

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25862061

研究課題名(和文) 歯髄由来Muse細胞を用いた新規組織工学的歯周組織再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of new periodontal regeneration therapy with Muse cells from dental pulp

研究代表者

長野 孝俊(NAGANO, Takatoshi)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：10386914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト歯髄組織から多分化能を有するMuse(Multilineage-differentiating stress enduring)細胞を分離・培養する方法を確立するために研究を行った。

Muse細胞に関するプロトコールに準じて染色後、セルソータにてソーティングを行い、クラスター形成された細胞のみをピックアップして培養し、自己複製能を確認した。また、三胚葉分化能についてRT-PCRで確認した。以上のことから、ヒト歯髄からMuse細胞を分離できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this research, we tried to establish the method of isolate and culture Muse (Multilineage-differentiating stress enduring) cells from human dental pulp tissue.

Three strains of cultured human dental pulp cells were used. The methods of cell culture, cell sorting, and cluster formation, according to the protocol. In addition, pluripotency were confirmed by RT-PCR. It became clear that can be separated the Muse cells from the human dental pulp cells.

研究分野：歯周病学

キーワード：Muse細胞 歯髄 歯周組織再生 自己複製能 三胚葉分化能 SSEA-3 CD105

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯肉辺縁に付着したプラーク（複数の歯周病原性細菌）に起因する感染症であり、疾患の進行に伴い周囲に炎症が生じ、慢性的な経過を辿りながら歯周組織が破壊される。歯周組織は、硬組織である歯槽骨とセメント質および軟組織である歯肉と歯根膜から構成されているが、現在、臨床応用されている歯周組織再生療法では、これら両方の組織を機能的かつ生理的に完全に再生させるような成果は実現されていない。

一方、歯髓組織に存在する歯髓細胞は間葉系細胞に属し、歯髓幹細胞の存在について特記されたのは、2000年のNIHのDr. Shi. Sら(PNAS 97:13625-13630)のグループが最初であり、分裂の早い細胞は幹細胞としての特性が認められるという報告であった。これまでの研究の傾向としては、歯髓組織には幹細胞が一部存在し、それは間葉系幹細胞としての特性を有するという観点がほとんどである。

歯髓細胞は新たな細胞供給源の一つとして、すでに産学官連携事業として民間歯髓細胞バンクが開設され、細胞の凍結保管事業が行われている。脱落歯（乳歯）さらには矯正学見地から便宜抜歯された永久歯など、いわゆる“医療廃棄物”より歯髓細胞は得る事が可能であるため、細胞採取に際して新たに身体への侵襲を加える必要がないことが特長である。さらに歯髓組織は、“歯”という硬組織に囲まれて保護されているため、紫外線や放射線の影響から遮断されており、内部の酸素濃度も低く、遺伝子に障害を与える物質が生じにくい解剖学的構造からなる。そのため、核型異常や癌化を引き起こす可能性が低いと考えられて

いる。東北大学大学院医学系研究科細胞組織学分野の出澤真理教授のグループは、間葉系組織に多能性幹細胞が存在することを見出し、SSEA-3とCD105の二重陽性細胞であるMuse細胞を同定した。

そこで、その技術を活かして歯髓細胞中からMuse細胞を単離して、安定して培養する方法を確立し、工程を標準化することが実現されれば、現状のiPS細胞を使用した細胞治療研究と比較して、より安全で有効性のある組織再生療法の開発・発展につながるかと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

Muse細胞は、(1)多能性幹細胞マーカーが発現する。(2)自己複製能がある。(3)三胚葉性分化能がある。(4)移植後の造腫瘍性が無い。といった特徴を有し、歯髓細胞からも“歯髓幹細胞”として単離が可能であることが、我々の予備的検討から判明している。歯髓細胞中のMuse細胞の培養方法を確立し、Y. Kuroda (PNAS, 2010, 107: 8639-8643)、S. Wakao (PNAS, 2011, 108: 9875-9880)らの方法に従って、細胞生物学的かつ分子生物学的にその特性解析を行うことで、歯周組織再生療法への臨床展開を図ることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

<平成25年度>

本研究は、鶴見大学歯学部倫理審査委員会の承認（受付番号1113号）のもとに行った。歯髓細胞は脱落歯（乳歯）さらには矯正学的見地から便宜抜歯された“歯”よりコラゲナーゼとディスパーゼによる酵素処理を行うことで得る。この歯髓細胞から（前述したY. Kuroda、S. Wakaoによる

文献)らの方法に準じて、SSEA-3 と CD105 の二重陽性細胞をセルソーターにてソーティングし、7 ~ 10 日後にクラスターを形成する Muse 細胞を最大限に分離して、適正に培養できる培養条件を検討した。

<平成 26 年度以降>

多能性幹細胞は三胚葉性の細胞への分化能と自己複製能の二つの特性を有すると定義づけられているため、歯髄細胞由来 Muse 細胞から形成された一つの cluster がゼラチン培養上で三胚葉性細胞へ分化するか、そして自己複製能を有するかどうかを検証した。また、磁気ビーズを用いた方法で、Muse 細胞の分離が可能かも併せて検討した。

4. 研究成果

本研究では、ヒト歯髄組織から Muse 細胞を分離・培養する方法を確立するために研究を行い、以下の成果を得た。

ヒト歯髄組織三検体について、Muse 細胞に関するプロトコールに準じて CD105 と SSEA-3 の抗体を用いて二重染色後、セルソーターにてソーティングを行い、96 ウェルプレートにシングル細胞となるよう播種した。CD105 および SSEA-3 ダブルポジティブの細胞の陽性率は $1.7 \pm 0.22\%$ であり、5~10 日後のクラスター形成率は $23.0 \pm 1.93\%$ (図 1) であった。

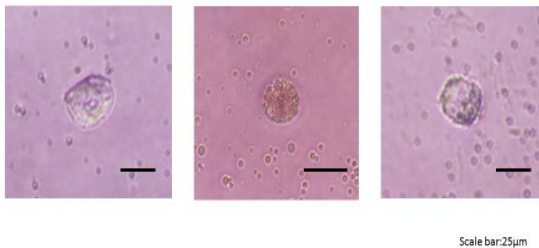


図 1 . ソーティングで得た歯髄細胞の 3 検体について、Poly-HEMA コーティングの 96well プレートにてシングル

細胞培養し、5 ~ 10 日後のクラスター形成を観察した。

その後、クラスター形成された細胞のみをピックアップして、ゼラチンコーティングしてあるプレート上で培養し、増殖した細胞を再度 Poly-HEMA コーティングの 96well プレートにてシングル細胞となるよう播種して培養を継続し、自己複製能を確認した (図 2)。

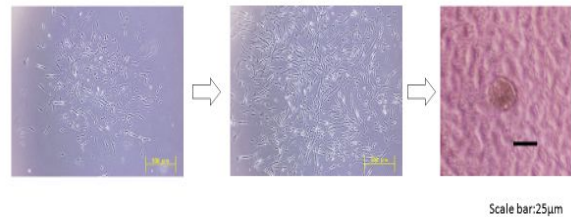


図 2 . ゼラチンコート上で付着増殖していた細胞を回収し、再度 poly-HEMA コーティング上のプレートでシングル細胞での培養を行い、同様にクラスターの形成能を確認することで、自己複製能を確認した。

また、三胚葉分化能については、RT-PCR 法で確認した。今回はコントロールとして、ACTB と hGAPDH を使用し、内胚葉マーカーとして AFP (肝細胞) と原始内胚葉マーカーである GATA6 を、中胚葉マーカーとして Nkx2.5 (早期心筋分化のマーカー) と Brachyury (中胚葉系の組織に分化する際に必須にマーカー) を、外胚葉マーカーとして Map-2 (神経分化マーカー) を選択した。

その結果、Nkx2.5 のバンドは確認することは出来なかったが、その他のバンドで三胚葉性の遺伝子を確認することが出来た (図 3)。

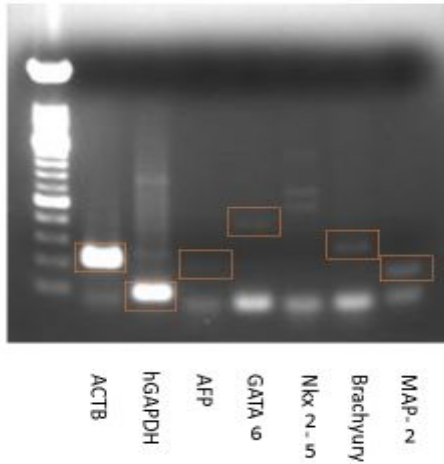


図3：付着増殖した細胞から RNA を抽出し、得られた RNA から PCR テンプレートを作製後に RT-PCR を行った際の電気泳動像

以上のことから、ヒト歯髄から Muse 細胞を分離できることが明らかとなった。しかしながら、今後もより効率的な分離培養方法を確立させるため、継続した研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕

金指幹元、出澤真理、若尾昌平、船津太一郎、松島友二、長野孝俊、日下輝雄、五味一博

「種々のヒト間葉系組織から得られる Muse 細胞の発現」

2014.10.30~31：第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会（山形）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 孝俊 (NAGANO, Takatoshi)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：10386914