を行っており、マウス胎仔の歯胚からエナメル芽細胞および象牙芽細胞を分離・培養して、不死化エナメル芽細胞株と不死化象牙芽細胞株の樹立に成功し、それらの特性を明らかにしてきた。申請者が樹立したエナメル芽細胞

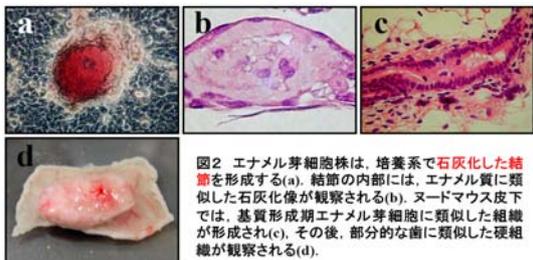


図2 エナメル芽細胞株は、培養系で石灰化した結節を形成する(a)。結節の内部には、エナメル質に類似した石灰化像が観察される(b)。ヌードマウス皮下では、基質形成期エナメル芽細胞に類似した組織が形成され(c)、その後、部分的な歯に類似した硬組織が観察される(d)。

は、培養系で石灰化した結節を形成し(図2

a, b), ラミニンを主体とした基底膜成分の調整品であるマトリゲルを担体としてヌードマウスの皮下に移植すると、自ら基質形成期エナメル芽細胞に分化してエナメル器様組織を形成し(図2c)、部分的な歯に類似した硬組織を形成する(図2d)。一方、申請者が樹立した象牙芽細胞は、各種のデンティンマトリックス蛋白産生に関する遺伝子を発現し、培養系で石灰化した結節を形成する(図3)。さらに、樹立したエナメル芽細胞

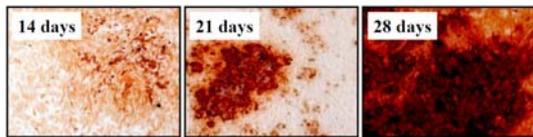


図3 象牙芽細胞株は、培養系で経時的に石灰化する。

と象牙芽細胞による上皮-間葉相互作用を培養系で再現するために、特殊なバブル処理

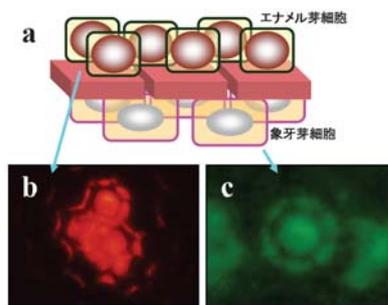


図4 ハニカム構造を有する特殊コラーゲン膜を用いた上皮-間葉相互作用の模式図(a)。その膜上で培養したエナメル芽細胞(b)、および象牙芽細胞(c)。

で通気孔の大きさを変更できるコーゲン膜(細胞を両面に培養して、細胞が互いの細胞突起を介して接触し、シグナル伝達ができる)を開発してきた(図4)。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト細胞を用いた歯の再生医療の開発を目指し、当教室で樹立したマウスエナメル芽細胞株とヒト骨髓由来間葉系幹細胞との上皮-間葉相互作用を応用した生物学的手法により、骨髓由来の間葉系幹細胞から象牙芽細胞への分化誘導を試み、成熟した象牙質や部分的な歯を再生することを目的とする。

3. 研究の方法

申請者が既に樹立したマウスエナメル芽細胞株とヒト骨髓由来間葉系幹細胞株を用いて、両細胞が接触する培養法で上皮-間葉相互作用を再現し、培養系と生体内において象牙質や部分的な歯の再生医療の開発法

を詳細に検討する。

① マウスエナメル芽細胞との共培養により上皮-間葉相互作用を再現し、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導

a. 単層共培養法による分化誘導 (図5)

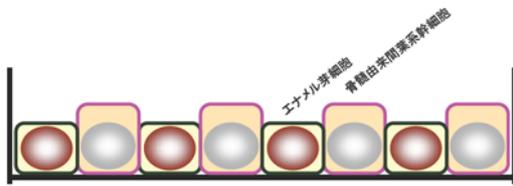


図5 単層培養法による分化誘導実験の模式図

エナメル芽細胞と骨髄由来間葉系幹細胞を1対1で培養皿上に播種し、3週間培養を行う。象牙芽細胞特異的遺伝子(DSP, DMP-1, DMP-2, DMP-3, オステオポンチンなど)の発現をRT-PCR法で検討する。

b. トランスウェルを用いた共培養法による分化誘導 (図6)

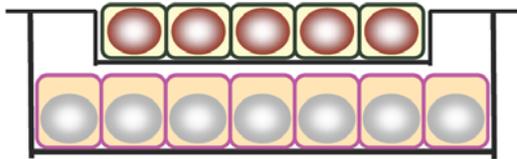


図6 トランスウェルを用いた分化誘導実験の模式図

培養皿上に骨髄由来間葉系幹細胞を、トランスウェル上にエナメル芽細胞を播種し、3週間培養を行い、象牙芽細胞特異的遺伝子の発現をRT-PCR法で検討する。

c. 重層培養法による分化誘導 (図7)

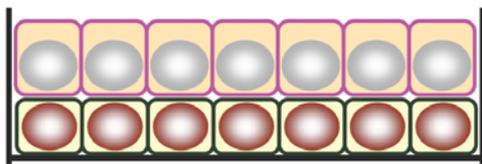


図7 重層培養法による分化誘導実験の模式図

培養皿上にエナメル芽細胞株を播種・培養し、エナメル芽細胞の上に間葉系幹細胞を重層することで、生体内における上皮-間葉相互作用を *in vitro* で再現する。3週間共培養を行い、象牙芽細胞特異的遺伝子の発現をRT-PCR法で検討する。

d. 特殊コラーゲン膜を用いた共培養法による分化誘導 (図8)

現在、開発中である特殊コラーゲン膜を介して、片面に骨髄由来間葉系幹細胞を、もう片面にエナメル芽細胞を培養し、上皮-間葉相互作用を *in vitro* で再現する。3週

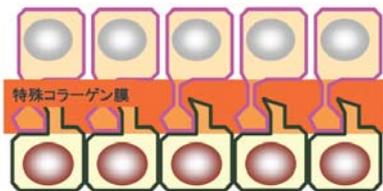


図8 特殊コラーゲン膜を用いた分化誘導実験の模式図

間培養を行い、象牙芽細胞特異的遺伝子の発現をRT-PCR法で検討する。また、組織切片を作製し、*in vitro*における象牙質や部分的な歯の再生について評価する。

e. ペレット培養法を用いた分化誘導 (図9)

エナメル芽細胞と骨髄由来間葉系幹細胞を1対1で混合し、遠心してペレットにする。3週間培養を行い、象牙芽細胞特異的遺伝子の発現をRT-PCR法で検討する。また、組織切片を作製し、*in vitro*における象牙質や部分的な歯の再生について評価する。さらに、歯および石灰化に関連するタンパクを免疫組織化学染色にて検出する。

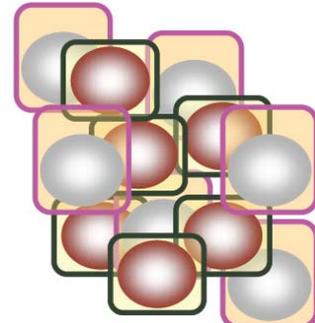


図9 ペレット培養法による分化誘導実験の模式図

※象牙芽細胞の特異的遺伝子の発現を誘導できない場合には、各種の成長因子(PDGFやIGF-1, TGF- β , BMP, EGF, FGF)を培地に添加し、再度実験を行う。

f. 基底膜成分を用いた分化誘導 (図10)

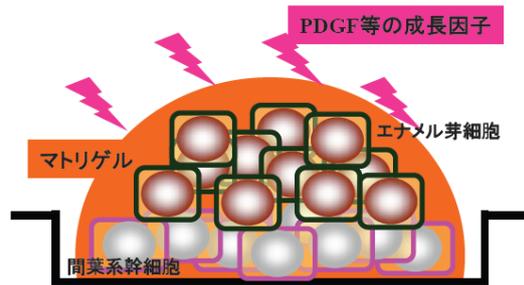


図10 マトリゲル内注入法による分化誘導実験の模式図(骨髄由来間葉系幹細胞とエナメル芽細胞は接触する)

マトリゲル内で三次元培養する。Nakaoらの方法(The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods*, 4(3), 227-30, 2007)を基に、マトリゲルをセルカルチャーインサート上でゲル化させた後、骨髄由来間葉系幹細胞をマトリゲル内に注入し、その間葉系幹細胞に隣接するようにエナメル芽細胞を注入して3週間三次元培養を行う。間葉系幹細胞を回収した後、象牙芽細胞特異的遺伝子の発現量をRT-PCR法で検討する。

② 歯再生用 Scaffoldを用いた樹立細胞株の異所性歯形成能の検討 (図11)

a. 吸収性リン酸カルシウムセラミックスおよび吸収性高分子ポリマー/セラミックス複合体を利用した歯再生医療用の chamber を開

発中である。実験①の詳細な検討で得られた培養体，コラーゲン膜やマトリゲルとのエナメル芽細胞/骨髄由来間葉系幹細胞・複合体をこの diffusion chamber に入れ，chamber の両端をミリポアフィルターで封鎖した後，chamber を SCID マウスの皮下に移植する。移植後，2 週，4 週，8 週，12 週に chamber を摘出し，組織切片を作製し，*in vivo* における象牙質や部分的な歯の再生について評価する。さらに，歯および石灰化に関連するタンパクを免疫組織化学染色にて検出する。

b. a で作製した培養体およびエナメル芽細胞/骨髄由来間葉系幹細胞・複合体と diffusion chamber を下顎臼歯を抜歯した SCID マウスの顎骨内に移植する。移植後，4 週，8 週，12 週に chamber を摘出し，組織切片を作製し，*in vivo* における象牙質や部分的な歯の再生について評価する。さらに，歯および石灰化に関連するタンパクを免疫組織化学染色にて検出する。



図11 マウスエナメル芽細胞およびヒト骨髄由来間葉系幹細胞と歯再生用 Scaffold を用いた歯の再生医療法

※歯の組織が再生できない場合には，各種の成長因子 (PDGF や IGF-1, TGF- β , BMP, EGF, FGF) を含浸させた移植用 chamber へ変えて，再度実験を行う。

4. 研究成果

歯の発生は，腎臓や肺など他の器官の発生と同様に，上皮細胞と間葉細胞の時間的・空間的相互作用により進行する。この過程で，上下顎の特定の場所に歯の形成が誘導され，その場に応じた切歯，犬歯や臼歯がかたち作られ，象牙質やエナメル質の形成が開始する。上皮-間葉相互作用では，骨形態形成因子 (BMP)，線維芽細胞増殖因子 (FGF)，ソニックヘッジホッグ (Shh)，ウィント (Wnt)，腫瘍壊死因子 (TNF) などのツールキット (tool kit) 遺伝子のシグナルが中心的な役割を果たすことが明らかとなっている (図 12)。今回わたしは，歯の形成に関与するツールキット遺伝子である Shh と Wnt-5a をマウス胎仔由来線維芽細胞株 (Swiss-3T3) に遺伝子導入し，上皮-間葉相互作用を応用したエナメル芽細胞と間質系細胞の共培養を行い，間質系細胞の支持とそれぞれの分泌タンパクがエナメル芽細胞の増殖と分化に与える影響を調べた。

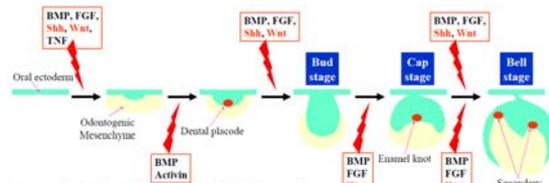


図12 歯の発生に関する上皮-間葉間のシグナル
 蕾状期までは歯冠がシグナルを出す。蕾状期以降では集積した歯胚間葉がシグナルを出す。蕾状期になると，歯乳頭に向する歯冠上皮の中心に位置するエナメル結節がシグナルセンターとなり，歯の形態を決定すると考えられている (Theisell J. Epithelial-mesenchymal signaling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 116(9): 1647-1648, 2003)。

①本研究に使用した細胞

コードされる全領域を含む Shh (Chicken)，Wnt-5a (Chicken) の cDNA 断片を哺乳類培養細胞用発現ベクター (クロンテック社) に組み込む。Lipofection 法を用いて，標的遺伝子が組み込まれた発現ベクターを Swiss-3T3 に遺伝子導入し，3 日後から G418 (Geneticin®) が混合された培地 (D-MEM/10%FBS) で Swiss-3T3 変異細胞を選別・維持した (図 13 A, B, B', B'')。抗 Shh 抗体 (Santa Cruz) と抗 HA 抗体 (Santa Cruz) を用いた Western blotting を行い，Swiss-3T3 変異細胞の Shh と Wnt-5a (HA タグ付加) タンパクの強制発現を確認した (図 13 C)。

一方，エナメル芽細胞株は，I 型コラーゲンで表面処理された培養皿とカルシウム不含の S-MEM/10%FBS/L-グルタミン/10ng/mlEGF 培地を用いて培養・維持した (図 13 D)。

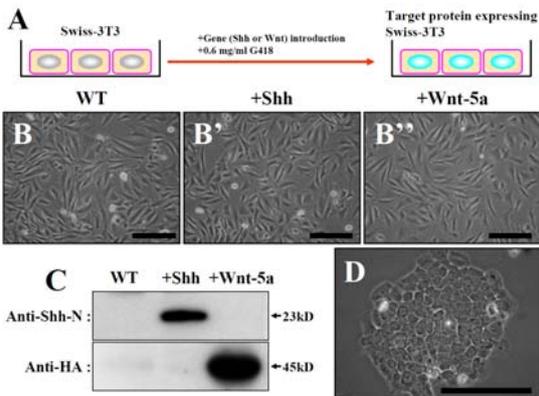


図13 培養細胞の特性
 発現ベクターが導入された Swiss-3T3 は，G418 存在下で選別される (A)。遺伝子導入による Swiss-3T3 の形態は変化せず，増殖時間も同等であった (B, B', B'')。Western blotting で，Swiss-3T3 変異細胞から Shh と Wnt-5a の強制発現が観察された (C)。また，エナメル芽細胞株は，直径 15~20 μ m で小型の数石状の形態を示し，エナメル芽細胞のマーカーである Tuftelin, Amelogenin を発現している (D)。Scale bars = 100 μ m

②上皮-間葉相互作用を応用したエナメル芽細胞と Swiss-3T3 の共培養

a) Swiss-3T3 あるいはその変異細胞を I 型コラーゲンで表面処理された培養皿に播種した。翌日，3 倍数のエナメル芽細胞を Swiss-3T3 の上に播種し，D-MEM/10%FBS/10ng/mlEGF 培地で 2 週間の共培養を行った。また，b) マイトマイシン C で Swiss-3T3 を薬剤処理し，Swiss-3T3 の細胞分裂を停止させた後，エナメル芽細胞を播種し，2 週間の共培養を行った (図 14)。

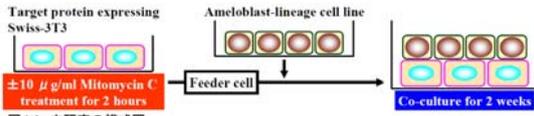


図14. 本研究の模式図
 (参考) Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6(3): 331-343, 1975.

【結果】

a) Mitomycin C で薬剤処理を行わない場合

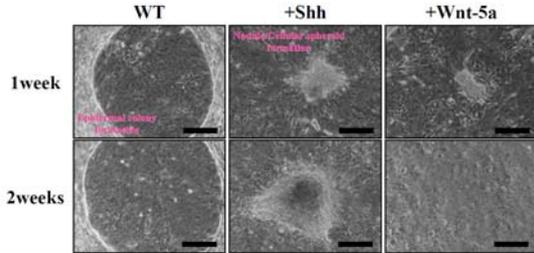


図15. エナメル芽細胞の増殖と形態変化
 共培養により、エナメル芽細胞由来のコロニーが観察された。コロニー中のエナメル芽細胞はほぼ均一な小型の数石状の形態を維持し、そのコロニーは経時的に増大した。また、野生型Swiss-3T3群に対して、ShhあるいはWnt-5a発現群では、コロニー形成が促進した。さらに、Shh発現群では、コロニーの中に細胞塊が観察され、その細胞塊も経時的に増大した。Scale bars=100 μm

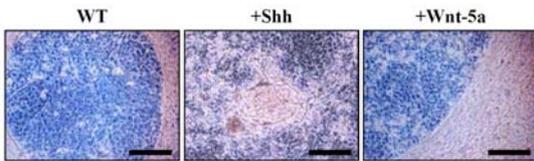


図16. エナメル芽細胞の石灰化への影響
 培養2週間後にアリザリンレッド染色を行い、Shh発現群で観察された細胞塊内部へのカルシウム沈着を解析したところ、細胞塊内部への石灰化現象は認められなかった。Scale bars=100 μm

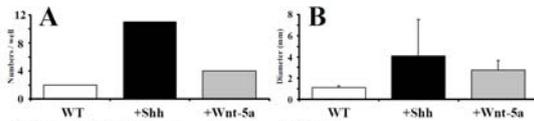


図17. エナメル芽細胞のコロニー数とコロニーの最大径
 2週間培養後のそれぞれのコロニー数(A)とコロニー最大径の平均(B)のグラフを示す。コロニーの数は、野生型に対して、Shh発現群では5.5倍に、Wnt-5a発現群では2倍に増加した。また、最大径は、野生型に対して、Shh発現群では3.7倍に、Wnt-5a発現群では2.5倍に拡大した。
 以上により、ShhとWnt-5aは、エナメル芽細胞の増殖に關与し、その作用はShhがWnt-5aより強いことが示唆された。しかし、コロニー形成をより促進するためには、feeder細胞であるSwiss-3T3の増殖を抑制する必要があると考えられた。

b) Mitomycin C で薬剤処理を行う場合

Mitomycin C : 抗癌剤の一種で、DNA 合成阻害やDNA断片化により、細胞増殖を抑制する。

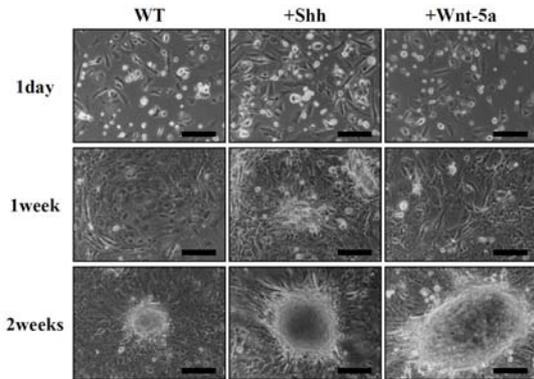


図18. エナメル芽細胞の増殖と形態変化
 エナメル芽細胞のコロニーは、経時的に拡大した。1週間共培養を行うと、Shh発現群で細胞塊が観察された。2週間では、野生型群、Shh発現群およびWnt-5a発現群全てに細胞塊が形成された。細胞塊の大きさは、野生型に対して、Shh発現群とWnt-5a発現群で有意に増大した。Scale bars=100 μm



図19. エナメル芽細胞の石灰化への影響
 アリザリンレッド染色を行い、野生型群、Shh発現群およびWnt-5a発現群全てに観察された細胞塊内部へのカルシウム沈着を解析したところ、細胞塊内部への石灰化現象はみられなかった。Scale bars=100 μm

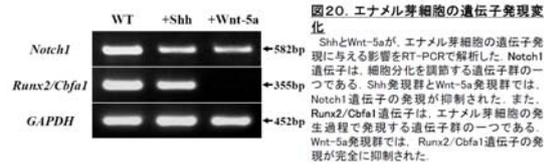


図20. エナメル芽細胞の遺伝子発現変化
 ShhとWnt-5aが、エナメル芽細胞の遺伝子発現に与える影響をRT-PCRで解析した。Notch1遺伝子は、細胞分化を調節する遺伝子群の一つである。Shh発現群とWnt-5a発現群では、Notch1遺伝子の発現が抑制された。また、Runx2/Cbfa1遺伝子は、エナメル芽細胞の発生過程で発現する遺伝子群の一つである。Wnt-5a発現群では、Runx2/Cbfa1遺伝子の発現が完全に抑制された。

【結論】

以上により、Swiss-3T3 は、エナメル芽細胞を未分化な状態で増殖させる因子を分泌している可能性が示唆された。また、Shh と Wnt-5a は、エナメル芽細胞における Notch1 や Runx2/Cbfa1 の発現を調節し、エナメル芽細胞の増殖、形態形成および分化に關与すると考えられた。

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4件)

- ① 本間高志, 中田 憲, 福田雅幸: 口腔癌に対する皮下埋め込み式リザーバーを用いた逆行性超選択的動注化学療法の実験. *頭頸部癌*, 38(1), 21-25, 2012. 査読有.
- ② 田中清志, 福田雅幸, 成田王彦, 高野裕史, 中田 憲, 古谷博子, 神谷修: 閉塞型睡眠時無呼吸症候群の治療に用いる口腔内装置の咬合採得器具の使い方. *日本歯科技工学会雑誌*, 32(2), 109-115, 2012. 査読有.
- ③ 大淵真彦, 高野裕史, 伊藤 悠, 桑島精一, 中田 憲, 福田雅幸: 口腔癌における外部放射線治療による白血球減少症に対するセファランチン投与の効果. *アルカロイド研究会会誌*, 36, 99-102, 2010. 査読無.
- ④ 成田王彦, 大平俊明, 田中清志, 古谷博子, 高野裕史, 中田 憲, 福田雅幸: 歯科用レジンと CaCO₃-MgO 粉末から製作された義歯における in vitro 細菌付着の改善. *日本歯科技工学会雑誌*, 30(2), 78-85, 2010. 査読有.

〔学会発表〕(計4件)

- ① 中田 憲, 桑島精一, 山崎雅人, 高野裕史, 福田雅幸: 間質系細胞の支持と形態形成タンパクがエナメル芽細胞の増殖と分化に与える影響. 第56回(社)日本口腔外科学会総会・学術大会(2011年10月21日, 大阪)

- ② 中田 憲, 本間高志, 高野裕史, 福田雅幸 : 舌扁平上皮癌, 頸部リンパ節転移に対する口腔と頸部の分離手術に関する臨床的検討. 第 35 回日本頭頸部癌学会 (2011 年 6 月 9 日, 愛知)
- ③ 中田 憲, 桑島精一, 高野裕史, 福田雅幸 : 歯由来細胞株を用いた歯の再生医療の開発. 第 5 報 : マウス皮下におけるエナメル芽細胞の特性. 第 55 回 (社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 (2010 年 10 月 17 日, 千葉)
- ④ 中田 憲, 高野裕史, 福田雅幸 : 外側咽頭後リンパ節転移を生じた硬口蓋癌と上歯肉癌の 2 例に関する臨床的検討. 第 34 回日本頭頸部癌学会 (2010 年 6 月 10 日, 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 憲 (NAKATA AKIRA)
秋田大学・医学部・助教
研究者番号 : 50400510

(2) 研究分担者

なし.

(3) 連携研究者

なし.