

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791977

研究課題名(和文)末梢血間葉系幹細胞の歯牙構成細胞への分化誘導

研究課題名(英文) Differentiation induction of mesenchymal stem cells in the peripheral blood into tooth structure forming cells

研究代表者

辻極 秀次 (Tsujigiwa, Hidetsugu)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：70335628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では末梢血に含まれる骨髄由来幹細胞から象牙芽細胞を誘導することを目的に、歯髄組織および骨髄組織からの細胞樹立、細胞の分化制御、細胞の生化学的、組織学的解析を行った。その結果、ラット歯髄組織から今後の歯牙再生研究に有用と考えられる細胞の樹立に成功した。また骨髄組織から得られた細胞の解析により、骨髄組織には複数の幹細胞が存在する可能性が示唆された。以上の成果は、今後の歯科再生医療における骨髄由来幹細胞の新たな可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Aiming the differentiation induction into odontoblasts from mesenchymal stem cells in the peripheral blood, establishment of the cells from dental pulp and bone marrow were performed. Their differentiation characterization was assessed by biochemical and histological analyses. The cells established from dental pulp expressed odontoblast specific markers, and was capable of generating dentin tissue. In the study on GFP transplantation model, bone marrow derived cells were established as a peripheral blood derived cells. The analyses of this primary culture cells revealed that stem cell like cells exist in the bone marrow, which can differentiate into tooth structure forming cells in vivo. However, some cells, which also possess pluripotency, would not be engrafted by transplantation. These data indicated the possible presence of different types of stem cells in the bone marrow. These cells are encouraging cells that possess the possibility of new innovation in the regenerative dentistry.

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：象牙質 骨髄 再生

1. 研究開始当初の背景

近年、骨髄幹細胞の多分化能が明らかになり、さまざまな臓器において幹細胞の関与が報告されている。心筋梗塞や脳梗塞等、一部の疾患では実際に骨髄細胞を用いた臨床応用が始まっており、現状では ES 細胞や iPS 細胞を用いるより実践的で確実な治療法として期待されている。また最近、末梢血中にも幹細胞が含まれることが明らかにされており、その採取容易な特性から骨髄幹細胞に代わる細胞として注目が集まっている。

一方、歯科分野では歯髄や歯胚由来の細胞を用いた再生医療研究が多数報告されている。歯胚を用いた研究では、マウス歯胚から得られた上皮および間葉系細胞から、エナメル質を含むほぼ完全な歯の構築に成功している。これらの研究は歯科分野における再生医療研究を躍進させた偉大な功績である。しかしながら歯髄および歯胚を用いる方法は、自身の生活歯、あるいは他家歯胚を用いる必要性があり、健全な歯の損失、倫理面、免疫原性等、様々な問題点から実際に再生医療に用いることは困難である。

2. 研究の目的

我々は現在までに骨髄幹細胞の多分化能に関する研究を行ってきた。骨髄幹細胞の歯牙構成細胞への分化能に関する研究では、GFP トランスジェニックマウス骨髄細胞移植実験系において、骨髄由来細胞が軟組織のみならず、骨芽細胞、破骨細胞、および歯牙構成細胞等の硬組織構成細胞へ分化することを確認している。また GFP トランスジェニックラット歯髄組織から象牙芽幹細胞株の樹立を試みており、現在までに数十代経代培養を経過した細胞においても、安定した増殖性、性格を示す細胞を得つつある。

以上のことから、末梢血中に含まれる骨髄由来幹細胞は歯牙構成細胞への分化能を有しており、歯髄から得られた象牙芽幹細胞株を詳細に解析し、骨髄由来幹細胞を歯牙構成細胞へとリプログラミングすることにより、歯牙再生のための幹細胞として使用できる可能性は大きいとの発想に至った。

そこで本研究では歯の再生に用いる新規細胞供給源を開拓するため、骨髄組織および歯髄組織からの細胞樹立、細胞の分化制御、細胞の生化学的、組織学的解析を行い、末梢血中に含まれる骨髄由来幹細胞の歯科再生臨床応用に向けての基礎的研究データを蓄積することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 象牙芽幹細胞の樹立と細胞の性状解析

GFP ラット歯髄組織から得られた細胞の経代を継続し、80代を経過した時点で、細胞の分化誘導実験を行った。なお細胞の培養条件は 10% FBS 含有 D-MEM にて 37 °C、5% CO₂ 存在下で行い、コンフルエントに達した後経代を行った。細胞の分化誘

導実験は培養細胞がコンフルに達した時点で、BMP-2 100ng/ml および α -glycerophosphate 2mM、アスコルビン酸 50 μ g/ml を添加した石灰化培地で誘導を行い、ALP 活性の測定、比較を行った。石灰化培地による細胞の長期観察では、象牙芽幹細胞を α -GP 含有石灰化培地にて培養を行い、細胞の変化について形態学的に観察した。また細胞の石灰化について定量分析を行うため、上記条件にて石灰化誘導を行い、経時的に細胞を回収、アリザリンレッドで染色、倒立顕微鏡にて観察を行うとともに、染色色素を溶出、分光光度計によるカルシウム量の測定を行った。

象牙芽幹細胞の石灰化についての超微細構造学的解析は、電子顕微鏡を用いて行った。細胞を石灰化培地で 14 日目培養、2% グルタルアルデヒド/2% PFA にて固定後、エポキシ樹脂包埋、ウラン鉛染色を施し H7100S 透過型電子顕微鏡を用いた観察した。

(2) 象牙芽幹細胞のマイクロアレイ解析

象牙芽幹細胞のリプログラミング因子候補を探究するため、石灰化誘導過程における発現遺伝子の網羅的解析を行った。細胞を石灰化培地にて 5 日間培養、石灰化誘導した細胞と、コントロールとして通常培地で培養した細胞から mRNA を抽出、cDNA を合成し、それぞれ Cy5 および Cy3 で標識を行った。その後スライドガラス上の DNA とハイブリダイズシグナルを検出、データ解析を行い、細胞の石灰化に関与して増減する遺伝子を抽出した。

(3) 骨髄組織からの細胞樹立と性状解析

現在までの研究から末梢血に含まれる幹細胞は骨髄組織から流出し、生体内を血流に乗って移動していると考えられるため、前段階として骨髄組織中に含まれる幹細胞の解析を行った。細胞の樹立は GFP マウスを用いて行った。GFP マウスをエーテル麻酔下にて屠殺し大腿骨および脛骨を摘出、抗生剤を含む培地で骨髄細胞を洗浄後、細胞を回収した。また骨髄細胞回収後の骨組織は機械的に粉碎、コラーゲナーゼ、ディスパーゼ酵素溶液にて処理を行い、細胞を回収した。回収した骨髄細胞および粉碎骨から得られた細胞については、細胞の増殖能、多分化能、石灰化能、硬組織形成能について解析を行った。

(4) 骨髄幹細胞の由来および性状解析

骨髄幹細胞と末梢血中に存在する細胞がどのような関連にあるのか確かめるため、骨髄移植処置を行ったマウス骨髄から得られた細胞の解析を行った。

GFP マウス大腿骨および脛骨から骨髄細胞を回収した後、GFP マウスと同系の 6 週齢野生型マウス (雌) に X 線照射を行い尾静脈から 1×10^7 個の細胞を移植した。移植

後1ヶ月後に大腿骨および脛骨を摘出、骨髓細胞を回収し、細胞の由来について検討するため、継代にしたがって変化するGFP陽性細胞率、細胞の形態、細胞の増殖能、多分化能の検討を行った。またコンフルエントに達した細胞を石灰化培地にて培養、SCIDマウス背部皮下に細胞を移植し、形成される硬組織について解析した。

4. 研究成果

(1) 象牙芽幹細胞の樹立と細胞の性状解析

樹立した象牙芽幹細胞は、BMP-2で誘導した場合に比べて、-GP含有石灰化培地で培養を行った細胞群がより高いALP活性を示した。石灰化培地で象牙芽幹細胞を培養すると、培養2日の早期より細胞外に線維状の細胞外基質の産生が認められ、培養14日では細胞外基質により細胞の殆どが被われ観察できなくなった。また線維状細胞外基質は複雑に絡み合い、シャーレ底面から細胞と共に容易に剥離可能なシート状形態を呈していた。石灰化培地で培養した細胞をアリザリンレッドで染色を行うと、線維状細胞外基質にアリザリンレッド陽性を示したことから、線維状細胞外基質に直接カルシウムの沈着が生じていると考えられた。カルシウム量の定量を行ったところ、線維性細胞外基質が出現する培養2日後から僅かにカルシウムの検出が認められ、培養日数の経過に伴ってカルシウム量の増加が確認された。樹立した象牙芽幹細胞株の経代を持続したところ、経代80代を超えても細胞の増殖能、細胞形態、GFP産生能を保持しており、また各分化誘導実験においても安定的な性格を示した。

電子顕微鏡による観察では象牙芽幹細胞が産生するコラーゲン基質の石灰化について焦点を絞り解析を行った。培養細胞は二重幕で被われた形態的に基質小胞と考えられる構造物を形成していた。また基質小胞を核としてコラーゲン基質上でカルシウム針状結晶が成長する様子が観察され、正常の象牙質が石灰化する過程と非常に類似した石灰化過程をとることが考えられた。

(2) 象牙芽幹細胞のマイクロアレイ解析

マイクロアレイ法により遺伝子発現量変化の解析を行った結果、誘導前の細胞と比較して石灰化培地で培養した細胞ではDMP1が240倍、Osteocalcin、Bone sialoprotein2が約20倍、Ameloblastinが約10倍と歯および骨に関連する遺伝子発現量の著しい増加が認められた。

マイクロアレイ法にて発現量の増減が著しかった遺伝子の中でも特に歯組織との関連が深いDMP1およびDSPPに関して、RT-PCR法によって発現の確認を行った。In vitro条件下においてDSPPは石灰化培地による誘導初期では殆ど発現が認められなかったが、細胞誘導2日目から弱いながらも遺伝子発現が確認され、誘導7目で遺伝子発現のピーク

が認められた。DMP1は石灰化誘導前から若干の発現を認めた。DMP1は石灰化培地による誘導で発現量は著しい増加を示し誘導7日目に最大発現量となり、その後も高い発現量を維持した。

(3) 骨髓組織からの細胞樹立と性状解析

骨髓組織からの幹細胞の樹立では、GFPトランスジェニックマウスの骨髓組織および粉碎骨組織からの細胞樹立を試みた。長期間の継代培養では骨髓由来の細胞は継代を経るごとに増殖活性を消失したが、粉碎骨から得られた細胞では高い増殖活性を長時間保っていた。骨髓から得られた細胞と粉碎骨から得られた細胞の形態には相違が見られ細胞の種類が異なると考えられた。また粉碎骨から得られた細胞は、in vitro条件における石灰化培地によりアリザリンレッド染色陽性を示し、軟骨細胞および脂肪細胞への分化能も確認されたことから、骨髓由来の幹細胞である可能性が示唆された。

(4) 骨髓幹細胞の由来および性状解析

GFPマウス骨髓細胞の移植を行ったマウス骨髓組織からの細胞樹立および解析を試みたところ、培養初期ではシャーレ底面に付着する細胞の殆どはGFP陽性を示していたが、経代を重ねるごとに紡錘形のGFP陰性細胞の出現頻度が増加した。これらの細胞を石灰化誘導および脂肪誘導を行ったところ、骨芽細胞、脂肪細胞に分化した。現時点では分化した細胞の由来は断定できないが、粉碎骨から得られた高い増殖能を示す細胞はGFP陰性細胞であると考えられ、従来報告されている細胞と性格が異なる可能性が考えられた。象牙芽幹細胞および骨髓由来細胞の実験動物生体内条件下における細胞分化について検討した結果、双方ともSCIDマウス生体内で硬組織の形成が認められた。象牙芽幹細胞が形成する硬組織は細胞が基質に対して垂直に配列など象牙質に類似した構造が認められたが、免疫染色による検討では骨髓由来細胞が形成する硬組織と類似していた。

以上の結果より、今後の歯牙再生研究に有用と考えられる細胞の樹立に成功した。また骨髓組織から得られた細胞の解析により、骨髓組織には複数の幹細胞が存在する可能性が示唆された。これらの成果は、今後の歯科再生医療における骨髓由来幹細胞の新たな可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

Tsuji-giwa H, Katase N, Lefevre M, Yamachika E, Tamamura R, Ito S, Takebe Y, Matsuda H, Nagatsuka H. Establishment of odontoblastic cells, which indicate odontoblast features both in vivo and in vitro. J Oral Pathol Med. 42(10):799-806. 2013.

doi: 10.1111/jop.12080. 査読有
Tsujigiwa H, Hirata Y, Katase N, Buery RR, Tamamura R, Ito S, Takagi S, Iida S, Nagatsuka H. The Role of Bone Marrow-Derived Cells During the Bone Healing Process in the GFP Mouse Bone Marrow Transplantation Model. *Calcif Tissue Int.* 92(3):296-306. 2013. doi: 10.1007/s00223-012-9685-3. 査読有
Yuan Y-W, Tamamura R, Lei L, Katase N, Ara S G, Ito S, Tsujigiwa H, Nagatsuka H. The Ability of Transplanted Bone Marrow-Derived Cells to Differentiate into Parenchymal Cells of Salivary Glands. *J Hard Tissue Biology.* 22(4):433-438. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.2485/jhtb.22.433> 査読有
Tomida M, Tsujigiwa H, Nakano K, Muraoka R, Nakamura T, Okafuji N, Nagatsuka H, Kawakami T. Promotion of Transplanted Bone Marrow-derived Cell Migration into the Periodontal Tissues due to Orthodontic Mechanical Stress. *Int J Med Sci.* 10(10):1321-1326. 2013. doi: 10.7150/ijms.6631. 査読有
Noda Y, Nishizaki K, Yoshinobu J, Orita Y, Tsujigiwa H, Yamada M. The engraftment and differentiation of transplanted bone marrow-derived cells in the olfactory bulb after methimazole administration. *Acta Otolaryngol.* 133(9):951-956. 2013. doi: 10.3109/00016489.2013.803153. 査読有
Yamachika E, Tsujigiwa H, Matsubara M, Hirata Y, Kita K, Takabatake K, Mizukawa N, Kaneda Y, Nagatsuka H, Iida S. Basic fibroblast growth factor supports expansion of mouse compact bone-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and regeneration of bone from MSC in vivo. *J Mol Histol.* 43(2):223-33. 2012. doi: 10.1007/s10735-011-9385-8. 査読有
Inoue M, Rodriguez AP, Nagai N, Nagatsuka H, Legeros RZ, Tsujigiwa H, Inoue M, Kishimoto E, Takagi S. Effect of Fluoride-substituted Apatite on In Vivo Bone Formation. *J Biomater.* 25(8):811-824. 2011. doi: 10.1177/0885328209357109. 査読有
Tsujigiwa H, Katase N, Sathi GA, Buery RR, Hirata Y, Kubota M, Nakano K, Kawakami T, Nagatsuka H. Transplanted bone marrow-derived cells differentiated to tooth, bone and connective tissue in mice. *J Hard Tissue Biology.* 20(2):147-152. 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.2485/jhtb.20.147> 査読有
村岡 理奈, 辻極 秀次, 中野 敬介, 片瀬直樹, 玉村 亮, 富田 美穂子, 岡藤 範正, 長塚 仁, 川上 敏行。移植骨髄由来細胞の歯周組織への移動と細胞分化。 *J Hard Tissue Biology.* 20(4):301-306. 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.2485/jhtb.20.301> 査読有

Nishizaki K, Yoshinobu J, Tsujigiwa H, Orita Y, Yamada M. The early administration of granulocyte colony-stimulating factor increases the engraftment of transplanted bone marrow-derived cells into the olfactory epithelium damaged by methimazole. *Rhinology.* 48(2):228-232. 2010. doi: 10.4193/Rhin09.100. 査読有

[学会発表](計6件)

河合 穂高、骨治癒過程における骨髄由来細胞の関与、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、平成25年9月22日、岡山
辻極 秀次、骨治癒過程における骨髄由来細胞の動態および機能解析、第54回歯科基礎医学会学術大会・総会平成24年9月16日、福島

袁 瑤薇、骨髄由来細胞の唾液腺組織構成細胞への分化能についての検討、第21回硬組織再生生物学会学術大会・総会、平成24年08月25日、愛知

Mihoko Tomida, Migration of the transplanted bone marrow-derived cells into periodontal ligaments due to orthodontic mechanical stress, *Physiology* 2012, 平成24年07月03日, Edinburgh, England

辻極 秀次、ラット歯髓組織からの象牙芽細胞株の樹立、第65回NPO法人日本口腔科学会学術集会、平成23年4月21日、東京

辻極 秀次、骨髄幹細胞の歯・骨組織構成細胞への分化能についての検討、第52回歯科基礎医学会学術大会・総会、平成22年9月22日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA HIDE TSUGU)
岡山大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・准教授
研究者番号：70335628

(2) 研究協力者

長塚 仁 (NAGATSKA HITOSHI)
岡山大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号：70237535