

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792304

研究課題名(和文)細胞外環境が歯髄幹細胞の未分化性維持に及ぼす影響

研究課題名(英文) Analysis of supporting abilities for undifferentiated dental pulp stem cells by their microenvironments

研究代表者

中塚 隆介 (NAKATSUKA, Ryusuke)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：90454561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：PDGFR $\alpha$ 、Sca-1共陽性マウス下顎切歯由来歯髄幹細胞(DPSC)と骨髄間葉系幹細胞(BM-MSC)におけるmRNA発現とサイトカイン産生能を比較したが、有意な差は認められなかった。DPSCは継代培養が困難であるが、低酸素培養により改善できるかを検討した。その結果、低酸素培養がin vitro培養系においてDPSCの未分化性、増殖性維持に適していることが示唆された。DPSCが周囲の細胞に与える影響を、ヒト造血幹細胞のin vitro支持能について解析した。DPSCとBM-MSCとともに培養したヒト造血幹細胞はどちらの場合においても重症免疫不全マウス骨髄中でヒト血球細胞の再構築能を示した。

研究成果の概要(英文)：The expressions of mRNA and cytokines of PDGFR $\alpha$  and Sca-1 double positive dental pulp stem cells (DPSCs) were compared to bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells (BM-MSCs). These mRNA and cytokines expressions did not show significant difference between DPSCs and BM-MSCs except Cxcl12 mRNA expression. We investigated whether proliferation and differentiation potentials of passaged DPSCs are improved by hypoxic culture. The DPSCs well maintained a proliferation and differentiation potentials with passage under the hypoxic culture condition. These results suggest that the proliferation and differentiation potentials of DPSCs were maintained in hypoxic condition. Then, hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) supporting activity of DPSCs was analyzed by in vitro co-culture system. Moreover, their HSC-supporting activity was evaluated by in vivo xenotransplantation assays using NOG mice. The DPSCs as well as BM-MSCs supported human cord blood-derived HSCs.

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：歯髄幹細胞 細胞外環境 低酸素 造血細胞支持

### 1. 研究開始当初の背景

マウス下顎切歯歯髄中には骨髄間葉系幹細胞 (BM-MSC) 様の骨、脂肪、骨格筋分化能を有する歯髄幹細胞 (DPSC) が存在する。DPSC は *in vivo* で象牙芽細胞前駆細胞を供給していると考えられているが、歯髄組織中で未分化性を維持し増殖するためには細胞の周囲環境が重要であると考えられる。このように、生体内の幹・前駆細胞ニッチと考えられている場所では細胞の未分化性維持機構が細胞周囲の環境によって整えられている。BM-MSC では、未分化性維持に関わる機構や周囲の細胞に与える影響などについての研究が進められており、BM-MSC では細胞外環境を *in vitro* で再現することで増殖能や多分化能を維持できることが示されつつある。一方、DPSC には BM-MSC と同様に、幹細胞性を維持する可能性のある細胞外環境が複数存在するが、それらと DPSC との関わりについては報告されていない。そこで、本研究では生体内で DPSC の増殖能と多分化能の保持に関与していると考えられる細胞外環境について、幹細胞の未分化性維持機構、細胞増殖能に対する影響、DPSC が周囲の細胞に対して与える影響を解析した。

### 2. 研究の目的

マウス下顎切歯歯髄から BM-MSC マーカー (PDGFR $\alpha$ , Sca-1) を用いたセルソーティングにより、高度に純化された BM-MSC 様の DPSC が得られた。この DPSC は初代培養系において良好な細胞増殖能を示すが、継代により細胞増殖能の低下傾向を示し、細胞の維持が困難であった。そこで、*in vitro* 培養系における DPSC の細胞増殖能を改善できる可能性を探索する目的で、幹細胞維持に関わるとされる Notch 受容体と関連する分子の遺伝子発現解析、サイトカイン産生能、低酸素培養による経代培養を解析した。また、マウス切歯歯髄から分離された間葉系幹細胞と、上皮細胞由来のアメロプラスト、あるいはその前駆細胞との関連について解析を行った。さらに、DPSC が周囲の細胞に対して与える影響を調べるため、ヒト造血幹細胞 (HSC) と DPSC の共培養実験を行い、DPSC が造血幹細胞維持能を示すか解析した。

### 3. 研究の方法

#### (1) DPSC と BM-MSC における Notch 受容体と関連する分子の遺伝子発現解析とサイトカイン産生能の比較

Notch 受容体 (Notch1, Notch2, Notch3) Notch リガンド (Jag1, Jag2, Dll1) 関連分子 (Lfng, Hes1) 及び、BM-MSC で発現が見られる Nestin, Angpt1, Cxcl12 について、Real-time RT-PCR により DPSC と BM-MSC 間で

発現比較を行った。

サイトカインの発現比較は、マルチプレックスアッセイにより複数のサイトカイン産生能を DPSC と BM-MSC 間で比較した。

#### (2) DPSC の低酸素培養

DPSC は初代培養では良好な増殖能や分化能を有するが、継代培養が困難である。そこで、DPSC を通常酸素濃度条件 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>) と低酸素条件 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub>) で培養し、初代培養及び継代培養時の増殖能、骨、脂肪分化能を評価した。

#### (3) PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>DPSC における E-cadherin の発現

下顎切歯根端部の細胞について、PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>DPSC における上皮細胞マーカーである E-cadherin 発現をフローサイトメトリーにより解析した。

#### (4) ヒト HSC と DPSC の共培養実験

DPSC が周囲の細胞に与える影響を調べるため、ヒト HSC と DPSC を共培養し、*in vitro* で DPSC がヒト HSC を指示するか解析した。ヒト臍帯血より CD34 陽性、CD34 陰性 HSC をセルソーターにより分取し、DPSC または BM-MSC と共培養した。共培養後の細胞についてフローサイトメトリー解析と、重症免疫不全マウス (NOG マウス) への移植系により、長期生着するヒト血球細胞を調べた。なお、ヒト臍帯血を用いた実験は、関西医科大学医学倫理委員会の承認を得て行った。

### 4. 研究成果

Notch 受容体と関連する分子の遺伝子、さらに Nestin, Angpt1, Cxcl12 について発現解析を行った。Cxcl12 の発現は BM-MSC と DPSC 間で有意な差を認めしたが、その他の遺伝子については有意な差は認められなかった (図 1)。

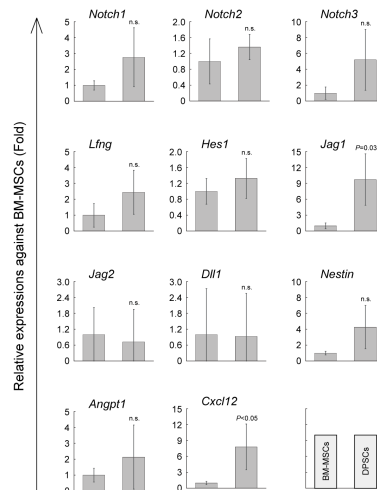


図 1 DPSC と BM-MSC における Notch 受容体と関連する分子の遺伝子発現解析

サイトカイン発現については、DPSCで各サイトカインが高発現している傾向が確認された(図2)。

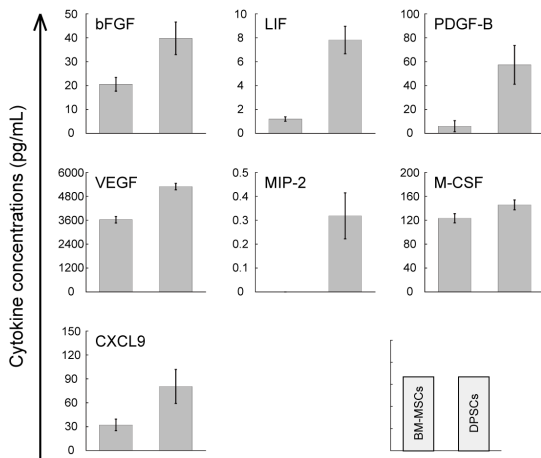


図2 DPSCとBM-MSCにおけるサイトカイン産生能の比較

DPSCを低酸素培養することで、通常酸素条件に比べ良好な細胞増殖が認められた(図3)。さらに、継代培養時に低酸素培養を行うことによって継代培養に伴う分化能の急速な低下を抑制し、分化能を保ったまま維持できる可能性を見出した(図4)。一方、各培養条件下でのサイトカイン産生能は低酸素状態においてbFGF、VEGFやPDGF-BBなどの発現が上昇する傾向にあったが、有意に上昇するとは言えなかった。

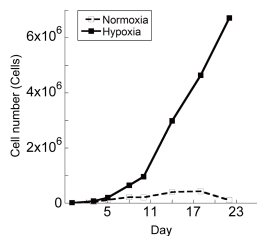


図3 DPSCの低酸素培養による細胞増殖

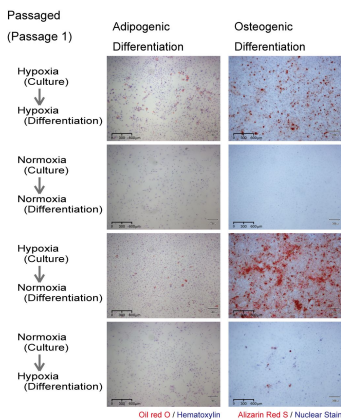


図4 DPSCの低酸素培養による継代培養時の増殖能、骨、脂肪分化能。1段目及び3段目の低酸素条件で継代培養した群で良好な分化が見られた。

下顎切歯根端部の細胞を酵素処理により分散し、フローサイトメトリー解析を行った。上皮細胞マーカーであるE-cadherin陽性細胞の一部に、間葉系幹細胞マーカーであるPDGFR $\alpha$ とSca-1を発現する細胞が含ま

れていることが明らかとなった(図5)。一方、大部分のPDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>細胞はE-cadherin陰性分画に含まれていた。一方、血管内皮細胞マーカーであるVE-cadherinについては、PDGFRとSca-1を発現する細胞は確認されなかった。このE-cadherin PDGFR $\alpha$  Sca-1三重陽性の細胞と、E-cadherin陰性でPDGFR Sca-1共陽性の歯髓幹細胞のPDGFRとSca-1発現を比較したところ、E-cadherin PDGFR $\alpha$  Sca-1三重陽性細胞は歯髓幹細胞よりも低いPDGFR $\alpha$ とSca-1発現を示した(図5)。これらの細胞を培養すると、E-cadherin PDGFR $\alpha$  Sca-1三重陽性細胞は歯髓幹細胞と同様の培地組成や上皮細胞用の培地組成ではうまく増殖させることが出来なかった。

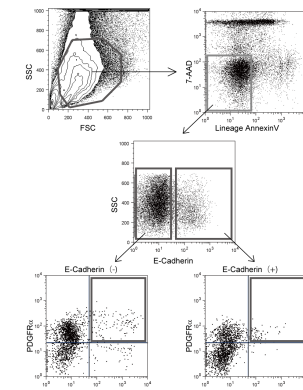


図5 下顎切歯根端部由来の細胞におけるE-cadherinの発現。下段右(E-cadherin陽性)中に、PDGFR $\alpha$  Sca-1共陽性細胞が一部存在する(枠線内)。

ヒト臍帯血由来CD34陽性、CD34陰性細胞をマウスDPSCまたはBM-MSCと共培養すると、Feeder-free培養系より高いCD34陽性細胞の維持・産生能が認められた(図6)。さらに、in vitro共培養後の細胞をNOGマウスへ移植し、長期骨髄再構築能について解析した。共培養群においてマウス骨髄中へのヒト細胞の生着が認められ、DPSCはBM-MSCと同等のヒトHSC支持能を示した(図7)。

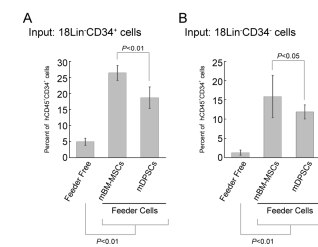


図6 ヒト臍帯血由来HSCとDPSCまたはBM-MSCとの共培養。共培養後のヒトCD34陽性細胞におけるCD34陽性細胞率。

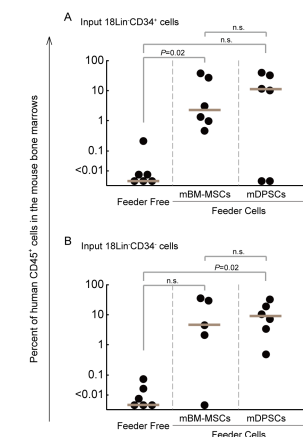


図7 ヒト臍帯血由来HSCとDPSCまたはBM-MSCとの共培養後移植したNOGマウス骨髄におけるヒト細胞の生着率。

## 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 1 件)

Nakatsuka R, Matsuoka Y, Uemura Y, Sumide K, Iwaki R, Takahashi M, Fujioka T, Sasaki Y, Sonoda Y. Mouse dental pulp stem cells support human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells in vitro. Cell Transplantation, 印刷中、査読有

DOI: 10.3727/096368913X674675

[学会発表](計 12 件)

中塚隆介、他、マウス切歯由来 Sca-1, PDGFR $\alpha$  陽性歯髄幹細胞はヒト臍帯血由来造血幹細胞支持能を有する、第 13 回日本再生医療学会総会、2014 年 3 月 4~6 日、国立京都国際会館

中塚隆介、他、Development of a highly efficient method for isolating bone-derived small stem cells identified in adult mouse bone. 第 11 回幹細胞シンポジウム、2013 年 5 月 17~18 日、東京大学伊藤国際学術研究センター

岩城隆二、中塚隆介、他、マウス骨質由来微小幹細胞の同定・分離法の開発とその幹細胞特性の解明、第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 21 日、パシフィコ横浜

中塚隆介、他、Mouse incisal tissue-derived mesenchymal stem cell-like Sca-1<sup>+</sup>PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> cells support human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem cells in vitro. 第 35 回日本造血細胞移植学会総会、2013 年 3 月 8 日、石川県立音楽堂

中塚隆介、他、FACS により予期的に分離されたマウス Sca-1, PDGFR $\alpha$  陽性歯髄幹細胞は同一の表面免疫特性を持つ骨髄由来間葉系幹細胞とは異なる幹細胞特性を有する、第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2012 年 9 月 15 日、奥羽大学

中塚隆介、他、マウス歯髄幹細胞と骨髄間葉系幹細胞の機能比較とヒト造血幹細胞の in vitro 支持能の検討、第 22 回日本サイトメトリー学会学術集会、2012 年 6 月 29 日、千里ライフサイエンスセンター

Nakatsuka Ryusuke、他、Prospectively isolated PDGFR $\alpha$  and SCA-1 double positive dental pulp-derived mesenchymal stem cell-like cells have different characteristics as compared to PDGFR $\alpha$  and SCA-1 double positive bone marrow-derived mesenchymal

stem cells. International Society for Stem Cell Research、2012 年 6 月 15 日、パシフィコ横浜

中塚隆介、他、マウス歯髄幹細胞によるヒト臍帯血由来未分化造血幹細胞支持能の解析、第 20 回近畿臍帯血幹細胞移植研究会、2012 年 6 月 2 日、ホテルグランヴィア大阪

中塚隆介、他、マウス組織に由来する骨髄間葉系幹細胞と歯髄幹細胞の機能比較~ヒト造血幹細胞の in vitro 支持能に関して~、第 34 回日本造血細胞移植学会総会、2012 年 2 月 25 日、大阪国際会議場

中塚隆介、他、マウス切歯由来歯髄幹細胞によるヒト造血幹細胞の in vitro 支持能の検討、第 73 回日本血液学会学術集会、2011 年 10 月 14 日、名古屋国際会議場

中塚隆介、他、歯形成端に存在する新規マウス歯髄幹細胞の予期的分離と特性の解析、第 21 回日本サイトメトリー学会、2011 年 6 月 26 日、京都市国際交流会館

Ryusuke Nakatsuka、他、Hypoxic culture condition facilitates the proliferation and differentiation potentials of mouse dental pulp stem cells. The 9th Stem Cell Research Symposium、2011 年 5 月 13~14 日、泉ガーデンギャラリー

[産業財産権]

出願状況(計 2 件)

名称: 間葉系幹細胞の分離方法

発明者: 藺田精昭、松岡由和、中塚隆介、飯田寛和

権利者: 学校法人関西医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-170480 号

出願年月日: 2013 年 8 月 20 日

国内外の別: 国内

名称: 微小幹細胞の分離方法

発明者: 藺田精昭、中塚隆介、岩城隆二、飯田寛和

権利者: 学校法人関西医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-220648 号

出願年月日: 2012 年 10 月 2 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

中塚隆介 (NAKATSUKA, Ryusuke)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90454561