

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 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792319

研究課題名（和文）顎口腔領域の放射線障害に対する幹細胞治療確立に向けた戦略的基礎研究

研究課題名（英文）Basic research of stem cell therapy for radiation damage of oral and maxillofacial region.

研究代表者

阿部 成宏（ABE SHIGEHIRO）

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：00510364

研究成果の概要（和文）：

我々は、以前の研究でヒト根未完成歯・根尖部歯髄由来細胞から、幹細胞様細胞集団を単離し、これに放射線を照射した結果、放射線抵抗性を示す一方で、硬組織の再生能を低下させることを初めて明らかにした。（*S. Abe et al. Stem Cell Res Therap, 2011.*）

その中で、無血清培地下で Sphere 形成をする歯髄由来の神経堤幹細胞様細胞を単離することに成功した。

ヒト根未完成歯・根尖部歯髄および口腔粘膜組織（口唇、口蓋、歯肉・歯槽部）由来細胞からの幹細胞の単離と性状解析を行うことを目的とした。

これらの細胞から、無血清培地下で Neurosphere 法を用いて幹細胞様細胞を単離させることに成功した。これらは、神経堤細胞マーカーを発現し、適切な条件下で骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、神経細胞系統へと分化誘導でき、免疫不全マウスの皮下組織にて骨形成を確認した。

研究成果の概要（英文）：

Previously, we demonstrated for the first time that stem/progenitor cells derived from apical papilla-derived cells (APDCs) exhibit a radioresistant phenotype; however, the hard tissue forming ability in vivo, but not bulk APDCs, was significantly reduced after irradiation. (*S. Abe et al. Stem Cell Res Therap, 2011.*)

The purpose of this study was to isolate and characterize the properties of stem/progenitor cells derived from human APDCs and human oral mucosal mesenchymal tissue-derived cells (OMMCs).

APDCs and OMMCs were isolated from freshly extracted human third molars with immature apices and human oral mucosal tissues (lip, palate, gingiva and alveolar ridge). APDCs and OMMCs formed spheres under neurosphere culture condition. The sphere-forming cells derived from APDCs and OMMCs had expressed neural crest-associated markers. These sphere-forming cells could differentiate into multiple mesenchymal lineages (osteoblasts, adipocytes and chondrocytes) and neural lineage (neurons) in vitro, and generated ectopic bone tissues in vivo. The results of this study suggest that APDCs and OMMCs contain cells with characteristics of NCSCs reported previously in mice. Humans developing tooth with immature apex and human oral mucosal mesenchymal tissue-derived cells are the effective source of cells for neural crest lineage tissue regeneration.

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・外科系歯学

キーワード：幹細胞、分化、Neurosphere、Tissue engineering、歯髄幹細胞、口腔粘膜固有層幹細胞、神経堤幹細胞、骨再生

1. 研究開始当初の背景

近年、生体内の多くの正常組織や器官には、自己複製能と多分化能を保持した幹細胞とよばれる未熟な細胞集団が存在し、組織の発生や損傷修復において極めて重要な役割を果たしている。これらの幹細胞研究の多くは再生医学における細胞供給源としての可能性を見出すために、いかに大量に幹細胞を増幅させ、分化誘導させるかが大きなウエイトを占めている。しかしながら、正常組織における放射線障害とその治療法に関しては、未知な点が非常に多い。

最近の研究によって、これらの障害は、それぞれの組織中に存在する幹細胞の DNA ダメージによる枯渇化が原因であることが報告されつつある。そこで、放射線照射した幹細胞の挙動を明らかにすることで、そのメカニズムを解明できると同時に、幹細胞治療を効率よく行うことで、その治療法への可能性を見出すことができると考え、われわれは、ヒト根未完成歯・根尖部歯髄を用いた研究を遂行した。その中で、放射線による歯根形成阻害においては、歯乳頭に存在している幹細胞様細胞が重要な役割を演じている可能性が高いと考え、ヒト根未完成歯・根尖部歯髄由来細胞を用いて放射線生物学的に検討した。歯根形成期にある歯が放射線照射を受けると、根尖部歯髄幹細胞様細胞は、むしろ放射線抵抗性を示し、細胞死によって硬組織形成細胞の供給が不能になるのではなく、機能細胞への分化が抑制される結果、歯根形成不全に至る可能性を初めて示唆した。そこで、それらの幹細胞に関して、詳細に検討することで幹細胞治療の確立が可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では歯髄幹細胞、口腔粘膜幹細胞を今までの申請者が行ってきた幹細胞学的手法によって、*In vivo* での局在を同定し、その細胞を単離し、性状解析を行う。また、その障害に対する幹細胞治療の可能性を見出す。

そこで、これらの放射線障害に対する治療法を確立することを目的にした。

3. 研究の方法

(1). 正常組織幹細胞における *in vivo* 局在の把握と各組織間での比較検討

幹細胞の同定：各組織の凍結切片を作製し、それらが過去に報告された幹細胞マーカーとどれくらいリンクするのかを蛍光免疫染色を用いて検討する。

(2). 単離・培養された組織幹細胞における性状解析と組織特異性の解明

【幹細胞の分離、性状解析および *in vitro* 系での検討】：上記で得られた知見より、sphere 培養法を用いて幹細胞と思われる細胞集団を単離し、幹細胞学的検討を行う。

【幹細胞生物学的検討】：分離法：Neurosphere 法。未分化状態の検討：分化マーカーによる RT-PCR、Western blotting および蛍光免疫染色。

分化能の検討：骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、神経細胞への分化誘導

(3). 各組織幹細胞に適した幹細胞治療法の確立

今までの研究においてもっとも得意とする硬組織再生能に関して、各種組織由来幹細胞を用いて、適切な分化誘導法とスキャホールドを検討し、免疫不全動物へ移植して評価する。申請者が用いたスキャホールドは、ハイドロキシアパタイト (HA) のみであるが、口腔粘膜間葉組織由来細胞に関しては PLLA などのスキャホールドも同時に検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト根未完成歯・根尖部歯髄細胞からの神経堤幹細胞の単離と性状解析

ヒト根未完成歯・根尖部歯髄細胞 (APDCs) は歯冠部歯髄よりも旺盛な Sphere 形成能を示し、自己福祉能を保持していた。これらの細胞をわれわれは、Papillary sphere-forming cells (PSFCs) と命名した (図 1)。

1. APDCsからのPSFCsの単離と性状解析

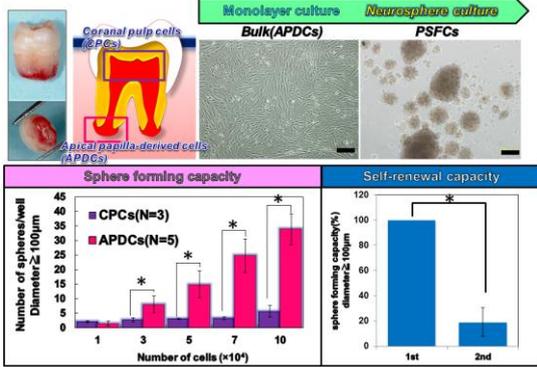


図 1

幹細胞・分化マーカーの検討

PSFCs を未分化マーカーおよび分化マーカーにて検討して結果、神経堤幹細胞マーカーを発現し、分化マーカーは発現していなかった。RT-PCR、Western blotting および蛍光免疫染色にて明らかにした。PSFCs は未分化状態であることが示唆された(図 2)。

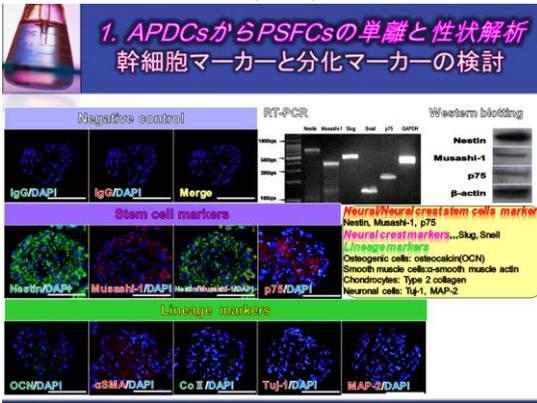


図 2

PSFCs は、生体内を反映しているか？

今までの報告から、Sphere 形成細胞は、In vivo を反映した培養法であるとされている。

われわれは、生体内をどれくらい反映しているのかを検討した。われわれは、以前の報告で、Apical papilla を Dentin apical pulp junction (DAJ)、Central apical pulp (CA) および Tip of apical pul (TA) の 3 領域に分類し、間葉系幹細胞マーカーである CD105 に関して検討した。その結果、最も未分化である TA ではその発現は非常に弱いことを報告した (S. Abe et al., Oral Sci Int, 2007.)。その結果、PSFCs は CD105 の発現は、Bulk と比較して有意に発現低下しており、生体内を反映している事が示唆された (図 3)。

多分化能の検討

PSFCs は適切な環境下で、硬組織形成細胞、軟骨細胞、脂肪細胞のみならず、神経堤細胞系統である平滑筋細胞および神経細胞系統へも分化することが可能であった(図 4)。

In vivo での硬組織再生の検討

HA スキャホールドと PSFCs 複合体を In vitro で分化誘導させたものを免疫不全マウ

スの皮下組織に移植し、12 週で摘出した組織を検査したところ、硬組織の再生を認めた(図 5)。

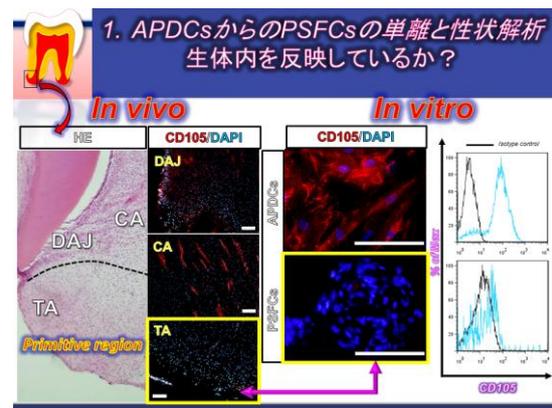


図 3

2. PSFCs の神経堤細胞系統への分化能

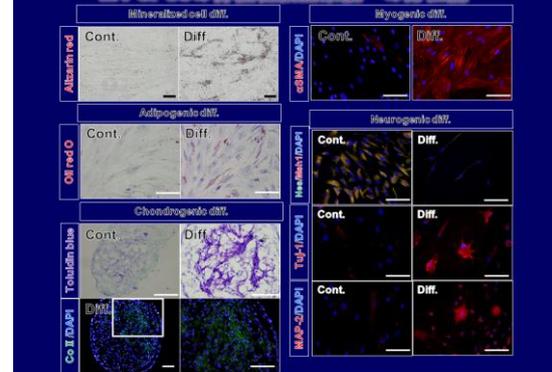


図 4

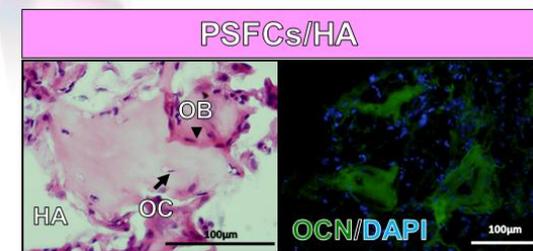


図 5

結論

今回われわれは、ヒト根未完成はより Neurosphere 法を用いて幹細胞様細胞を単離し、神経堤幹細胞様細胞であることを見出した。

(2) ヒト口腔粘膜組織からの幹細胞単離と性状解析に関する検討

顎口腔領域に対する放射線照射後に最も QOL を低下させるものとして口腔粘膜炎が挙げられる。そこで、口腔粘膜由来の幹細胞を用いて、幹細胞治療を検討する目的で、ヒト口腔粘膜由来の細胞を用いて、幹細胞生物学的に検討した。

ヒト口腔粘膜に関しては、口唇形成時の被裂縁弁、抜歯・嚢胞摘出時の口蓋粘膜、歯肉、

歯槽部粘膜を採取し、由来細胞を得た。

ヒト口腔粘膜より、初代培養の時点で、上皮細胞と間葉細胞を完全に分離できる培養法を確立した (図6)。

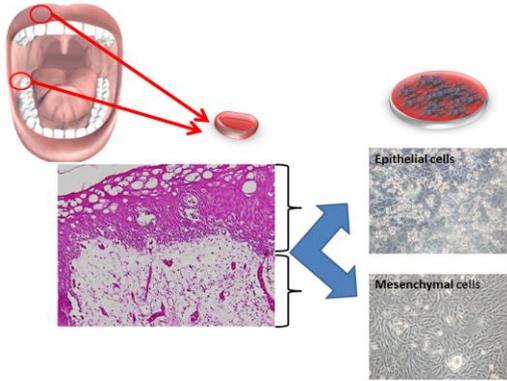


図6

口腔粘膜固有層の細胞は神経堤細胞由来であることと、ヒト皮膚由来の神経堤幹細胞様細胞が Neurosphere 法にて単離され、性状解析がなされていることより、ヒト根未完成歯・根尖部歯髓由来細胞と同様に Neurosphere 法を用いて幹細胞様細胞を単離した。

ヒト口腔粘膜間葉組織由来 (Human oral mucosal mesenchymal tissue-derived cells) より Neurosphere 法にて Sphere 形成した細胞 (Oral mucosal sphere-forming cells: OMSFCs) を採取し、その幹細胞生物学的な性質としての多分化能 (骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、神経細胞) と硬組織再生能を免疫不全マウス皮下組織への移植実験によって観察した。

ヒト口腔粘膜下組織由来細胞は、Sphere 形成能は低いものの、小型の Sphere を形成し、未分化性を維持している事が示唆された。Sphere 形成細胞は適切な環境にあれば、間葉系細胞系統のみならず、神経細胞系統への分化能をも保持していた。3D OPLA scaffold (BD Bioscience) に播種し分化誘導させた OPLA/OMSFCs 複合体は、免疫不全マウスの皮下組織で骨形成を認めた (図7)。

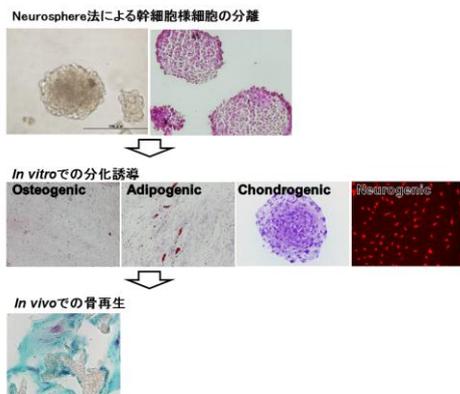


図7

結論

今回、OMSFCs は、幹細胞としての未分化性と多分化能を保持しており、新たな再生医療への供給源となり得ることが示唆された。

3. 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) 【原著論文】

阿部 成宏、吉増 秀實、佐藤 豊、藤村 倫子、三島木 節、村嶋 真由子、香月 佑子、上丸 英、新井 直也、天笠 光雄、上顎劣成長を伴った片側性完全口唇口蓋裂患者に対する上下顎移動術および骨延長術の顎顔面形態と後戻りに関する比較検討、日本口腔外科学会雑誌、58、204-211、2012.

2) 【原著論文】

S. Abe, K. Hamada, S. Yamaguchi. Neural crest stem cell property of apical pulp cells derived from human developing tooth. Cell Biol Int, 36, 927-936, 2012.

DOI: 10.1042/CBI20110506

[学会発表] (計2件)

1) 阿部 成宏、濱田 啓一、山口 聡、天笠 光雄、山城 正司、ヒト根未完成歯・根尖部歯髓由来細胞の放射線生物学的検討、第56回日本口腔外科学会総会、2011年10月21日、大阪

2) M.Murashima, T. Mishimagi, S. Abe, S. Okada, Y. Katsuki, S. Iijima, Y. Sato, H. Yoshimasu, M. Mibu, K. Harada, Long term follow up results of the patients with cleft lip and palate. 10th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, Bali-Indonesia, 2012.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 成宏 (ABE SHIGEHIRO)

東京医科歯科大学歯学部・非常勤講師

研究者番号：00510364

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし