

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659908

研究課題名（和文）歯肉間葉系幹細胞による象牙質硬組織の誘導・形成に関する挑戦的研究

研究課題名（英文）Isolation of mesenchymal stem cells for induction of dental hard tissue from rat gingiva.

研究代表者

飯塚 正（IIZUKA TADASHI）

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：80168062

研究成果の概要（和文）：本研究においては、象牙質などの歯牙硬組織形成能を有する間葉系幹細胞を歯肉組織から探索した。Wistar Rat より採取した歯肉組織より間葉系細胞を培養し、培養細胞中に数は少ないものの STRO-1 抗体陽性細胞が認められた。また、osteogenic differentiation の検索よりこのような細胞が硬組織形成能を有する事が認められた。以上の結果より歯肉由来間葉系幹細胞の存在が明らかとなり、また、このような細胞から将来的には歯牙硬組織形成細胞への分化の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was examined the localization of mesenchymal stem cells in the gingiva and evaluated multilineage differentiation capacity of these cells. As a result, we demonstrated the presence of cells positive for the mesenchymal stem cell marker STRO-1 in the rat gingival tissue. These STRO-1 positive cells also indicated osteogenic differentiation. In this study, it was thought that gingival stem cells has a possibility for induction of dental hard tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：口腔病理学

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：再生歯学、歯肉、間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

成熟した歯髄や歯根膜などの組織に多能性幹細胞が存在し(Seo et al. Lancet 2004, Miura et al. ProNAS 2003)、それらから骨、象牙質などの硬組織の形成が報告されている。一方、歯肉は他の組織に比べ生体への侵襲が少なく比較的簡便に組織を入手できるという大きなメリットがあり、硬組織の再生のソースとして非常に有効な候補と成り得ると考えられる。しかしながら、歯肉由来間葉系幹細胞の硬組織形成に関しては不明な点が多い。そこで、今回申請者は、適切な環境因子が確立できれば歯肉由来間葉系幹細胞からの歯牙硬組織の誘導・形成は可能ではないかと考え本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は歯肉由来間葉系幹細胞から歯牙硬組織を誘導・形成させる新たな技法の確立を行うものである。

すなわち、ラット歯肉組織から間葉系幹細胞マーカー(STRO-1)を用い幹細胞を分離、同定し、そのような細胞の硬組織形成能を探索する。

## 3. 研究の方法

(1) 歯肉由来間葉系幹細胞の樹立

① 歯肉組織における間葉系幹細胞の検索

生後6週齢のWistar Ratの上下顎骨を採取し、10%中性緩衝ホルマリンにて十分に固

定した後、10%EDTA 溶液で脱灰を行った。脱灰終了後、通法に従いパラフィン包埋・ブロックを作製し、4 $\mu$ m の薄切切片を免疫染色に使用した。切片は、脱パラフィン・水洗後、EDTA buffer (pH 9.0) を用いて圧力鍋法により抗原賦活化処理を行った。3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの不活化処理および1%BSAによるブロッキングを行い、抗 STRO-1 モノクローナル抗体 (R&D system) を室温で 60 分間反応させた。PBS 洗浄後、HRP 標識抗マウス IgM 抗体 (Jackson ImmunoResearch) を室温で 30 分反応させ、DAB にて呈色した。蒸留水で水洗後、ヘマトキシリンで核染色し、観察を行った。

#### ② 歯肉由来間葉系幹細胞の分離

4、6 または 16 週齢の Wistar Rat の歯肉組織をメスで採取し、抗生剤入り滅菌 PBS に入れてクリーンベンチまで移動し、数回、同 PBS にて洗浄した後、抗生剤入り F-12 HAM 培地で洗浄した。大きな歯肉組織片についてはハサミで 1-2mm 大に細切した。コラゲナーゼ A (Roche) 2mg/ml 添加 F-12 HAM 培地に組織片を浸漬し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間強く動かし処理した後、1000rpm 3 分間、遠心分離し組織片を集めた。上清を除去し、組織片に 0.1%トリプシン液を加えて、37 $^{\circ}$ C で 10 分間強く動かし処理した。1000rpm 3 分間遠心分離し、組織から分離した細胞を集め、上清を除去した。FBS10%含有 F-12 HAM 培地を加えてよく攪拌し、60mm 培養皿に播種した。37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 気相下にて 2~3 週間培養し、得られた線維芽細胞様細胞を実験に使用した。

#### ③ 歯肉由来間葉系幹細胞の同定

上述の方法で得られた線維芽細胞様細胞を用いて、蛍光免疫染色により STRO-1 の発現を確認した。コントロールには骨肉腫細胞株 MG63 を用いた。火炎滅菌した 18mm x 18mm 大のカバーガラスを 6 well plate に静置し、そこへ一定量の歯肉由来線維芽細胞様細胞を播種し、FBS10%含有 F-12 HAM 培地で一晚培養した。カバーガラスに細胞が接着していることを確認後、培地を取り除き PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで室温にて 60 分固定した。洗浄後、0.3% triton-X 100 で透過処理し、Blocking Buffer にてブロッキングした後、抗 STRO-1 モノクローナル抗体 (R&D system) を 4 $^{\circ}$ C で一晚反応させた。PBS 洗浄後、蛍光標識された抗マウス IgM 抗体 (Invitrogen / Molecular probes) を反応させ、Hoechst33342 で核染色した。蒸留水で水洗後、水溶性封入剤にてスライドガラスに封入し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

#### ④ STRO-1 のタンパクの発現の検索

上述の方法で得られた線維芽細胞様細胞を用いて、ウェスタンブロッティング法により STRO-1 の発現を確認した。コントロール

には免疫染色と同様、骨肉腫細胞株 MG63 を用いた。35mm dish に 90%コンフルエントに培養した歯肉由来線維芽細胞様細胞から培地を取り除き PBS で洗浄後、NP-40 Lysis Buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM NaF, 5 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 0.5  $\mu$ g/ml aprotinin, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 0.7  $\mu$ g/ml pepstatin A, 10% glycerol) にて可溶化した。14000rpm 10 分間遠心分離し、上清を細胞抽出液とした。細胞抽出液は SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE) にて展開後、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore) に転写した。ブロッキング後、一時抗体として抗 STRO-1 モノクローナル抗体 (R&D system) を 4 $^{\circ}$ C で一晚反応させた。二次抗体には HRP 標識抗マウス IgM 抗体 (Jackson ImmunoResearch) を用い、SuperSignal West Femto detection kit (Pierce) にて検出を行った。

#### (2) 幹細胞の多分化能の確認

① osteogenic differentiation: 歯肉由来線維芽細胞様細胞を 5000 cells / cm<sup>2</sup> になるように 6 well plate に播種し、骨芽細胞分化誘導培地 (Lonza) で培養した。培地を 3 日おきに交換しながら 1~4 週間培養した。1, 2, 3, 4 週目に 4% paraformaldehyde で固定し Alp 酵素染色および Alizarin Red 染色を施し硬組織形成能を確認した。

② chondrogenic differentiation: 歯肉由来線維芽細胞様細胞 50000 cells / ml の細胞懸濁液 1ml を 1.5ml エッペンドルフチューブに分注し、1000rpm 5 分間遠心した後、ペレットを壊さないように上清を除き、軟骨細胞分化誘導培地 (Lonza) に TGF- $\beta$  を添加した培養液を静かに加え、チューブの蓋を緩めて培養を行った。培地は 2 日おきに交換しながら 1~4 週間培養した。ペレットを PBS で洗浄後、ブアン液で固定し、OCT コンパウンドに包埋した。7 $\mu$ m 凍結切片を作製し、トルイジンブルー染色を行い、軟骨細胞への分化を確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラット歯肉組織 STRO-1 免疫染色 (図 1)

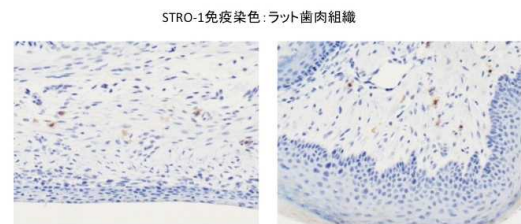


図 1

生後 6 週齢の Wistar Rat の歯肉上皮下結合組織内に、主として血管周囲に STRO-1 陽

性を示す細胞が認められた。

(2) 歯肉より分離した細胞の STRO-1 の発現 (図 2)

Positive control として MG63 cell を用い STRO-1 免疫染色を行った。4, 6, 16 週齢の Wistar Rat から採取した歯肉組織から分離・収集した間葉系細胞に STRO-1 抗体陽性細胞が認められた。

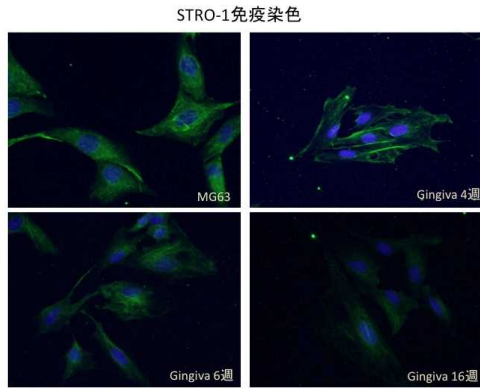


図 2

(3) STRO-1 のタンパクの発現 (図 3)

歯肉組織から分離・収集した間葉系幹細胞に STRO-1 タンパクの発現が認められた。

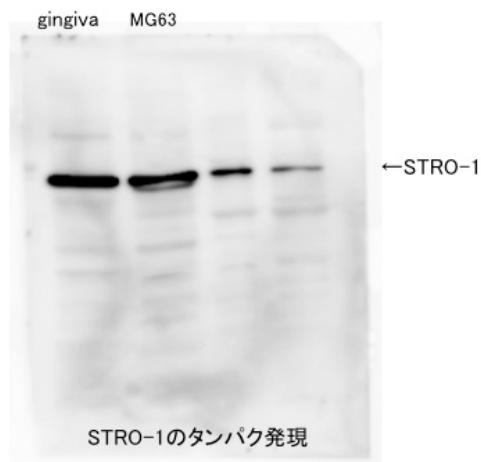


図 3

(4) osteogenic differentiation (図 4, 5, 6)

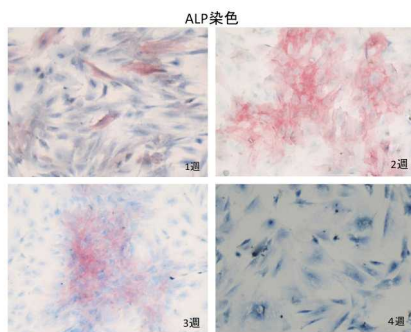


図 4

歯肉組織から分離・収集した間葉系幹細胞は培養 1 週間より 3 週間にかけて強い Alp 活

性を示していた。

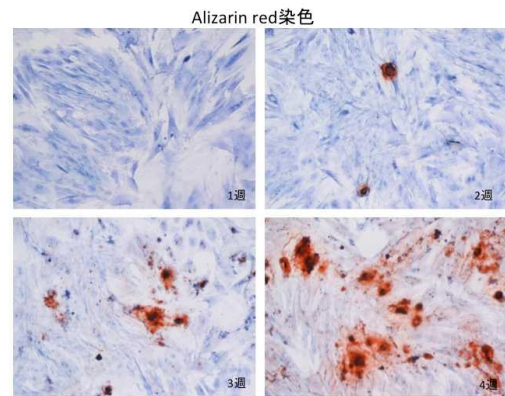


図 5

歯肉組織から分離・収集した間葉系幹細胞は培養 3 週間から 4 週間にかけて、細胞周囲の基質は Alizarin Red 染色で陽性を示していた。

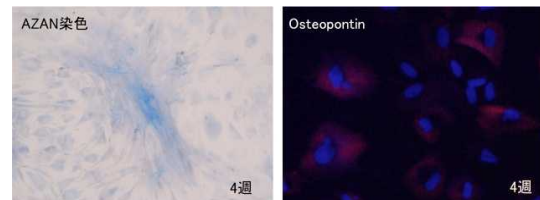


図 6

培養 4 週間後の間葉系幹細胞は AZAN 染色陽性の基質の形成を示し、細胞質は Osteopontin 陽性を示していた。

(5) chondrogenic differentiation (図 7)

培養 3 週間後の間葉系幹細胞はトルイジンブルーでメタクロマジーを示す軟骨様基質の形成が認められた。

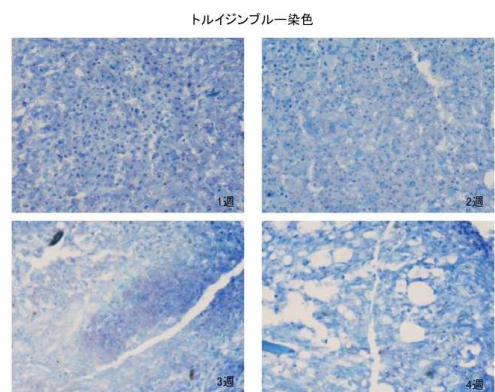


図 7

以上、本研究において、Wistar Rat より採取した歯肉組織より間葉系細胞を培養し、培養細胞中に数は少ないものの STRO-1 抗体陽性細胞が認められた。また、osteogenic, chondrogenic differentiation の検索よりこのような細胞は硬組織形成能を有する事が明らかになった。

以上の結果より歯肉由来間葉系幹細胞の存在が明らかとなり、また、このような細胞から将来的には歯牙硬組織形成細胞への分化の可能性が示唆された。

#### 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2件)

(1) 原田尚樹、柏崎晴彦、赤澤敏之、村田 勝、相沢智康、出村 誠、田中順三、飯塚 正、井上農夫男 ラット頭頂骨骨膜下における rhBMP-2 添加多孔性キトサン/ハイドロキシアパタイト複合体による骨形成 北海道歯誌, 査読有 32 166-176 2012

(2) Kasai T, Matsumura S, Iizuka T, Shiba K, Kanamori T, Yudasaka M, Iijima S, Yokoyama A Carbon nanohorns accelerate bone regeneration in rat calvarial bone defect. Nanotechnology, 査読有 22 2011

〔学会発表〕(計1件)

(1) 滝田裕子、木村満利子、鈴木正彦、飯塚正、高橋智美、久保木芳徳, 人工ECM幾何学: 培養担体としての新規ランダム・トンネル型  $\beta$ -TCP の有用性, 第33回日本バイオマテリアル学会 2011年11月21日, 京都テルサ, 京都

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

飯塚 正 (IIZUKA TADASHI)  
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号: 80168062

##### (2) 研究分担者

滝田 裕子 (TAKITA HIROKO)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 30125330

##### (3) 連携研究者

高橋 智美 (TAKAHASHI TOMOMI)  
北海道大学・大学院歯学研究科・技術専門職員  
研究者番号: 50399953