

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792157

研究課題名(和文) 幹細胞治療に向けた組織形成ポテンシャルと幹細胞ホーミング動態機構の解明

研究課題名(英文) Evaluation of in vivo tissue forming potential and homing of mesenchymal stem cells derived from human extracted teeth and bone marrow.

研究代表者

田巻 友一 (Tamaki, Yuichi)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：10609457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト抜去歯由来の4種類の幹細胞と腸骨由来骨髄幹細胞の比較評価を行い、幹細胞特性を明らかにすることを目的とした。in vivo評価では免疫不全マウス皮下に各種幹細胞移植を行い、in vitro解析では、細胞増殖能評価を行った。その結果、抜去歯幹細胞は硬組織形成能を有し、骨髄幹細胞より高い増殖能を有していた。本研究成果は、抜去歯は再生医療の開発に有用な細胞供給源であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We isolated and characterized dental stem cells (DSCs) from the dental pulp(DPSCs), periodontal ligament (PDLSCs), apical papilla (APSCs) and dental follicle (DFSCs) of mature and immature teeth, along with bone marrow-derived stem cells (BMSCs) from the iliac crest. This study compared the in vivo tissue forming capacities and proliferative potentials of these cells in terms of growth kinetics, telomerase activity. It was found that all kind of stem cells have hard tissue forming potential. In addition, it was demonstrated that DSCs possess and maintain high proliferative ability and retarded cellular senescence through long-term culture when compared with BMSCs. Our results provide new insights into the physiological properties of stem cells and indicate that DSCs are appropriate for basic research and clinical applications.

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

科研費の分科・細目：歯学・再生歯学

キーワード：抜去歯幹細胞 再生医学 硬組織形成能 テロメラーゼ活性

## 1. 研究開始当初の背景

近年、将来の再生医療に用いるため、幹細胞の有する性質について多くの研究がなされている。過去に抜去歯から分離した歯髄、歯根膜、歯小囊、歯乳頭幹細胞についてその特性を評価した報告は複数存在するが、個々の研究者が行う統一性を欠いた実験条件であるため、幹細胞本来の性質や機能を評価したものであるか疑わしい。本研究グループでは、上記4種類の抜去歯幹細胞に加え、間葉系幹細胞の代名詞となっている骨髄幹細胞を同一培養条件下で比較評価することで真に臨床応用に有用な幹細胞の同定が可能であると考え、評価を行った。その結果、抜去歯幹細胞は骨髄幹細胞と同等な多分化能を有し、さらに活発な増殖能を有していることを明らかにした。しかし、臨床応用を想定すると、細胞治療を行うには一定の幹細胞数の確保が必要である。また、幹細胞は損傷部位に遊走し、細胞増殖が活性化され組織修復を行うホーミング機能を有することが報告されている。

そこで、本研究では、抜去歯幹細胞と骨髄幹細胞における組織形成能についての *in vivo* 評価および幹細胞の長期培養による増殖能、老化度、テロメラーゼ活性、アポトーシス解析による特性評価を行った。

本研究は、5種類のヒト幹細胞の有する組織形成ポテンシャルと幹細胞のホーミング機構解明について評価を行い、将来の再生医療に向けた真に有用な幹細胞の同定を図るプロジェクトであることが考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト抜去歯の歯髄、歯根膜、歯小囊、歯乳頭に由来する幹細胞、さらに腸骨由来の骨髄幹細胞を用いて、これらの間葉系幹細胞が有する本来の幹細胞特性を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

抜去歯幹細胞と骨髄幹細胞を分離し、以下の比較評価を行った。

### (1) *in vivo* 評価

抜去歯幹細胞と骨髄幹細胞を免疫不全マウス皮下に移植を行い、各種幹細胞の組織形成能について組織学的解析を行い、評価した。

### (2) 長期培養による細胞増殖能の比較解析

4種類の抜去歯幹細胞と骨髄幹細胞について継代数 20 まで長期培養を行い、各種幹細胞の倍加レベル; population doubling level (PDL), 倍加時間; population doubling time (PDT)を算出し、細胞増殖能の変化を評価した。

### (3) 細胞周期解析

サブコンフルエントで細胞を回収し、メタノール固定後、PBS で洗浄し、Annexin V

Fluorescein staining kit(Roche) 10 分、室温でインキュベート後、PBS で洗浄し、Flowcytometry(Guava)にて解析した(継代数 15)。

### (4) 細胞老化関連 ガラクトシダーゼ染色による細胞老化解析

継代数 3, 10, 15, 20 でガラクトシダーゼ染色を行い、各種幹細胞間における細胞老化の割合を比較評価した。

### (5) テロメラーゼ活性測定

テロメア伸長関連酵素であるテロメラーゼ活性測定キットを用いて、抜去歯幹細胞と骨髄幹細胞のテロメラーゼ活性について相対定量を行った。

### (6) アポトーシス測定

細胞死(アポトーシスおよびネクローシス)が生じているか否かを評価するため、各種幹細胞群の陽性率をフローサイトメトリーにて定量評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) *in vivo* 評価

*in vivo* で各種幹細胞の有する組織形成能について解析した。免疫不全マウス皮下にハイドロキシアパタイト(HA)と各種幹細胞を移植し、16週間後に摘出し脱灰、固定後に切片を作製した。

ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色とマッソン・トリクロム(MT)染色の結果、各種幹細胞で硬組織形成がみとめられた。さらに移植したヒト幹細胞が硬組織を形成したか否かを特定するためにヒト特異的抗体である抗ミトコンドリア、ビメンチン抗体を用い、免疫染色を行った。

その結果、硬組織および HA 周囲に陽性反応を示した。また骨系マーカーである抗 DSP、BSP 抗体に陽性反応を示した。一方、control として HA 単独の移植群では硬組織形成は生じなかった。以上の結果より、移植したすべての幹細胞は硬組織形成能を有することが明らかになった。

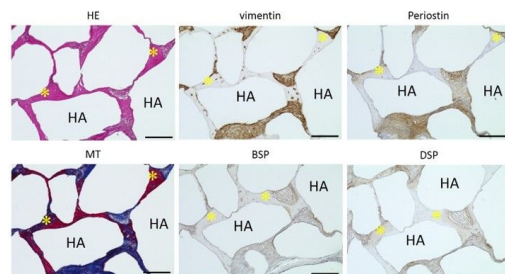


図 1: 抜去歯幹細胞移植群の一例(歯乳頭幹細胞移植群)。すべての幹細胞でハイドロキシアパタイト(HA)周囲に硬組織形成がみとめられた。(\*: 形成された硬組織)

(2) 長期培養による細胞増殖能の比較解析  
 in vitro による増殖能評価においては、異なる継代数で細胞増殖を算出した。その結果、倍加レベルにおいて抜去歯幹細胞は、骨髄幹細胞よりも高く、倍加時間は短かった。この傾向はすべての継代数で同様の傾向がみとめられた。これらの結果から、抜去歯幹細胞は長期培養においても骨髄幹細胞よりも活発な増殖能を有していることが明らかとなった。

(3) 細胞周期解析

継代数が進行した細胞は、増殖が緩徐となることが明らかとなったが、さらにフローサイトメトリーを用いて細胞周期解析にて確認を行った。その結果、継代数 15 では抜去歯幹細胞は骨髄幹細胞よりも分裂期に移行している細胞の割合が多かった。一方で休止期に移行している細胞の割合は骨髄幹細胞で多くみられた。

(4) 細胞老化関連 ガラクトシダーゼ染色による細胞老化解析

ガラクトシダーゼは老化細胞に特異的に染色されるマーカーとして用いられている。本研究では、異なる継代数における各種幹細胞間で陽性細胞数に差が生じるか比較検討した。その結果、継代数 3 では抜去歯幹細胞は陰性であったのに対し、骨髄幹細胞では約 10% 陽性細胞の反応がみとめられた。さらに継代数 10 に達すると、歯小囊、歯乳頭幹細胞は陰性であったが、歯根膜、歯髄幹細胞で陽性細胞数が増加した。継代数 15 に達するとすべての細胞種で陽性反応がみとめられた。しかし、各種幹細胞間には染色濃度に差がみられた。そこで濃度差による定量評価を行った。その結果、抜去歯幹細胞は低染色性の陽性細胞が多くみられた。一方で骨髄幹細胞では高染色性の陽性細胞が多くみとめられた。以上の結果から、骨髄幹細胞は抜去歯幹細胞よりも細胞老化が早いことが明らかとなった。

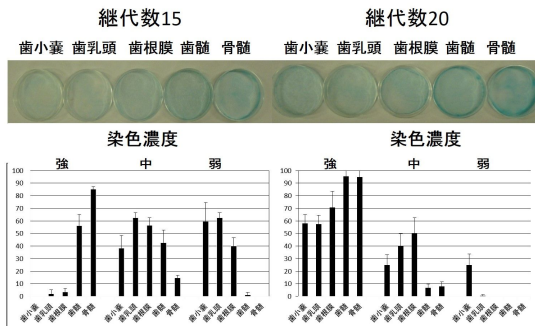


図 2：抜去歯幹細胞と骨髄幹細胞の老化度比較評価(継代数 15, 20)。抜去歯幹細胞は骨髄幹細胞より陽性染色性が低いことがみとめられた。

(5) テロメラーゼ活性測定

テロメラーゼ活性は細胞寿命を反映していることが報告されている。本研究では継代数 3 と 10 で各種幹細胞間の定量評価を行った。

定量評価には骨髄幹細胞を 1 として相対定量評価を行った。その結果、継代数 3 の時点では各種幹細胞間に大きな差はみとめられなかった。しかし、継代数 10 では抜去歯幹細胞と骨髄幹細胞には最大 7.5 倍(歯小囊幹細胞との相対比較)の大きな差がみとめられた。この結果より、抜去歯幹細胞は継代数が進んでも高いテロメラーゼ活性を有していることが明らかとなった。

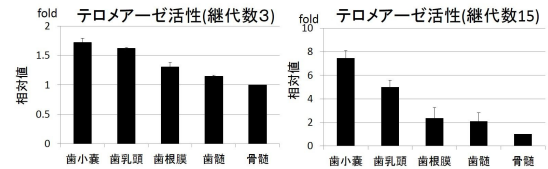


図 3：テロメラーゼ活性の相対定量  
 継代数 10 に達すると抜去歯幹細胞と骨髄幹細胞との間に大きな差が生じることが明らかとなった。

(6) アポトーシス測定

老化細胞は細胞死(アポトーシス)が生じているか否か評価するため、各種幹細胞群の陽性率をフローサイトメトリーにて定量評価を行った。その結果、継代数 3 と 15 の両方ですべての幹細胞群でアポトーシスおよびネクローシスは生じていないことが明らかとなった。この結果から老化細胞にはアポトーシスは生じていないことが明らかとなった。

本研究は抜去歯幹細胞の組織形成能と増殖能について焦点を当て、抜去歯幹細胞の特性評価解析を行った。抜去歯幹細胞とハイドロキシアパタイトを混在させマウス皮下に移植を行い、HE、MT、免疫染色による組織学的評価を行った。その結果、すべての幹細胞群で HA 周囲に硬組織形成が観察された。また、将来の細胞をベースとした再生医療は、一定数の幹細胞の確保が必要である。そこで、本研究では、幹細胞の長期培養による増殖能、老化度、テロメラーゼ活性、アポトーシス解析による特性評価を行った。その結果、細胞増殖能に関しては継代数が増加しても抜去歯幹細胞は骨髄幹細胞よりも高い増殖率能を示した。継代数 3 の時点ではヒト抜去歯幹細胞は、ガラクトシダーゼに陰性であったのに対し、骨髄幹細胞では約 10% が陽性反応を示した。さらに、継代数 15 になると抜去歯幹細胞よりも骨髄幹細胞で陽性染色濃度が上昇した。また、テロメラーゼ活性は、その差が最大 7 倍と増大した。以上のことから、抜去歯幹細胞は高い増殖能を有することから幹細胞のホーミング機構解明のための有用なツールとなることが考えられる。また、現在、医療廃棄物として扱われている抜去歯は、

将来の再生医療のための細胞供給源として有用である可能性が高いことが明らかとなった。

昨年は国際幹細胞学会 (ISSCR) がアメリカのボストンで開催され、今年には日本再生医療学会で口演発表を行い、本研究内容の一部を発表した。その結果、複数の反響を得た。今後はさらに詳細な抜去歯幹細胞の特性評価を行い、真に有用な幹細胞同定を行う予定である。

#### 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)

Ide Y, Nakahara T, Nasu M, Matsunaga S, Iwanaga T, Tominaga N, Tamaki Y. Postnatal Mandibular Cheek Tooth Development in the Miniature Pig Based on Two Dimensional and Three Dimensional X Ray Analyses. Anat Rec (Hoboken), 2013, Aug, 296, 8, 1247-1254.

Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. Odontology, 2013, July, 101, 2, 121-132.

[学会発表](計 10 件)

Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S : Comparison of cellular aging and senescence in serially passaged long-term cultures of mesenchymal stem cells derived from extracted teeth and bone marrow. English 学内発表会, 日本歯科大学生命歯学部第 2 会議室, 東京, 2014 年 3 月 7 日.

田巻 友一, 中原 貴, 石川 博, 佐藤 聡 : 4 種類の抜去歯由来幹細胞における in vitro 解析および in vivo 組織形成能評価, 第 14 回日本再生医療学会総会, 国立京都国際会館, 京都, 2014 年 3 月 4 日.

田巻 友一, 中原 貴, 石川 博, 佐藤 聡 : 抜去歯由来 4 種類の幹細胞および腸骨骨髓由来幹細胞の継代培養による細胞増殖と細胞死に関する比較解析, 第 13 回日本抗加齢医学会総会, パシフィコ横浜会議センター, 横浜, 2013 年 6 月 29 日.

Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S : In vivo tissue formation of mesenchymal

stem cells derived from human extracted immature teeth and mature wisdom teeth. 11th Annual Meeting International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Boston, USA, June 13-16, 2013.

田巻 友一, 中原 貴, 石川 博, 佐藤 聡 : In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow 学術研究奨励賞受賞講演、日本歯科大学新潟生命歯学部講堂, 新潟, 2013 年 6 月 8 日.

田巻 友一, 中原 貴, 石川 博, 佐藤 聡 : 長期培養における抜去歯および骨髄由来体性幹細胞の増殖能の比較検討, 第 13 回日本再生医療学会総会, 横浜, パシフィコ横浜, 2013 年 3 月 21 日.

Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S : In vivo tissue formation of mesenchymal stem cells derived from human extracted teeth. 日本歯科大学新潟生命歯学部アイヴィホール, 新潟, 2013 年 3 月 8 日.

田巻 友一, 中原 貴, 石川 博, 佐藤 聡 : 4 種類の抜去歯幹細胞と腸骨骨髓幹細胞の増殖能評価, 第 10 回日本再生歯科医学会総会, 兵庫, ニチイ学館神戸ポートアイランドセンター 2012 年 9 月 1 日~2 日.

田巻 友一, 中原 貴, 石川 博, 佐藤 聡 : 抜去歯由来 4 種類の幹細胞および腸骨骨髓由来幹細胞の継代培養による細胞老化に関する比較解析, 第 12 回日本抗加齢医学会総会, 横浜, パシフィコ横浜, 2012 年 6 月 22 日~24 日.

田巻 友一, 中原 貴, 石川 博, 佐藤 聡 : ヒト抜去歯及びその付着組織由来間葉系幹細胞のシングルセル法による解析, 第 11 回日本再生医療学会総会, 横浜, パシフィコ横浜, 2012 年 6 月 12 日~14 日.

[その他]

ホームページ等

[http://www.tky.ndu.ac.jp/faculty/base-course/ha\\_ssei/index.html](http://www.tky.ndu.ac.jp/faculty/base-course/ha_ssei/index.html)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田巻 友一 (TAMAKI YUICHI)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号 : 10609457