

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861912

研究課題名(和文) 口腔組織幹細胞の有用性と限界を探索する挑戦的基礎研究：各幹細胞に適した再生医学の開発

研究課題名(英文) Challenging basic research for exploring the usefulness and limitations of stem cells from oral tissue: the establishment of regenerative medicine that are suitable for each stem cells

研究代表者

阿部 成宏 (ABE, Shigehiro)

東京医科歯科大学・歯学部・その他

研究者番号：00510364

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)：再生医療において複雑な幹細胞分離法は臨床応用には不向きである。neurosphere培養法は、幹細胞の分離法の1つである。現在までにヒト口腔粘膜細胞に本手法を応用し、評価した報告はない。ヒト口腔粘膜由来細胞を本法により、スフェア形成した細胞(OMSFCs)を幹細胞生物学的に検討した。OMSFCsは自己複製能を保持し、ある種の神経堤関連遺伝子の発現上昇を認めた。OMSFCsは神経堤細胞系統へと分化能力を保持し、in vivo硬組織再生実験において骨形成能を保持していることを見出した。本研究より、OMSFCsは神経堤組織および骨再生医療において重要な細胞供給源となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Complex isolation methods are not suitable for the clinical application of stem cells. The neurosphere culture technique is a convenient method for isolation of stem cells. However, isolation and characterization of human oral mucosa stromal cells (OMSCs) using this culture system has yet to be understood. Human OMSCs were isolated from human oral mucosa, and these cells formed spheres in neurosphere culture conditions. Oral mucosa sphere-forming cells (OMSFCs) were characterized by biological analyses of stem cells. OMSFCs had the capacity for self-renewal and expressed neural crest-related markers. Furthermore, upregulated expression of neural crest-related genes was observed in OMSFCs. Finally, OMSFCs were capable of differentiating into neural crest lineages in vitro, and generating ectopic bone tissues. The results of this study suggest that OMSFCs are an effective source of cells for the neural crest lineage and hard tissue regeneration.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔粘膜 神経堤幹細胞 骨再生 組織工学 neurosphere法 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

顎口腔領域の幹細胞は現在までに歯髄幹細胞、歯根膜幹細胞、顎骨骨髓幹細胞(Yoshida C et al. J Craniofac Surg, 2016)および歯肉・口腔粘膜幹細胞が広く知られている。近年、口腔粘膜間葉組織由来の幹細胞に関して報告がなされた(K. Marynka-Kalmani *et al.* Stem Cells 2010.)。しかしながら、現時点は口腔粘膜間葉組織由来幹細胞に関する報告は少なく、幹細胞の分離方法など不明な点が多く残っている。口腔粘膜間葉組織は神経堤由来であり、神経堤幹細胞が存在している可能性が示唆されているが、神経堤幹細胞としての条件を満たす報告は少ない。

2. 研究の目的

現在までに、歯髄幹細胞、歯根膜幹細胞、顎骨骨髓幹細胞を用いた硬組織再生能に関してはある程度の再生医療への応用を視野に入れた成果が報告されているが、口腔粘膜間葉組織幹細胞に関しては報告も少なく、硬組織再生能は、非常に少ないことが報告されている。そこで、ヒト口腔粘膜(口唇、口蓋、歯槽堤)由来間葉系細胞を用いて、Neurosphere法を応用した幹細胞の単離とその細胞の性状解析を行った。

3. 研究の方法

東京医科歯科大学歯学部倫理委員会の承認の下、口腔外科手術時に得られた13例の口腔粘膜組織を実験に用いた。

(1) 組織学的評価

凍結切片を用いて、ヘマトキシリンエオジン染色および免疫染色を行った。

(2) 細胞培養

口腔粘膜組織を2-3 mm大の組織片にし、10%FBS添加のIMDM(Gibco)培地を用いてoutgrowth培養にて口腔粘膜間質細胞(Oral mucosa stromal cells; OMSCs)を得た。

(3) 細胞老化

Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal)染色(BioVision)を用いて、継代数2、5.10で評価した。

(4) 細胞増殖能の評価

OMSCsを5000cells/wellで96穴培養皿に播種して、培養1, 3, 5, 7日目でcell counting kit(Dojindo)を用いて評価した。

(5) コロニー形成能の評価

第2-3継代目のOMSCsを500, 1000cell/wellで6穴培養皿に播種し、培養14日目にWright染色液(Wako)にて染色し、評価した。

(6) Neurosphere 培養

OMSCsを 2.0×10^4 cells/wellにて超低付着培養皿を用いて無血清のDMEM/F12(Gibco)にN2サプリメント(Gibco)、20ng/mlのEGF(Sigma)、20ng/mlのbFGF(R&D systems)を添加した培地にて7日間培養し、口腔粘膜由来のsphere形成細胞(Oral mucosa sphere-forming cells/OMSFs)を得た。

(7) 免疫染色

組織切片および細胞は、4%パラホルムアルデヒド固定を行い、Blocking One Hist(Nacalai)にてブロッキングを行った後に、1次抗体としてnestin(eBioscience)、CD44(eBioscience)、CD29(Pharmlingen)、CD34(Cell Marque)、CD45(Pharmlingen)、Flk1/KDR(R&D systems)、CD73(Pharmlingen)、CD90(Pharmlingen)、 α -smooth muscle actin(α SMA)(R&D systems)、 β -Tubulin(eBioscience)、Type collagen(Co)(Millipore)を室温で1時間反応させ、2次抗体としてanti-mouseまたはanti-rat IgG-conjugated Alexa488、Alexa594(Invitrogen)を用いて30分反応させ蛍光免疫染色を行った。

(8) フローサイトメトリー

CD34、CD45、Flk1/KDR、CD29、CD44、CD73およびCD90に関してMoxi Flow cytometer(ORFLO)にて解析した。

(9) マイクロアレイ

GeneChip Human Genome U133 plus 2.0を用

いて行った。

(1 0) RT-PCR

SuperScript one-step RT-PCR 試薬 (Invitrogen) を用いて行った。

(1 1) 分化誘導

骨芽細胞:【分化誘導法】BMP2(R&D systems)、デキサメタゾン(Sigma)、アスコルビン酸(Sigma)、 β -グリセロリン酸(Sigma)【評価法】Alizarin red 染色にて評価。

脂肪細胞:【分化誘導法】デキサメタゾン(Sigma)、IBMX(Sigma)、インスリン(Sigma)、インドメタシン(Wako)【評価法】Oil red O 染色にて評価。

軟骨細胞:【分化誘導法】マイクロマスペレット培養法。ITS premix (BD Bioscience)、TGF- β 1 (R&D systems)、ピルビン酸ナトリウム(Wako)。【評価法】トリイジンブルー染色、型コラーゲン免疫染色にて評価。

平滑筋細胞:【分化誘導法】TGF- β 1 (R&D systems)【評価法】 α SMA 免疫染色にて評価。

神経細胞:【分化誘導】db-cAMP(Sigma)、NGF(R&D systems)、IBMX(Sigma)、bFGF(R&D systems)、レチノイン酸(Sigma)【評価法】 β -tubulin の免疫染色にて評価。

(1 1) 免疫不全マウスへの移植実験

多孔性 OPLA スキャホールド (BD Bioscience) に sphere 形成細胞を播種して 10 日間上記のごとく骨芽細胞へ分化誘導し、ヌードマウスの皮下組織へ移植し、10 週後の組織を摘出し、脱灰切片にて硬組織再生能を評価した。

4 . 研究成果

(1) 組織学的評価

組織学的評価では幹細胞と思われる細胞の局在を検討した。現在、決定的なマーカーがないため、多能性幹細胞由来の神経堤幹細胞では Nestin と CD44 が共陽性であるという報告からこれらに関して検討した。Nestin は上皮直下の粘膜固有層に存在し、CD44 陽性の基底層の上皮細胞にはその発現は認めず、こ

の部位の Nestin 陽性細胞は CD44 も共発現していた(図 1)。これらは、歯槽粘膜、口唇粘膜および口蓋粘膜でも同様の所見であった。

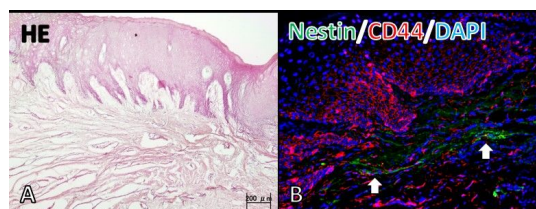


図 1 : 口腔粘膜組織の組織学的評価

A : ヘマトキシリンエオジン染色
B: Nestin/CD44 免疫染色。Nestin⁺/CD44⁺細胞は上皮直下の粘膜固有層に存在していた。

(2) 口腔粘膜間質細胞の性状解析

口腔粘膜間質細胞 (OMSCs) の性状解析を行った。初代培養は Out-growth 培養により培養した(図 2A)。初代培養により得られた細胞を継代し、本研究に用いた。細胞は維芽細胞様の細胞のみを認めた。成体幹細胞では、細胞老化による増殖能と分化能の低下が認められるため、これらに関して SA- β -Gal 染色にて評価を行った。第 10 継代目以降から Gal 陽性の大型の老化細胞が認められた(図 2B-D)。第 2 継代目から 7 継代目は非常に安定し、老化細胞も少ないことから本研究ではその間の細胞を用いた。細胞増殖能に関しては、3 か月から 42 歳まで検討したが年齢による増殖能の違いは認められなかった(図 2E)。これらの細胞は、コロニー形成能を保持しており、間葉系幹細胞または神経堤幹細胞集団が多く存在していることが示唆されました(図 2F-G)。OMSCs のマーカーに関して検討した結果、nestin、CD44 陽性細胞を多く認め、これらは造血系マーカー、血管内皮マーカーの発現は認めず、間葉系幹細胞マーカーに関しては一様に発現していた(図 3)。フローサイトメトリーにおいてもこれらの表面マーカーは同様の結果であった。

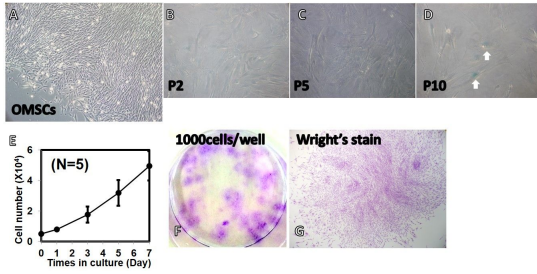


図 2 : OMSCs の性状解析 A:初代培養、B-D : SA-β-gal 染色、E : 増殖曲線、F-G : コロニー形成能。

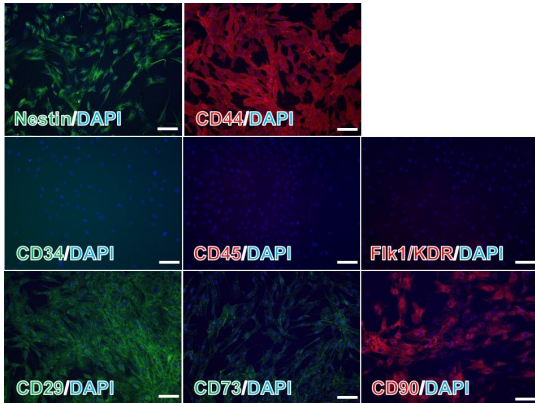


図 3 : OMSCs のマーカー解析

(3) ニューロスフェア培養

OMSCs をニューロスフェア法によりスフェア形成を行った (以降 OMSFCs) (図 4A)。スフェア形成能は良好であり、これらは HE 染色の結果、内部に壊死層を持たず、附着系培養にて培養すると増殖能の高い細胞が認められた。スフェア形成能は個人差があるものの年齢による有意差は認めなかった。これらは継代しても若干の形成能は低下するもののスフェア形成能を保持していた。また、神経堤幹細胞および神経堤マーカーである Nestin、CD44、Slug および Snail の発現を認め、神経堤幹細胞の存在が強く示唆された(図 4B-C)。

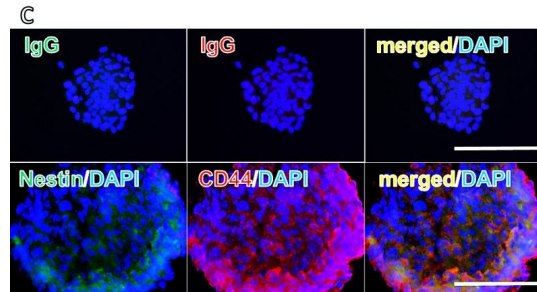
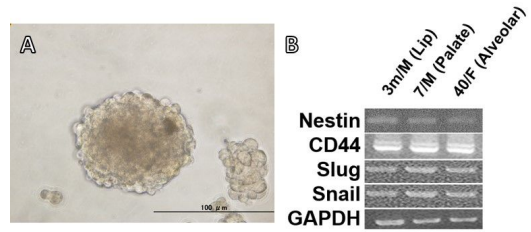


図 4 : OMSFCs の性状解析

A: OMSFCs、B: 神経堤関連遺伝子の RT-PCR、OMSFCs の nestin および CD44 の蛍光免疫染色

(4) マイクロアレイによる OMSCs と OMSFCs の発現遺伝子の検討

OMSCs と OMSFCs における発現遺伝子の変化をマイクロアレイにて検討した。その結果スフェア形成することで神経堤関連遺伝子では EDNRA、Sox9 および Hes1 が有意に発現上昇し、その他として Spon1 および $\alpha 2$ インテグリンなどの発現上昇を認めた。マイクロアレイにて発現上昇したものを RT-PCR にて検討した結果、これら 3 つの遺伝子は多能性幹細胞由来の神経堤幹細胞でも発現上昇しており、スフェア形成により、神経堤由来細胞が多く存在していることが示唆された。また、 $\alpha 2$ インテグリンである CD49b についても検討したところ、スフェア形成により蛋白レベルでも同様の結果を示した。培養方法により表面マーカーが変化することは非常に興味深く、間葉系幹細胞でも同様の報告があるが、その機能的な意義は不明である。

(5) 神経堤細胞系統への分化誘導

OMSFCs が神経堤細胞系統への多分化能が

あるかどうかに関して検討した。適切な環境下で骨、軟骨、脂肪、平滑筋および神経細胞系統への分化能を認めた(図 5)。

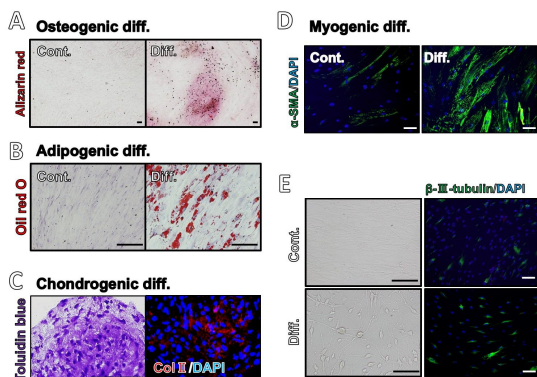


図 5：神経堤細胞系統への分化誘導

A:骨芽細胞分化、アリザリンレッド染色、B:脂肪細胞分化、オイルレッドO染色、C:軟骨細胞分化、トルイジンブルー、II型コラーゲンの免疫染色、D:平滑筋細胞分化、 α -smooth muscle actin の免疫染色、E:神経細胞分化、 β -tubulin の免疫染色

(6) *in vivo* 硬組織形成能

OMSFCs の *in vivo* 硬組織形成能を検討した。ポリ乳酸系の多孔性スキャホールドに細胞を播種し、BMP2 添加の分化誘導培地にて 10 日間培養したものをヌードマウスの皮下組織に移植し、10 週目に摘出し組織学的に評価した。いずれのサンプルでも硬組織を認め、無細胞性硬組織と骨細胞様細胞を認める骨様組織を認めた。無細胞性硬組織はセメント質様であった。近年、先の遺伝子変化で検討した Spon1 がセメント芽細胞のマーカーとなりうる事が報告されているので、何らかの関係がある可能性があるが詳細は不明である。これらの再生硬組織はヒト特異的抗体ならびにヒトオステオカルシンに対して陽性であることから、ヒト由来の硬組織であることが示唆された。

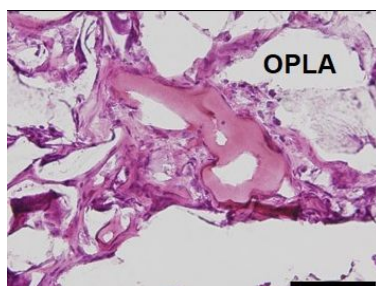


図 6：in vivo 硬組織再生能

【結語】本研究より、neurosphere 法によって単離された OMSFCs は神経堤組織および骨再生医療において重要な細胞供給源となる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4件)

(1) Yoshida C, Yamaguchi S, Abe S, Harada K. Property of Human Bone Marrow Stromal Cells Derived From Bone Fragments Removed in Sagittal Split Ramus Osteotomy. J Craniofac Surg., 2016 (in press).

(2) S. Abe, S Yamaguchi, Y Sato, K Harada. Sphere-derived multipotent progenitor cells obtained from human oral mucosa are enriched in neural crest cells. Stem Cells Transl. Med., 5, 117-129, 2016. 査読あり

(3) S. Abe, N Yokomizo, Y Kobayashi, K Yamamoto. Confirmation of immunoglobulin heavy chain rearrangement by polymerase chain reaction using surgically obtained, paraffin-embedded samples to diagnose primary palate mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: A case study. Int J Surg Case Rep, 10, 129-133, 2015. 査読あり

(4) 山口 聡, 阿部 成宏, 濱田 啓一, 原田 清: ヒト根未完成歯根尖部歯髓組織由来細胞の性質—再生医療への応用を目指して—。口腔組織培養学会誌、22,15-26,2013。査読あり

〔学会発表〕(計7件)

(1) **阿部 成宏**、山口 聰、佐藤 豊、原田 清：ヒト口腔粘膜由来の sphere 形成細胞は、神経堤由来細胞を多く含む。第15回日本再生医療学会総会、2016年3月16-18日、大阪国際会議場・大阪

(2) 吉田 千紘、山口 聰、**阿部 成宏**、原田 清：下顎骨片より採取したヒト骨髄間質細胞の性質。第60回日本口腔外科学会総会、2015年10月16-18日、名古屋国際会議場・名古屋

(3) **阿部 成宏**、横溝 尚子、吉増 秀實、小林 裕：開口障害を伴わない咬筋外傷性化骨性筋炎の1例。第60回日本口腔外科学会総会、2015年10月16-18日、名古屋国際会議場・名古屋

(4) 吉田 千紘、山口 聰、**阿部 成宏**、原田 清：下顎骨片より採取したヒト骨髄間質細胞の性質。第51回日本口腔組織培養学会、2014年11月15日、九州歯科大学講堂・福岡

(5) **阿部 成宏**、横溝 尚子、小林 裕、石川 文隆：上顎前歯部歯肉に発生した疣贅型黄色腫の1例と本邦における文献的考察。第59回日本口腔外科学会総会、2014年10月17-19日、幕張メッセ・千葉

(6) 吉田 千紘、佐藤 豊、**阿部 成宏**、山口 聰、三島木 節、香月 佑子、山田 峻之、村嶋 真由子、吉増 秀實、原田 清：当科における唇顎口蓋裂患者に対する外科的矯正治療。第24回日本顎変形症学会・学術大会、2014年6月10-11日、アクロス福岡・福岡

(7) **阿部 成宏**、山口 聰、佐藤 豊、原田 清：Neurosphere法を用いたヒト口腔粘膜間葉組織由来幹細胞様細胞集団の単離と性状解析。第58回日本口腔外科学会総会、2013年10月11-13日、福岡国際会議場・福岡

〔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

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

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：