

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3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890118

研究課題名（和文）

歯髄、歯根膜由来幹細胞の分化制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）

Differentiation control mechanisms of dental pulp, periodontal ligament-derived stem cells

研究代表者

富田 奈緒 (TOMITA NAO)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：90580184

研究成果の概要（和文）：抜去歯牙から採取したヒト歯髄培養細胞およびヒト歯根膜細胞から、歯髄細胞由来幹細胞と歯根膜細胞由来幹細胞の単離を行い、脂肪細胞への分化に関わる、メチル化サイレンシングを受けた DNA の網羅的探索を行うことにより、それに関わる分化制御システムを明らかにし、さらに、詳細に幹細胞の性質を比較し、脂肪細胞以外の細胞種への分化制御も明らかにすることで再生医療に貢献できると考えた。まず、抜去歯から分離したヒト歯根膜細胞、歯髄細胞を細胞培養ディッシュ上で採取した。次に、フローサイトメトリーを用いて、SSEA-4 陽性細胞をヒト歯根膜組織、歯髄組織にて単離した。その単離した細胞からゲノム DNA を採取し、MIAMI 法を用いてメチル化している遺伝子を網羅的に解析した。MIAMI 法を用いてメチル化している遺伝子を網羅的に解析したが、直接脂肪細胞への分化制御に関わる因子の特定には至らなかった。しかし、それぞれの幹細胞からゲノムサンプルを採取できた点、かつ脂肪細胞への分化能以外の相違点について、今後検討を進める基盤となり、意義あるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Our office already reported the difference of adipocyte differentiation ability between stem cells derived from periodontal ligament and dental pulp. The purpose of my study has become clear the relationship between differentiation ability for adipocyte and genome DNA methylation. At first, I gathered extracted teeth from patients be received orthodontic treatment with teeth extraction. After the sells were increased by culture, they were isolated from human periodontal ligament and dental pulp. Next, we selected and soated stem cells labeled SSEA-4 by using flowcytometry from the derived cells from human periodontal ligament tissue and dental pulp. Finally, we undergone comprehensive methilation analysis of genomic DNA collected from the cells with MIAMI method. As a result, we couldn't find the methylated gene accurately participate in adipocyte differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	930,000	279,000	1,209,000
2011年度	1,030,000	309,000	1,339,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,960,000	588,000	2,548,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 矯正治療において便宜抜歯を行うこととなった抜去歯牙から採取した、ヒト歯髓培養細胞およびヒト歯根膜細胞から、歯髓細胞由来幹細胞と歯根膜細胞由来幹細胞の単離を行い、脂肪細胞への分化に関わる、メチル化サイレンシングを受けた DNA の網羅的探索を行うことにより、それに関わる分化制御システムを明らかにし、さらに、詳細に幹細胞の性質を比較し、脂肪細胞以外の細胞種への分化制御も明らかにすることで再生医療に貢献できると考えた。

(2)そこで、歯根膜組織、歯髓組織に多彩な分化能を持つ幹細胞が存在すること、また、細胞表面抗原 SSEA-4 を用いてフローサイトメトリーを行うことで、これらの分化能を持つ細胞を効率よく採取し、この方法によって得られた細胞を用いて、プロモーターがメチル化された分化能に関わる遺伝子を MIAMI 法によって検索し、さらにその領域をバイサルシーケンシング法にて特定することとした。

(3)これまで申請者が所属する研究室の研究成果として、矯正治療において抜歯した歯牙から採取した歯髓組織ならびに歯根膜組織に多分化を有する細胞が一定の割合で存在し、さらに歯髓組織由来幹細胞と歯根膜組織由来幹細胞が非常に似た性質を有していること、両細胞種の大きな違いとして歯髓由来幹細胞のみが脂肪細胞への分化が制限されているという事実を明らかにしてきた。この分子機構を明らかにすることは、幹細胞の分化能を知る手がかりとなる。

(4)一方、クロマチンへの後天的な修飾によって、DNA の塩基配列を変化させることなく、遺伝子発現を選択的に活性化・不活性化させる後天的な制御に注目が集まっている。

(5)これらのことから、歯根膜組織由来幹細胞と歯髓組織由来幹細胞の分化能の違いにエピジェネティクス修飾が関与しているのではないかという発想に至った。

2. 研究の目的

(1) 矯正治療の便宜抜歯において抜去され

た抜去歯牙から採取したヒト歯髓培養細胞およびヒト歯根膜細胞から、歯髓細胞由来幹細胞と歯根膜細胞由来幹細胞の単離を行い、脂肪細胞への分化に関わる、メチル化サイレンシングを受けた DNA の網羅的探索を行うことにより、それに関わる分化制御システムを明らかにし、さらに、詳細に幹細胞の性質を比較し、脂肪細胞以外の細胞種への分化制御を明らかにすることとした。

(2)歯根膜組織、歯髓組織に多彩な分化能を持つ幹細胞が存在すること、また、細胞表面抗原 SSEA-4 を用いてフローサイトメトリーを行うことで、これらの分化能を持つ細胞を効率よく採取し、この方法によって得られた細胞を用いて、プロモーターがメチル化された分化能に関わる遺伝子を MIAMI 法によって検索し、さらにその領域をバイサルシーケンシング法にて特定することを目的とした。これまで申請者が所属する研究室の研究成果として、矯正治療において便宜抜歯することとなり抜歯した歯牙から採取した歯髓組織ならびに歯根膜組織に多分化を有する細胞が一定の割合で存在し、さらに歯髓組織由来幹細胞と歯根膜組織由来幹細胞が非常に似た性質を有していること、両細胞種の大きな違いとして歯髓由来幹細胞のみが脂肪細胞への分化が制限されているという事実を明らかにしてきた。歯根膜組織由来幹細胞と歯髓組織幹細胞は非常に似た分化能を持つが、歯髓組織由来幹細胞のみが脂肪細胞への分化が制限されている。

(3)この分子機構を明らかにすることは、幹細胞の分化能を知る手がかりとなる。この分化能の違いに、エピジェネティクス修飾が関与しているのではないかと考えたため、この分化機構を明らかにすることとした。

(4)そこで、歯根膜組織、歯髓組織に多彩な分化能を持つ幹細胞が存在すること、また、細胞表面抗原 SSEA-4 を用いてフローサイトメトリーを行うことで、これらの分化能を持つ細胞を効率よく採取することとする。分離されていない細胞、単離されたヒト歯髓細胞を培養、増殖し、脂肪細胞へと分化することを Oil red O 染色によって確認することとする。

(5)この方法によって得られた細胞を用いて、プロモーターがメチル化された分化能に関わる遺伝子を MIAMI 法によって検索し、さ

らにその領域をバイサルシークエンシング法にて特定することが目的である。

(6)さらに、それに関わる分化制御システムを明らかにし、さらに、詳細に幹細胞の性質を比較し、脂肪細胞以外の細胞種への分化制御も明らかにすることで再生医療に貢献することが本研究の目的であった。

3. 研究の方法

(1)まず、矯正治療のために抜歯することになった歯牙に付着する歯髄組織と歯根膜組織を患者の同意のもとで細胞培養ディッシュ上で採取し、培養増殖させ、フローサイトメトリーによって分化能を有する細胞を単離することとする。矯正治療のために抜歯することになった歯牙に付着している歯髄細胞と歯根膜細胞に関しては、実験によるエラーを減じるため、それぞれ複数の抜去歯牙から、それぞれ、ヒト歯根膜細胞、ヒト歯髄細胞を採取することとする。

(2)具体的には、矯正治療において抜去された抜去歯牙に付着している歯髄組織および歯根膜組織を細胞培養し、それから採取したヒト歯髄培養細胞およびヒト歯根膜細胞から、歯髄培養由来幹細胞と歯根膜細胞由来幹細胞の単離を行うこととする。

(3)分離されていない細胞、単離されたヒト歯根膜細胞を培養、増殖させた結果、脂肪細胞へと分化することを確認するため、Oil red O染色を行うことによって確認することとする。

(4)次に、歯根膜組織、歯髄組織に多彩な分化能を持つ幹細胞が存在すること、また、細胞表面抗原 SSEA-4 を用いてフローサイトメトリーを行うことで、これらの分化能を持つ細胞を効率よく採取する。

(5)この方法によって得られた細胞を用いて、プロモーターがメチル化された分化能に関わる遺伝子を MIAMI 法によって検索し、さらにその領域をバイサルシークエンシング法にて特定することとしたため、脂肪細胞への分化に関わる、メチル化サイレンシングを受けた DNA の網羅的探索を行うこととした。具体的には、脂肪細胞への分化に関わる、メチル化サイレンシングを受けた DNA の網羅的探索を行うこととした。このメチル化サイレンシングを受けた DNA の網羅的探索を行うため、それぞれの幹細胞から採取したゲノムサンプルを網羅的なメチル化のスクリーニング検査を行うこととした。その後、同定した遺伝子の発現様態と機能解析を行うことと

した。

(6)さらに、詳細に幹細胞の性質を比較し、脂肪細胞以外の細胞種への分化制御も明らかにすることとした。

4. 研究成果

(1)歯髄細胞由来幹細胞と歯根膜細胞由来幹細胞の採取と培養組織からの幹細胞の単離、脂肪細胞への分化に関わる、メチル化サイレンシングを受けた DNA の網羅的探索を行った。

(2)具体的には、矯正治療において抜去された抜去歯牙から分離したヒト歯根膜細胞、歯髄細胞を細胞培養ディッシュ上で採取し、抜去歯牙から採取したヒト歯髄培養細胞およびヒト歯根膜細胞から、歯髄細胞由来幹細胞と歯根膜細胞由来幹細胞の単離を行った。

(3)次に、細胞表面抗原 SSEA-4 を用いてフローサイトメトリーを行うことで、これらの分化能を持つ細胞を効率よく採取し、SSEA-4 陽性細胞をヒト歯根膜組織、歯髄組織にて単離した。それぞれの培養組織には様々な細胞種が含まれているため、フローサイトメトリーによって分化能を有する細胞を単離した。

(4)まず、分離されていない細胞、単離されたヒト歯根膜細胞、単離されたヒト歯髄細胞をそれぞれ細胞培養ディッシュ上で培養、増殖した。実験によるエラーを減じるため、それぞれ複数のヒト歯根膜細胞、ヒト歯髄細胞を採取した。

(5)その結果、分離されていない細胞、単離されたヒト歯髄細胞を培養、増殖した結果、特別な変化は認められなかったが、単離されたヒト歯根膜細胞を培養、増殖させると、脂肪細胞へと分化することが Oil red O 染色によって確認できた。これらの細胞をより詳細に検討することで、少なくとも脂肪細胞への分化条件と、それに関わる分化制御システムを明らかにできる可能性が高くなった。

(6)単離されたヒト歯根膜細胞、およびヒト歯髄細胞から歯髄細胞由来幹細胞と歯根膜細胞由来幹細胞を単離し、それらからゲノム DNA を採取し、MIAMI 法を用いてメチル化している遺伝子を網羅的に解析した。

(7)MIAMI 法を用いてメチル化している遺伝子を網羅的に解析したが、明らかに脂肪細胞への分化を制御する部位の特定には至らなかった。しかし、それぞれの幹細胞からゲノムサンプルを採取できた点、かつ脂肪細胞への分化能以外の相違点について、今後検討を

進める基盤となり、意義あるものと考えられる。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 奈緒 (TOMITA NAO)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：20335615

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者