

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659867

研究課題名(和文)再構築された幹細胞ニッチェ中を用いた歯根膜由来幹細胞の未分化維持増殖

研究課題名(英文)Periodontal ligament cell growth with their stemness on reconstituted extracellular matrices mimicking stem cell niche

研究代表者

干場 隆志 (Hoshiba, Takashi)

山形大学・理工学研究科・助教

研究者番号：00469769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜細胞(PDL)、間葉系幹細胞(MSC)、および線維芽細胞(NHDF)より形成した脱細胞化マトリックスを作製した。脱細胞化前にはアクチンおよび細胞核が観察されたが、脱細胞化後には観察できなかったことから、細胞が除去できていることを確認できた。

作製した脱細胞化マトリックス上にPDLは接着することができ、その接着はPDLが形成した脱細胞化マトリックス上で最も多かった。さらに、PDLの増殖性を評価したところ、脱細胞化マトリックス上でPDLは増殖できたが、PDLおよびMSCが形成した脱細胞化マトリックス上ではその増殖は抑制された。このように、歯根膜細胞のニッチェの生体外での再構築が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Extracellular matrices formed by periodontal ligament cells (PDLs), mesenchymal stem cells (MSCs) and fibroblasts (NHDFs) were prepared as cell culture substrates by decellularization technique. Actin fibers and cell nuclei could not be observed after decellularization whereas they were clearly observed before decellularization, indicating that cellular components were removed from the substrates. PDLs can attach on these decellularized matrices. More PDLs attached on PDL-derived decellularized matrices than MSCs- and NHDFs-derived decellularized matrices. PDL can also grow on these decellularized matrices. However, the growth rates of PDLs on PDLs- and MSCs-derived decellularized matrices were lower than that on NHDF-derived decellularized matrices. It is expected that these decellularized matrices can be used as the substrates mimicking niche surrounding PDL in vivo.

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：歯根膜細胞 細胞外マトリックス 幹細胞ニッチェ 脱細胞化

1. 研究開始当初の背景

再生医療のための細胞源には低侵襲に採取できる細胞が望ましい。抜去歯周囲を覆っている歯根膜に含まれる幹細胞は、現在、臨床現場で用いられている間葉系幹細胞よりも、低侵襲に採取でき、また様々な細胞へと分化できるため、再生医療のための細胞源として期待できる (N Kawanabe, *Differentiation*, 2010)。しかしながら、継代培養中に分化能が低下するため、再生医療へと応用するためには歯根膜由来の幹細胞を、分化能を維持したまま、大量に増殖させる必要がある。

我々は、これまでに培養細胞により細胞外マトリックスを形成させた後、細胞成分のみを除去(脱細胞化)した脱細胞化マトリックスを作製してきた(図1)。特に間葉系幹細胞

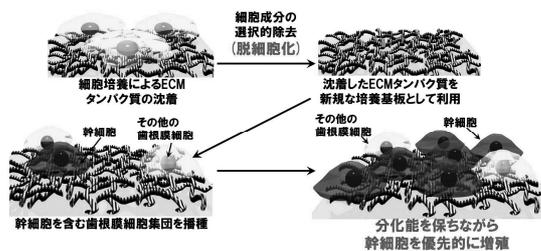


図1: 脱細胞化マトリックスの作製

が形成した脱細胞化マトリックス上では間葉系幹細胞の分化を抑制しながら増殖を促進することを見出した (T Hoshiba, *J Biol Chem*, 2009, *Adv Mater*, 2010)。さらに、細胞に適した脱細胞化マトリックスでないと、細胞増殖が抑制されることも見出した (T Hoshiba, *Biotechnol Prog*, 2011)。そのため、脱細胞化マトリックスを用い、歯根膜細胞集団中の幹細胞を優先的に、分化能を保持したまま増殖できると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、歯根膜細胞の分化能を保持したまま増殖できる、歯根膜細胞ニッチ環境を模倣した細胞培養基板を作製するために、細胞培養を行うことで、細胞に細胞外マトリックス(ECM)を形成させ、その後、脱細胞化処理を行うことで、細胞が形成したECMのみを調製し、新たな細胞培養基板として調製することを試みた。さらに、作製した細胞培養基板上に歯根膜細胞を播種し、歯根膜細胞の挙動を評価した。

3. 研究の方法

細胞により形成させたECMを新たな細胞培養基板として利用するために、脱細胞化マトリックスの作製を行った。脱細胞化マトリックスは以下の細胞を用いて作製を行った。歯根膜細胞(PDL)、ヒト間葉系幹細胞(MSC)、線維芽細胞(NHDF)、ヒト乳癌細胞株(MDA-MB-231、MCF-7)、ヒト乳腺上皮良性腫瘍株(MCF-10A)を用いた。

細胞を1-2週間、通常の細胞培養プレート上で培養後、Triton X-100 および NH₄OH を含

むリン酸緩衝液(PBS)で37℃で5分処理後、DNase I、RNase Aによりさらに1時間処理を行うことで、脱細胞化処理を行った。その後、作製した脱細胞化マトリックスを安定化するために、0.1%のグルタルアルデヒドを含むPBSを用い、4℃で6時間架橋後、一晚、グリシン含有PBSで処理を行うことで、未反応のアルデヒド基を反応させ、細胞培養基板として脱細胞化マトリックスを調製した。

脱細胞化の確認は、細胞骨格アクチンおよび細胞核をAlexa488結合ファロイジンおよびHoechst33258/ヨウ化プロピジウムにより可視化することで行った。また、脱細胞化処理後にECMが残存していること、をクマシープリリアントブルー染色を行うことにより確認した。

脱細胞化マトリックスへの細胞の接着性を評価するために、細胞接着実験を以下の通り行った。細胞を脱細胞化マトリックス上に無血清培地中で播種後、1時間培養を行った。その後、接着していない細胞をPBSで洗浄後、接着細胞をグルタルアルデヒドで固定した。固定した細胞をクリスタルバイオレットで染色し、接着細胞数を顕微鏡観察下で計測した。

細胞の増殖および抗癌剤耐性は以下の通りに評価した。細胞を10%血清含有培地中で各時間培養後、WST-8法を用いて細胞数を計測した。さらに抗癌剤(5-FU)耐性は、MDA-MB-231を1日培養後、5-FUを添加し、さらに、3日間培養後、増殖細胞数を同様に評価した。

4. 研究成果

まず初めに脱細胞化マトリックスが機能を持つか、癌細胞を例にして検討を行った。乳癌細胞株(MDA-MB-231:転移性、MCF-7:非転移性)および乳腺上皮良性腫瘍細胞株(MCF-10A)を1週間培養後、脱細胞化処理を行った(図2)。その結果、脱細胞化後には細

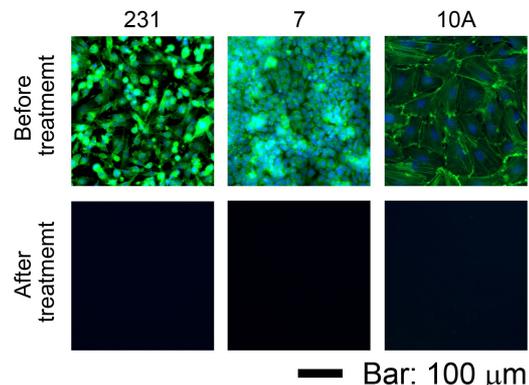


図2: 脱細胞化の確認: 231、7、10AはそれぞれMDA-MB-231、MCF-7、MCF-10A細胞

胞成分が除去されていることが確認できた。さらに細胞接着性を有することが確認でき、癌細胞の悪性度によって、その接着性が変化することを見出した。

細胞機能の評価を行ったところ、癌細胞の増殖は、癌細胞のうちでも特に転移性癌細胞、MDA-MB-231 が形成した脱細胞化マトリックス上で促進されていた(図 3)。一方、良性腫

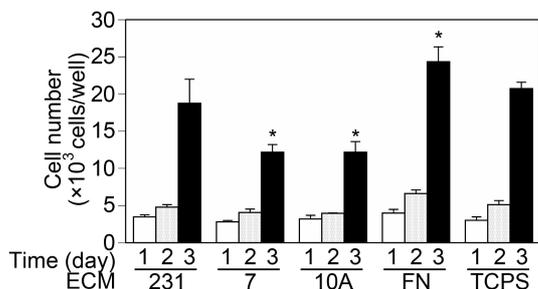


図 3:MDA-MB-231 の増殖 : 231、7、10A、FN、TCPS はそれぞれ MDA-MB-231、MCF-7、MCF-10A が形成した脱細胞化マトリックス、フィブロネクチン、通常の培養プレート。データは平均値 ± 標準偏差(n=3)。*: $P < 0.05$ vs. MDA-MB-231 が形成した脱細胞化マトリックス

瘍細胞(MCF-10A : 正常細胞モデル)の増殖はMCF-10A が形成した脱細胞化マトリックス上でのみ促進され、癌細胞が形成した脱細胞化マトリックス上では促進されなかった(図 4)。

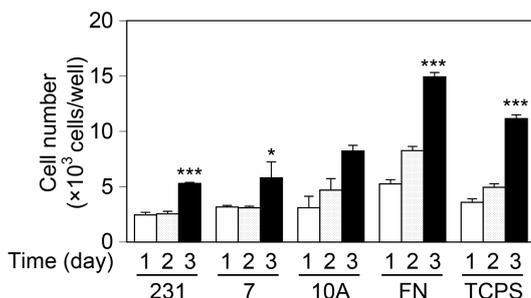


図 4:MCF-10A の増殖 : 231、7、10A、FN、TCPS はそれぞれ MDA-MB-231、MCF-7、MCF-10A が形成した脱細胞化マトリックス、フィブロネクチン、通常の培養プレート。データは平均値 ± 標準偏差(n=3)。*: $P < 0.05$ 、***: $P < 0.005$ vs. MCF-10A が形成した脱細胞化マトリックス

さらに、MDA-MB-231 の抗癌剤(5-FU)耐性を評価したところ、MDA-MB-231 が形成した脱細胞化マトリックス上でのみ、5-FU 耐性が 200 倍以上、従来の細胞培養基板上よりも亢進していた(図 5)。

上記のように、今回用いた脱細胞化方法によって、細胞機能に違いが見られることが確認できたため、次に、PDL、NHDF、MSC を用いて、脱細胞化マトリックスの作製を行った。

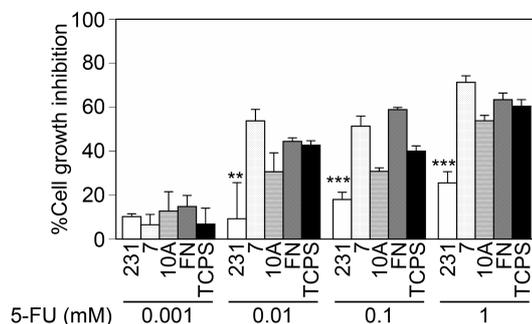


図 5:MDA-MB-231 の 5-FU 耐性 : 231、7、10A、FN、TCPS はそれぞれ MDA-MB-231、MCF-7、MCF-10A が形成した脱細胞化マトリックス、フィブロネクチン、通常の培養プレート。データは平均値 ± 標準偏差(n=3)。*: $P < 0.05$ vs. その他のマトリックス

PDL、NHDF および MSC を 2 週間培養後、癌細胞と同様に脱細胞化処理を行った。細胞核および細胞骨格アクチンを染色、可視化し、脱細胞化されていることを確認し、さらに CBB 染色によって、脱細胞化後にもタンパク質が残存していることを確認できた。

作製した脱細胞化マトリックスに細胞接着活性があるか調べるために、PDL の 1 時間後の細胞接着数を評価したところ、作製したすべての脱細胞化マトリックスに細胞接着活性が確認できた(図 6)。さらに、PDL は PDL

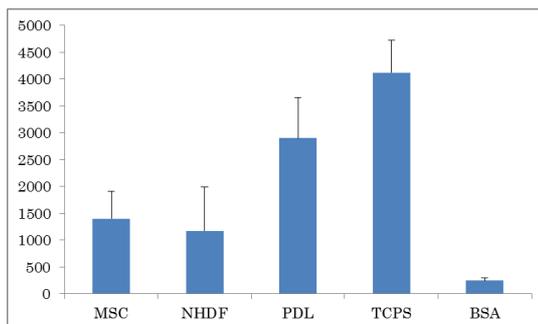


図 6 : PDL 細胞の接着活性 : データは平均値 ± 標準偏差(n=3)、TCPS、BSA はそれぞれ通常の培養プレートおよびウシ血清アルブミン。縦軸 : 接着細胞数(cell/cm²)

細胞が形成した脱細胞化マトリックス上で最も多く細胞が接着していた。

さらに PDL の増殖活性を評価したところ、どの脱細胞化マトリックス上においても PDL は増殖していたが、脱細胞化マトリックス上では増殖性に違いが見られ、幹細胞を含まない NHDF が形成した脱細胞化マトリックス上では PDL はよく増殖したが、幹細胞を含む細胞集団である PDL あるいは MSC が形成した脱細胞化マトリックス上では PDL の増殖は遅れ

ていた(図7)。

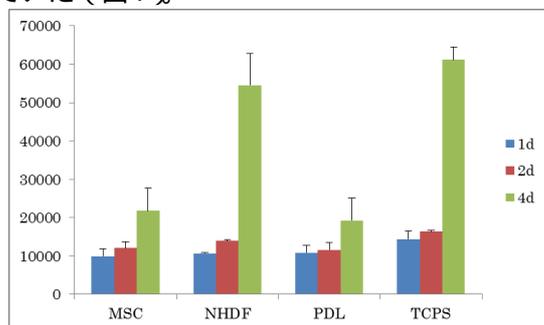


図7: PDLの増殖: 青、赤、緑の棒グラフはそれぞれ培養1日後、2日後、4日後の細胞数。データは平均値±標準偏差(n=3)。縦軸: 細胞数(cells/cm²)

上記の結果から、幹細胞が含まれる細胞集団が形成した脱細胞化マトリックス上ではPDLの増殖が抑制されることが明らかとなった。今後、歯根膜細胞の中の細胞集団に増殖の違いが見られたのか、さらにはそのメカニズムについて明らかにする必要がある。

本研究では、歯根膜細胞のニッチェを構築するための脱細胞化マトリックスの作製と機能評価を行った。その結果、幹細胞を含む細胞集団と含まない細胞とで細胞増殖が異なることが明らかとなった。このような違いが生じるメカニズムを明らかにすることにより、歯根膜細胞のニッチェの生体外での再構築が可能になると期待できる。

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. 干場 隆志、田中 賢、血液適合性高分子 PMEA への癌細胞の接着機構の解析。バイオマテリアル<生体材料> 32. 39-41 (2014)(査読無し、2013 年日韓バイオマテリアル学会若手研究者交流 AWARD 受賞研究に関する論文)

2. T. Hoshiba and M. Tanaka. Breast cancer cell behaviors on staged tumorigenesis-mimicking matrices derived from tumor cells at various malignant stages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439, 291-296 (2013).(査読有)

[学会発表](計 12件)

1. 干場 隆志、佐藤 一博、田中 賢、中間水量が異なる血液適合性高分子を用いた細胞接着の違いによる細胞選別の試み。第 63 回高分子学会年次大会、名古屋、2014.5.28-30

2. T. Hoshiba and M. Tanaka, Breast tumor cell behaviors on in vitro models mimicking extracellular matrix at different malignant stages. 2014 Society

For Biomaterials Annual Conference and Exposition. Denver, 2014, 16-19th, April.
3. 干場 隆志、佐藤 一博、田中 賢、中間水量の異なる高分子培養基板への細胞接着による細胞分離技術。第 13 回日本再生医療学会総会、京都、2014.3.4-6

4. T. Hoshiba and M. Tanaka, Characterization of attachment mechanisms of tumor cells on blood compatible polymer substrates. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、東京、2013.11.25-26(招待講演)

5. 干場 隆志、佐藤 一博、田中 賢、中間水量が異なる高分子への細胞接着の違いを利用した細胞選別。第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、東京、2013.11.25-26

6. 干場 隆志、佐藤 一博、田中 賢、中間水量の異なる高分子培養基板を用いた細胞の接着制御。第 62 回高分子討論会、金沢、2013.9.11-13

7. 干場 隆志、田中 賢、血液適合性材料上における細胞接着機構の解析～選択的接着の可能性～。第 42 回医用高分子シンポジウム、東京、2013.7.29-30

8. 干場 隆志、田中 賢、血液適合性材料を用いた吸着タンパク質の制御による癌細胞の接着/形態の制御。第 45 回日本結合組織学会学術大会第 60 回マトリックス研究会大会合同学術大会、和歌山、2013.6.28-29

9. 干場 隆志、田中 賢、癌進行模倣型マトリックスの開発と癌細胞の機能への影響。第 62 回高分子学会年次大会、京都、2013.5.29-31

10. 干場 隆志、田中 賢、中間水量の異なる血液適合性高分子上への癌細胞の接着機構。第 62 回高分子学会年次大会、京都、2013.5.29-31

11. 干場 隆志、培養中のバイオマテリアル界面変化を利用した培養基板の作製。日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、仙台、2012.11.26-27(招待講演)

12. 干場 隆志、田中 賢、脱細胞化法による癌進行模倣型マトリックスの作製。日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、仙台、2012.11.26-27

[図書](計 0件)

なし

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

なし

取得状況(計 0件)

なし

[その他]

1. 第 13 回インテリジェント・コスモス奨励賞受賞

2. 2013 年日韓バイオマテリアル学会若手研究者交流 AWARD 受賞(日本バイオマテリアル

学会)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

干場 隆志 (Hoshiba, Takashi)
山形大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：00469769

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

堀田 純一 (Hotta, Junichi)
山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：80301919