

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861896

研究課題名(和文) 神経堤由来細胞を用いた歯胚再生技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of tooth germ regeneration using neural crest derived cells

研究代表者

宮内 知彦 (Miyauhi, Tomohiko)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：20611502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では成体から採取可能な細胞を用いた歯や骨の再生を目指し、成体に潜伏し多分化能を有す神経堤細胞を標識できる、PO-Cre/CAG-CAT-EGFP 成体マウス毛包から採取した神経堤由来細胞(NCDCs)の細胞増殖、分化能について解析した。

NCDCsは一定の条件下で、未分化な状態で増殖し、骨芽細胞、脂肪細胞や神経細胞へと分化誘導可能であった。NCDCsとエナメル芽細胞との共存培養下では細胞接触部で象牙芽細胞マーカー遺伝子が発現した。またin vivoにてNCDCsの硬組織形成能を解析している。

本研究結果から、成体から採取可能な細胞を用いた硬組織再生の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neural crest(NC) cells are maintained in an undifferentiated state as NC-derived cells (NCDCs) throughout the life of the animal. We utilized PO-Cre/floxed-EGFP mice (PO mice), in which NCDCs remain labeled with green fluorescent protein (GFP) even after birth. We observed proliferation and differentiation of NCDCs harvested from whisker pad in adult PO mice.

NCDCs harvested from whisker pad proliferate stably in certain conditions, and the expression of neural crest-related genes was observed. Our findings demonstrate that NCDCs have the potential to differentiate into osteoblasts, adipocytes, and neuronal cells. Expression of odontoblast marker genes was confirmed at the contact aeriels of the respective cells when co-cultured with ameloblasts and NCDCs. Hard tissue regenerative capacity of NCDCs also have been evaluated in vivo.

NCDCs from the whisker pad, which are easily accessible in adult, can be cultured and may be a useful cell source for regeneration of the hard tissue.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経堤細胞 毛包 再生医学 硬組織再生 歯胚再生

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 歯胚再生への期待

日常生活の「咀嚼・嚥下」や「自立歩行」は高齢者の QOL 維持・向上に欠かせないものである。現在、「咀嚼」回復には義歯やインプラントによる歯科治療が施されるが、次なるオプションとして歯や歯槽骨の再生が注目されている。多くの研究機関から一定の研究成果が報告され (Nakao K, Nat Methods, 4, 2007), ヒトへの歯や歯槽骨の再生医療に実現の可能性が見えてきた。

### (2) 歯胚再生に求められる細胞ソース(素材となる細胞)の条件

歯や歯槽骨の再生が必要な対象患者の多くは中高齢者であることから、歯源性細胞(矯正治療による抜去歯や萌出前第三臼歯)以外に細胞ソースを求めなければならない。歯の再生医療を想定した場合の細胞ソースには、歯源性細胞以外で、容易にかつ低侵襲に採取でき、歯を喪失するような大人からも得られることが必要条件と考える。

### (3) 再生医療における神経堤由来細胞の有用性

神経堤由来細胞は脊椎動物の胎生初期に神経間癒合部から発生し、広く胚内を遊走した後、遊走先の環境で多様に分化する体性幹細胞であり、歯や顎顔面を形成する間葉系硬組織構成細胞の起源であることが知られている (Chai Y, Development, 127, 2000)。近年、一部の神経堤由来細胞が生体マウスの後根神経節、骨髄や毛包に存在することが報告された (Nagoshi N, Cell Stem Cell, 2, 2008)。

### (4) 再生医療における細胞のパターン培養技術の利用

未分化な細胞を目的とする細胞に分化誘導した後の課題は、細胞の配置や構成を制御して生体組織を作製し体内に移植することである。現在の細胞パターンニング研究は、基板側の基材表面加工 (Sasaki D, Biomaterials, 30, 2009) とインクジェットなどを用いた直接パターンニング (Nakamura M, Tissue Eng, 11 2005) に大きく分けられ、血管再生の分野で研究が進められている。

申請者はこれまでに、毛包に存在する神経堤由来細胞に着目し、歯胚再生や歯槽骨の再建を目標に成体マウスからの神経堤由来細胞の単離、培養について研究について取り組み、培養条件による細胞増殖や分化誘導について多くの知見ならびに情報の蓄積がある。さらに、二酸化チタン薄層コーティングへの UV 照射の影響についての研究から、光触媒に対する知識や経験も豊富である。

## 2. 研究の目的

(1) 比較的高密度に神経堤由来細胞が存在する毛包内の詳細な局在や、神経堤由来細胞の

効率的な培養方法について明らかにする。

(2) 培養した神経堤由来細胞の性質や多分化能について解析する。

(3) 神経堤由来細胞と上皮系細胞との上皮-間葉相互作用を解析する。

(4) 硬組織再生の細胞ソースとして毛包から採取した神経堤由来細胞の有効性を確立する。

## 3. 研究の方法

(1) 神経堤に由来する細胞を green fluorescent protein(GFP) で標識できる P0-Cre/CAG-CAT-EGFP(P0) 成体マウスの頬髭毛包における GFP 陽性細胞の分布を解析した。

(2) P0 成体マウス毛包から細胞を採取し、種々の酵素処理の作用時間、作用順序など諸条件の検討を行い、培養後の細胞をフローサイトメーターで比較検討し、神経堤由来細胞の純化効率の良い条件を探索した。

(3) P0 成体マウス毛包から採取、培養した神経堤由来細胞の性質を遺伝子発現にて解析した。

(4) 純化した神経堤由来細胞を種々の培地を用いて細胞分化について検討した。

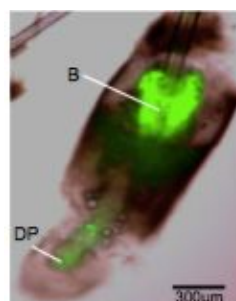
(5) 純化した神経堤由来細胞とエナメル芽細胞の共存培養にて上皮間葉相互作用について解析した。

(6) 毛包から純化した神経堤由来細胞をマウス頭蓋骨欠損に移植し、欠損部の骨修復について  $\mu$ CT にて観察した。

## 4. 研究成果

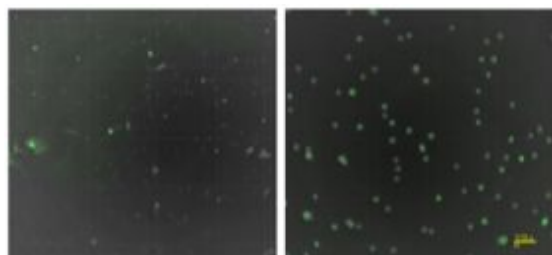
(1) マウス頬髭における GFP 陽性細胞の詳細な分布を蛍光顕微鏡像により観察したところ、幹細胞が存在するバルジ領域(B)、発毛の起源となる毛乳頭(DP)に GFP 陽性細胞が認められた。

図: P0 マウス頬髭毛包における GFP 陽性細胞の分布



(2) マウス頬髭毛包を酵素処理して採取した毛包細胞を幹細胞用培地にて培養すると神経堤由来細胞が増殖した。増殖した全細胞に対する GFP 陽性細胞の割合について、フローフローサイトメーターによる解析を行うと、培養日数を重ねるごとに GFP 陽性細胞の細胞数が増殖しその割合は培養 14 日後 90%以上を占めることが確認された。

図：増殖した GFP 陽性細胞



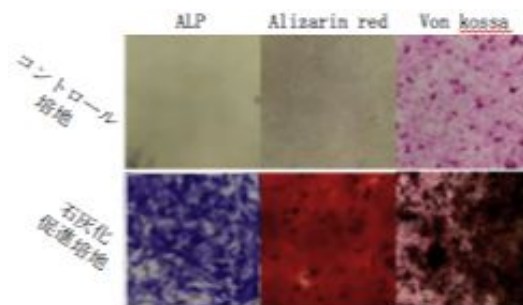
採取直後の毛包細胞      培養 14 日目毛包細胞

(3) 増殖した GFP 陽性細胞における遺伝子発現について解析すると、神経堤関連遺伝子 P75, Snail, Twist, Musashi1 の発現が認められた。

(4) 毛包から採取した神経堤由来細胞をインスリンなどを含む脂肪細胞誘導培地で培養すると、脂肪細胞の特徴である Oil-red O 染色陽性の脂肪滴の形成と、リポプロテインリパーゼの mRNA 発現を認めた。またホポリエチレンイミンコートディッシュ(ガラスディッシュにホポリエチレンイミンをコートしたもの)にて、bFGF などを含む幹細胞用培地に神経成長因子(NGF)を添加し、14 日間神経堤由来細胞を培養したところ、神経細胞の特徴である sphere を形成し、細胞から突起を伸ばしている様子が観察された。

(5) BMP-2 を添加した骨芽細胞分化誘導培地で神経堤由来細胞を培養すると、骨芽細胞分化マーカーである ALP, OCN, OSX の発現が認められた。また、グリセロフォスフェートなどを含む石灰化促進培地で培養し、石灰化について観察したところ、石灰化関連酵素の 1 つであるアルカリホスファターゼの産生が上昇した。さらに、アリザリンレッド染色、Von kossa 染色により石灰化物の形成を認めた。

図：分化誘導により、石灰化硬組織を形成



(6) エナメル芽細胞と神経堤由来細胞の共存培養を行い、7 日間培養後の免疫蛍光染色象 象牙細胞マーカー遺伝子の DSP がエナメル芽細胞と神経堤由来細胞の接触部で確認された。

(7) ICR WT マウス頭蓋骨に直径 4mm のトレフィンバーにて骨欠損を形成し、BMP-2 を添加して培養した神経堤由来細胞を Matri gel を足場として移植した。移植後 4 週目と 12 週目に  $\mu$ CT にて観察したところ、どのマウスにおいても頭蓋骨欠損部を修復するような硬組織の形成を認めなかった。

本研究結果から毛包といった成体から低侵襲で採取可能な神経堤由来細胞を細胞ソースとした、象牙質や骨を含む硬組織再生の可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 知彦 (MIYAUCHI TOMOHIKO)

昭和大学・歯学部・歯科補綴学講座・兼任  
講師

研究者番号：20611502

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：