

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792442

研究課題名(和文) 乳歯歯髄由来SP細胞とマラッセ上皮遺残細胞による機能的な歯牙の再生

研究課題名(英文) Expression of the stem cell makers and cell cycle in the epithelial rests of malassez

研究代表者

倉重 圭史 (KURASHIGE, Yoshihito)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：30453278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マラッセ上皮遺残細胞の細胞増殖能と幹細胞特性を有するか否かを検証した。マラッセ上皮遺残に対し未分化マーカー細胞周期マーカーである免疫組織学染色を行い、テロメラーゼの触媒酵素であるTERTの発現をRT-PCR法により確認した。これらの結果より、マラッセ上皮遺残細胞は未分化であり細胞増殖が休止しているユニークな上皮細胞であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The essential function and cell proliferation property of the ERM cells is not well understood. In this study, we investigated whether the ERM cells have cell growth capacity and primitive stem cell characteristics. In the ERM had localization of immunohistochemical staining for p27kip1 and CK-19 were detected in cytoplasm, but GE was both negatives. Cell growth rate of the ERM cells were significantly higher than the GE cells in vitro ( $p < 0.05$ ). The signal of the catalytic components of telomerase, TERT, in the ERM cells was stronger than the GE cells by RT-PCR. The ERM cells were expressed pluripotent genes of Nanog and Stat3 by RT-PCR. The results suggest that The ERM cells are unusual cells that exhibit the immature and cell growth arrest of ectoderm-derived epithelial cells. The ERM cells also may have property of unique stem cell population.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：マラッセ遺残上皮 cell cycle

## 1. 研究開始当初の背景

我々の身体は未分化な幹細胞から発生した約200種類の機能的な細胞から構成されている。これまでの幹細胞の研究から、生体内には造血幹細胞や神経幹細胞、間葉系幹細胞など複数種の体性幹細胞が存在することが明らかになり、身体自体が幹細胞システムによって維持されると考えられるようになった。さらに三胚葉へと分化誘導可能な胚性幹細胞(ES細胞)が樹立されたことによって、これらの幹細胞を応用する再生医療への期待が高まっている。現在、幹細胞の医療への応用は、疾患や障害により部分的な創傷を受けた臓器や器官に幹細胞を移入する方法の実用化が目指されている。さらに白血病治療では数多くの実績を有しているほか、心筋梗塞、パーキンソン病、脊髄損傷、糖尿病などの難治性疾患の治療法の確立にむけて臨床研究が進められている。

しかし、ES細胞の樹立には受精卵ないし受精卵より発生が進んだ胚盤胞までの段階の初期胚が必要となる。ヒトの場合には、受精卵を材料としているため倫理的に問題がある。先進国では新たなヒトES細胞の樹立を禁止している様に、いずれヒトになりうる受精卵を破壊する事に対する倫理的問題からヒトES細胞の作製を認めない国もある。

そこで分化した体細胞に c-Myc、Oct3/4、Sox2 および Klf4 をレトロウイルスにより導入することによりリプログラミングさせ、受精卵やES細胞を全く使用しよせず分化万能細胞を単離培養する iPS 細胞が作製された。しかし遺伝子の導入にレトロウイルスを使用すること、また癌化する危険性が拭いきれずリスクがある。そのため癌化遺伝子を導入する方法もとられているが、作出効率が極めて低下する問題があげられる。

幹細胞は胚性幹細胞と組織幹細胞に分類され、歯髄における幹細胞は後者の組織幹細胞に分類される。骨髄では表面マーカーを用いた組織幹細胞の分離が確立されているが、歯髄においては特異的な表面マーカーが存在せず、分離が困難であった。しかしフローサイトメトリーを使用し色素排出能が高い多分化能を有する SP 細胞の採取が可能となった。しかし、SP 細胞は、ヒト骨髄造血幹細胞同様に若年齢者に多くが存在する細胞数がすくない(Zohu S et al., 2001)。歯においては永久歯より乳歯に多く、マウスにおいても若年齢群で約 0.6%、加齢群においては 0.2%と存在量が少なく、安定した細胞数の採取が困難である。

近年の再生医療技術の進歩により、歯の再生も現実的なものとなってきた。具体的には、胎児期由来の細胞を再構築することで、人工的な歯の形成が可能となってきた。しかしながら、機能的な歯の形態を有する歯の再生には至っていない。

歯牙の形成は上皮の陥入により行われる。

歯周組織中に存在する上皮には、口腔粘膜上皮と連続して歯肉口腔上皮、歯肉溝上皮、歯牙と接した歯肉接合上皮、さらに歯根膜中に存在するマラッセ上皮遺残がある。歯牙の発生過程で、鐘状期以降、内外エナメル上皮が形成され、内エナメル上皮は歯冠側でエナメル芽細胞となりエナメル基質を産生する。その後、歯牙の発生とともに外エナメル上皮とともに退縮エナメル上皮となって口腔上皮とともに接合上皮を形成する。内外エナメル上皮は根尖部では、ヘルトウィツヒ上皮鞘となり歯牙の萌出とともに断裂し生体内に残存し、マラッセ上皮遺残として歯根膜のセメント質側に残存する。マラッセ上皮遺残は生体内で唯一、間葉組織中に埋入した上皮細胞であり、歯根嚢胞形成への関与や、歯根膜の恒常性の維持に関与しているといわれている。いずれの上皮も扁平上皮であるが、存在する場により役割の違うことから、それらの特性の詳細な検索が行われてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、マラッセ上皮遺残細胞の特性を明らかにし乳歯歯髄からの幹細胞活性をもつ side population(sp)細胞に着目し sp 化歯髄細胞を用い、マラッセ残存上皮細胞との共培養を行い、歯槽骨内にて機能的な歯牙の再生を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1. 組織標本の作製

マラッセ上皮遺残の組織標本は、生後6か月齢のブタ小白歯部を用いた。下顎骨を摘出後、薄切機にて厚さ5mmに薄切後、4%パラホルムアルデヒドにて1週間浸漬固定を行った。組織をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)にて洗浄し、10%エチレンジアミン四酢酸(EDTA)にて1か月間脱灰を行った後、通常に従いパラフィン包埋し、切片を作製した。

### 2. 免疫組織蛍光染色

パラフィン切片は通常に従い脱パラフィンを行い、10nmol/l、pH6.0のクエン酸ナトリウム緩衝液に浸水し、加圧および加熱して賦活化を行った。0.1Mウシ血清アルブミン含有PBSにより洗浄し、3%ヤギ血清により30分間ブロッキングを行った。一次抗体として抗ヒトcytokeratin-14 mouse monoclonal抗体(および抗ヒトCK-19 mouse monoclonal抗体と、p27kip1 rabbit polyclonal抗体(Abcam)を4にてオーバーナイトで反応させた。標本は0.1MBSA含有PBSにて洗浄後、二次抗体としてAlexa Flour® 488 goat anti-mouse IgGおよび546 goat anti-rabbit IgGを加え、Dapi Fluoromount-Gにて封入し、共焦点レーザー顕微鏡DIGITAL ECLIPSE C1を用いて観察、撮影した。

### 3. 細胞の単離および培養

マラッセ上皮遺残細胞は、生後6か月齢のブタ小白歯歯根膜から Brunette ら (1979) の方法に従った。詳細として、細菌感染を回避するためブタ小白歯および歯肉を5%次亜塩素酸ナトリウム溶液により消毒し、歯肉剥離を行った。抜歯後、歯肉粘膜上皮の混入を防止するため、歯根膜の根尖側1/2を剥離し、outgrowth法にて培養を行った。歯肉も同様にoutgrowth法を行い、歯肉粘膜上皮の培養を行った。outgrowth法にて歯根膜に含まれていたマラッセ上皮遺残の上皮細胞と、同じく歯肉粘膜からの上皮細胞は、2%ペニシリン-ストレプトマイシン、5 µg/ml アムホテリシン B、10%非働化ウシ胎児血清含有 Dulbecco modified Eagle medium で培養し、ディスパーゼ®により数回酵素処理して線維芽細胞の完全な除去を行った。得られた上皮細胞はそれぞれマラッセ上皮様細胞、歯肉粘膜上皮様細胞として5回継代を行い、実験に使用した。

### 4. 細胞増殖能

マラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞の細胞増殖能を測定するために、96穴プレート (AGC テクノグラス、静岡) に1×10<sup>4</sup>個の細胞をそれぞれ播種し、24、48、72および96時間培養した。その後、CyQuant® Cell Proliferation Assay Kit を使用して、得られたDNA量をInfinite® F200で計測した。

### 5. 統計学的検討

得られた測定値はIBM統計解析ソフトウェア IBM SPSS Statistics にて統計学的検討を行った。統計処理はスチューデントのt検定を用い、危険率が5%未満の場合に有意差ありとした。

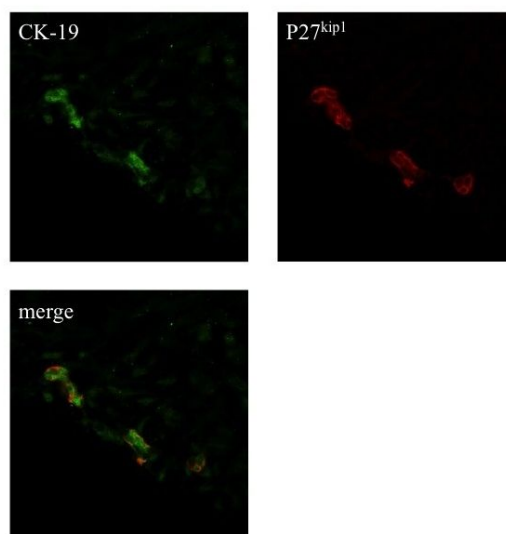
### 6. RT-PCR

幹細胞マーカーである Nanog および Stat3 と、テロメラーゼのサブユニットである逆転写酵素、Telomere reverse transcriptase (TERT) の発現を確認するため RT-PCR を行った。マラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞から TRIZOL® Reagent にて total RNA を抽出した。その後、Oligo (dT)12-18 プライマーおよび SuperScript® Reverse Transcriptase による逆転写反応を行い、cDNA を作製した。作製した cDNA は AmpliTaq Gold® DNA Polymerase を用い、プロトコールに従って標的遺伝子の増幅を行った。Nanog、Stat3 および TERT のプライマーは表1に示す。TaKaRa PCR Thermal Cycler を用い、至適条件の下で反応・増幅させた。得られた産物は Midori Green DNA Stain 含有1.5%アガロースゲルにて電気泳動を行い、ライトキャプチャーにて当該バンドを検出した。マーカーは Hae III を使用し、コントロールとしてハウスキーピング遺伝子である GAPDH の増幅も行った。

## 4. 研究成果

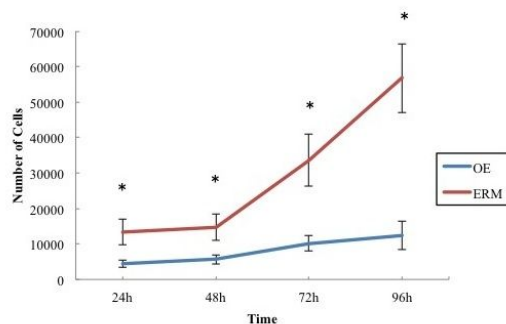
### 1. マラッセ上皮遺残細胞および歯肉粘膜上皮細胞における cytokeratin および p27kip1 の発現および局在

マラッセ上皮遺残細胞および歯肉粘膜上皮細胞における CK-14、-19 および p27kip1 の発現および局在の観察をするために、免疫組織蛍光染色を行った。CK-14 は、歯肉粘膜上皮において錯角化層に特異的に局在を認めるものの、マラッセ上皮遺残では発現が認められなかった。一方、CK-19 では、マラッセ上皮遺残細胞に局在を認めたが、歯肉粘膜上皮細胞の発現はみられなかった。p27kip1 は、CK-19 発現を認めたマラッセ上皮遺残細胞に局在を認めたが、歯肉粘膜上皮細胞では発現しなかった。それぞれの組織はヘマトキシリン・エオジン染色にて確認した。



### 2. マラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞の細胞増殖能の比較

ブタ歯根膜組織より単離・培養したマラッセ上皮様細胞、およびブタ歯肉より単離・培養した歯肉上皮様細胞において、DNA量で測定する Proliferation Assay Kit を使用して細胞増殖能の比較検討を行った。24、48、72および96時間で測定した結果、マラッセ上皮様細胞は歯肉上皮様細胞と比較して、24、48、72および96時間で有意な細胞増殖を認めた。



3. マラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞における TERT 発現の比較

RT-PCR にて GAPDH のマラッセ上皮様細胞および歯肉上皮様細胞のバンドを確認後、テロメラーゼのサブユニットである TERT の発現をマラッセ上皮様細胞と歯肉上皮様細胞で比較した。TERT の発現は、歯肉上皮様細胞と比較してマラッセ上皮様細胞で強いシグナルを認めた。

4. マラッセ上皮様細胞における幹細胞マーカーの発現

マラッセ上皮様細胞において、幹細胞マーカーである Nanog および Stat3 の発現について RT-PCR で確認した。マラッセ上皮様細胞では Nanog および Stat3 の発現を認めた。

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1件)

倉重 圭史, 村井 雄司, 首藤 かい, 村田佳織, 山崎 さや夏, 林 良宣, 永易 裕樹, 安彦 善裕, 齊藤 正人: マラッセ上皮遺残細胞における細胞増殖の特異性, 北海道医療大学歯学雑誌 32 巻 2 号 Page17-23, 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉重 圭史 (KURASHIGE, Yoshihito)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号: 30453278

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: