

## 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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792293

研究課題名（和文） ヒト歯髄幹細胞特異マーカーによる予期的分離と性状解析

研究課題名（英文） Prospective isolation and investigation of human dental pulp stem cells by using specific cell surface markers

研究代表者

安居 孝純（YASUI TAKAZUMI）

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：80348771

## 研究成果の概要（和文）：

従来の接着培養法による歯髄幹細胞の分離方法では、前駆細胞など他の細胞が混入する可能性があり、歯髄幹細胞の本質を解明することや再生医療への応用に限界がある。そこで、われわれは高純度の歯髄幹細胞を予期的に分離する手法の確立を目指し、ヒト歯髄幹細胞特異的なマーカーの同定を行った。CD271 および CD90 が、フローサイトメトリーを用いてヒト歯髄から高純度の歯髄幹細胞を分離するために、有効なマーカーであることが明らかになった。この情報は、歯髄幹細胞が再生医療に効果的に用いられるために重要であると考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

Traditionally, human dental pulp stem cells (hDPSCs) isolated by plastic adherence, frequently contain contaminating mature cells, which has limited our ability to investigate their basic biology and regenerative properties. In the present study, we identify specific cell surface markers for the prospective isolation of highly purified hDPSCs. We demonstrated that CD271 and CD90 could be used to prospectively isolate a pure population of hDPSCs from human dental pulp by flow cytometry. This information is critical if hDPSCs are to be used effectively in future regenerative therapies.

## 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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

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：再生医療・歯髄幹細胞・細胞表面マーカー・フローサイトメトリー

## 1. 研究開始当初の背景

歯髄には、骨髄と同様に骨・軟骨・脂肪等への多分化能を有する幹細胞の存在が知られている。この歯髄幹細胞は、増殖能が高く、比較的採取しやすいため、組織再生のための細胞ソースとして盛んに研究が行われている。しかしながら、それらのほとんどが歯髄を培養皿上で培養後、付着増殖した細胞を歯髄幹細胞とみなす接着培養法により細胞が分離されている(Gronthos et al., *Proc Natl Acad Sci.* 2000)。そのため、前駆細胞の混入や培養による性質変化の可能性が否定でき

ず、実験の再現性に欠けるなど、歯髄幹細胞の本質を明らかにするには不十分であると考えられる。また、臨床応用を考えた場合にも、前駆細胞や他の細胞の混入を否定できない雑多な細胞集団を幹細胞とみなして移植した場合には、細胞の分化、増殖能が一定でなく組織再生能力が不安定であることが予想される。そこで、歯髄から培養を経ることなく直接的に幹細胞を分離する方法（予期的分離法）を確立するために歯髄幹細胞に特異的な細胞表面マーカーを同定する研究を行った。

歯髄幹細胞は、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD146、CD166等の細胞表面マーカーを発現している (G.T.-J. Huang et al., *J Dent Res.* 2009; Karaöz et al., *Histochem Cell Biol.* 2010; Suchanek et al., *Acta Medica.* 2007)。これまでは歯髄幹細胞の純度を高めるために、接着培養法にて得られた細胞をこれらのマーカーを用いてフローサイトメトリーで分離する方法が用いられていた。CD271を発現する歯髄幹細胞はCD44とCD90も同時に発現し、高いクローン形成能を有するされ(Mikami et al., *Stem Cells Dev.* 2011)、CD90を発現する歯髄細胞は硬組織を形成する細胞への分化能が高いとされている (Hosoya et al., *Histochem Cell Biol.* 2012)。骨髄では、慶應義塾大学にてヒト骨髄間葉系幹細胞を分離するための細胞表面マーカーとしてCD271、CD90が有効であることを同定した。そこで、これらのマーカーを用いて歯髄より培養を経ることなく直接的に幹細胞を分離する方法(予期的分離法)の確立を目指し研究を行った。

また、再生医療への応用に向けて予期的に分離した歯髄幹細胞の *in vivo* における増殖能および骨形成能の評価を行った。

## 2. 研究の目的

ヒト歯髄幹細胞の細胞表面マーカーの同定とフローサイトメトリーによりヒト歯髄から培養を経ることなく直接的に幹細胞を分離する方法の確立、さらに本方法で分離した細胞を免疫不全マウスに移植し細胞増殖能や骨形成能を検討することを目的とした。幹細胞を用いた再生医療への臨床応用を想定した場合、歯髄は比較的採取しやすい組織ではあるが採取量が限られている。そこで高純度歯髄幹細胞をその純度や性質を変えることなく *ex vivo* 培養する技術の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

平成 23 年度は、慶應義塾大学にて、ヒト骨髄間葉系幹細胞で同定された細胞表面マーカー (CD271、CD90) を用い、歯髄より培養を経ることなく直接的に幹細胞を分離する方法 (予期的分離法) の確立を目的とし研究を行った。

### (1) ヒト歯髄幹細胞の細胞表面マーカーの同定とフローサイトメトリーにてヒト歯髄より予期的に幹細胞を分離する方法の確立。

ヒト抜去歯より歯髄組織を採取し、ヒト骨髄間葉系幹細胞で同定された細胞表面マーカー (CD271、CD90) を用いてフローサイトメトリーで細胞を分離した (図 1)。得られた細胞を培養しコロニー形成能を確認した。予

期的に分離する方法は、慶應義塾大学で開発したマウス骨髄から間葉系幹細胞を分離する方法を用いて行った (Morikawa et al., *J.Exp.Med.* 2009)。

図 1 (予期的分離法)



### (2) 本方法で得られた純度の高い細胞集団の生物学的特性(増殖能、分化能、遺伝子発現)の解析。

ヒト骨髄間葉系幹細胞の場合には、従来の接着培養法で得られた細胞と比較し、高い増殖能および分化能を示すことが明らかとなっている。本方法で得られたヒト歯髄幹細胞が、従来の接着培養法と比較し増殖能や骨、脂肪等の間葉系細胞への分化能が高いか、コロニーアッセイ法、培養法を用いて確認した。さらに歯髄は神経堤由来であるとされているが、予期的に分離した歯髄幹細胞が神経堤マーカーを発現するか、遺伝子発現について RT-PCR を用いて確認した。

上記の性質を明らかにした段階で、平成 24 年度は、*in vivo* の実験を中心に行った。

### (3) 予期的分離法により得られた純度の高い歯髄幹細胞を用いて *in vivo* における増殖能および骨形成能の評価。

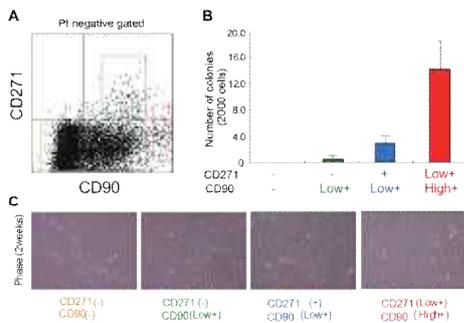
予期的に分離した歯髄幹細胞を培養増幅後に、GFP をレンチウイルスを用いて導入した。この細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells) をコラーゲンゲル (5ul) と混合しマウス頭蓋骨欠損モデル (免疫不全 (NOD/SCID) マウス) に移植した。マウス頭蓋骨欠損部にカバーガラスを装着し cranial window を作製することにより、移植した GFP 陽性細胞が経時的に増殖する状態を透視しながら観察した。GFP 陽性細胞を観察することにより、移植した細胞数の変化や局在、骨形成への移植細胞の関与等を検討した。また、4 週後にマイクロ CT を用いて骨形成の状態、骨形成量について検討した。さらに、抗ヒト-オステオカルシン抗体を用いた免疫染色にて、形成された骨組織の評価を行った。これらについて、他分画より得られた細胞を移植した群やコラーゲンゲルのみ移植した群と比較した。

## 4. 研究成果

(1) 歯髄から培養を経ることなく直接的に幹細胞を分離する方法 (予期的分離法) を確立するために歯髄幹細胞に特異的な細胞表面

マーカーを同定する研究を行った。ヒト骨髄間葉系幹細胞で同定された細胞表面マーカー (CD271、CD90) を用い歯髄細胞をフローサイトメトリーにて解析すると、 $CD271^{Low+}CD90^{High+}$ 、 $CD271^{+}CD90^{Low+}$ 、 $CD271^{-}CD90^{Low+}$ 、 $CD271^{-}CD90^{-}$ の分画に細胞集団が認められた。これらの中で、 $CD271^{Low+}CD90^{High+}$ の細胞集団より分離した細胞は、高いコロニー形成能を示した (図2)。この細胞集団は、骨髄細胞にはみられない細胞集団であり、ヒト骨髄間葉系幹細胞とは異なる細胞集団であると考えられた。

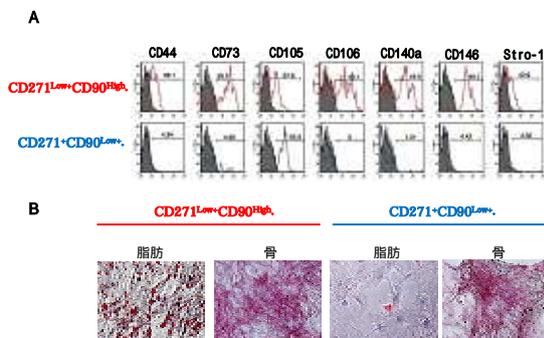
図 2



(A) 歯髄細胞の FACS パターン (B) CFU-F の比較 (C) 各分画より分離した歯髄細胞の培養 21 日後

(2) また、予期的に分離した  $CD271^{Low+}CD90^{High+}$  歯髄幹細胞は、フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原解析において CD44、CD73、CD105、CD106、CD140、CD146、Stro-1 等の幹細胞マーカーの発現を認めた (図 3A)。また、骨や脂肪細胞等の間葉系細胞への高い分化能を示した (図 3B)。

図 3 (表面抗原解析と分化能)



$CD271^{Low+}CD90^{High+}$  歯髄幹細胞と  $CD271^{+}CD90^{Low+}$  歯髄幹細胞の比較 (A) 表面抗原解析 (B) 脂肪・骨への分化能

予期的に分離した歯髄幹細胞が神経堤マーカーを発現するか、RT-PCR を用いて確認した。その結果、*P75*、*Snail*、*Slag*、*Egf8* 等の神経堤マーカーの発現が認められた。

(3) 免疫不全マウスの頭蓋骨欠損モデルへ予期的に分離した歯髄幹細胞の移植を行った。マウス頭蓋骨欠損部にカバーガラスを装着することにより、移植した GFP 陽性細胞が経時的に増殖する状態を透視しながら観察した。 $CD271^{Low+}CD90^{High+}$  歯髄幹細胞移植群は、コントロール群および  $CD271^{+}CD90^{Low+}$  歯髄幹細胞移植群と比較し、高い増殖能を示した。

また、移植 4 週後にマイクロ CT による骨形成能の評価を行い、 $CD271^{Low+}CD90^{High+}$  歯髄幹細胞移植群はコントロール群および  $CD271^{+}CD90^{Low+}$  歯髄幹細胞移植群と比較し高い骨形成能を示した (図 4)。

図 4 (マイクロ CT による骨形成能の評価)



さらに、移植 4 週後に抗ヒト-オステオカルシン抗体を用いた免疫染色にて、形成された骨組織の評価を行った。 $CD271^{Low+}CD90^{High+}$  歯髄幹細胞移植群では、抗ヒト-オステオカルシン抗体にて発現を認め、移植細胞の骨形成への関与が示唆された。

以上の結果から、予期的に分離した  $CD271^{Low+}CD90^{High+}$  歯髄幹細胞は、高いコロニー形成能、増殖能、間葉系細胞への分化能および骨形成能を有することが示唆された。

従来の接着培養法で得られた歯髄幹細胞はヘテロな細胞集団であったため、歯髄幹細胞の本質を解明することや再生医療への応用において一定した増殖能や骨形成能を示すことに限界があった。本研究において、 $CD271$  および  $CD90$  を用いて高純度の歯髄幹細胞を予期的に分離する技術を確立した。本方法を用いることにより、歯髄幹細胞本来の性状解析や一定した歯髄幹細胞の再生医療への応用が可能になると考えられた。

## 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 0 件)

(学会発表)(計 3 件)

Prospective Isolation of Human Dental Pulp Stem Cells  
Takazumi Yasui, Yo Mabuchi, Haruki Toriumi, Daisuke Araki, Kunimichi Niibe, Satoru Morikawa, Takeshi Karube, Katsuhiro Onizawa, Hiromasa Kawana, Yutaka Tomita,

Norihiro Suzuki, Taneaki Nakagawa,  
Hideyuki Okano and Yumi Matsuzaki  
91st General Session & Exhibition of the  
IADR(International Association for Dental  
Research), シアトル, 2013, 3.20~23

FACS を用いたヒト歯髄幹細胞の予期的分  
離法

安居孝純, 鬼澤勝弘, 軽部健史, 森川 暁,  
河奈裕正, 中川種昭  
第 57 回日本口腔外科学会総会, 横浜, 2012,  
10.19~21

FACS を用いたヒト歯髄幹細胞の予期的分  
離法

安居孝純, 馬淵 洋, 鬼澤勝弘, 中川種昭,  
岡野栄之, 松崎有未  
第 11 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012,  
6.12~14

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://dent-os.med.keio.ac.jp/KEIO/classroom/record/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安居 孝純 (YASUI TAKAZUMI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 80348771