

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463109

研究課題名(和文) 歯髄処置にて廃棄される神経幹細胞からの神経再生の試み

研究課題名(英文) The isolation of stem cells from the human exfoliated deciduous teeth by genetic engineering

研究代表者

澤味 規 (SAWAMI, Tadashi)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：90710442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経は再生しないと考えられていたが、最近の再生医療研究の発展により、神経幹細胞から神経が再生することが徐々に判ってきた。廃棄歯髄から幹細胞を遺伝子工学的に濃縮する方法を確立し、当該細胞が歯再生への有効な資材となり得ることを証明することを目的とした。

Piggy Bac系を用いた乳歯歯髄細胞およびiPS細胞への遺伝子導入により、遺伝子導入安定株は効率的に取得できることが明らかとなった。また、乳歯歯髄細胞から歯髄幹細胞を遺伝子工学的に単離し、その幹細胞特性について検討したところ、神経幹細胞特異的マーカーの遺伝子発現を認めた。in vitroにて分化誘導を行ったところ、神経細胞様の細胞を認めた。

研究成果の概要(英文)： It was considered that to regenerate nerve cells is difficult, but the regeneration of nerve cells from neural stem cells gradually have been showed by the development of a recent study about regenerative medicine. Our aims in this study were to establish the way to isolate stem cells from the human exfoliated deciduous teeth by genetic engineering, and to prove the isolated stem cell effective as of material to tooth regeneration.

We showed that piggy Bac genetic electroporation using Neon was effective to the pulp cell of deciduous teeth and iPS cell. We also isolated dental stem cells from the human exfoliated deciduous teeth by genetic engineering, and showed a neural stem cell marker from the isolated stem cells. The nerve cell was admitted by in vitro differentiation derived from them.

研究分野：歯学

キーワード：再生歯学 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

乳歯のう蝕の特徴として、エナメル質より象牙質内での進行が早いこと、歯質が薄いために歯髄までう蝕が到達し易いことから、スポット状に露髄した場合、直接覆髄は推奨されず、生活歯髄切断法(生切法)もしくは抜髄処置の必要がある。歯髄に勝る根管充填材はないことから、歯根部歯髄を残すことが可能な生切法が小児歯科臨床では多用されてきた。しかし、生切法は、成功率がそれほど高くなく、また、予後の問題および使用する薬剤の安全性の問題もあり、生切法に代わる代替法の開発は、小児歯科臨床において重要な課題と言える。また、歯髄処置になった場合、感染した歯髄は、医療廃棄物として破棄されるのが現状である。

これまでの再生医療における歯髄に関する報告は下記のごとくである。

i) 骨髄に見られる多能性幹細胞である間葉系幹細胞(MSCs)に類似し、線維芽細胞様の形態を示し、増殖性はMSCsと比肩するほど高く、脂肪細胞や骨細胞への分化多能性を有する。

ii) 歯髄細胞(dental pulp cells : DPCs)はHoechst 33342などの蛍光色素による染色に対し、抵抗性を示す(side populationとしての性質)。

iii) 歯構成細胞の分化を促すリン酸Caで構成される3次元的な単体(scaffold)に細胞を埋め込み、これを免疫不全マウスの皮下に移植すると、象牙芽細胞などの歯構成細胞が生じ、象牙質形成が起こる。

iv) 乳歯歯髄細胞では、いくつかの幹細胞特異的遺伝子の発現があり、増殖性が高い細胞は、アルカリ性フォスファターゼ(ALP)活性も高く、iPS細胞の樹立効率が高い。

う蝕が重度に進行し歯髄に達すると、歯髄炎を惹起し、歯髄処置が行われる。神経は再生しないと考えられていたが、最近の再生医療研究の発展により、神経幹細胞から神経が再生することが徐々に判ってきた。う蝕に罹患した乳歯歯髄を対象として、今までは廃棄されてきた歯髄内の神経細胞から神経幹細胞が得られれば、in vitroで増やし、神経細胞への分化誘導をはかり、自家移植することで機能的な根管充填材として使用するテーラメイド医療が可能となる。

この結果から、我々はALP活性が高いDPCsは、歯髄幹細胞(dental pulp stem cells, DPSCs)であると考え、そのポテンシャルを現在解析している。

臨床経験上、乳臼歯部の抜髄処置(根尖性歯周炎へ移行している場合は除く)を行っている時に、3もしくは4根管ですべての根管が感染していることはなく、数根管は感染がある程度進んでいるものの比較的新鮮な歯髄としてクレンザーにて除去することが可能である。最も理想的な歯の再建は、患者から得た歯髄から神経幹細胞を取得し、これをDPSCsと共に髄腔内へ移植することである。

2. 研究の目的

廃棄歯髄から神経幹細胞や歯髄幹細胞を遺伝子工学的に濃縮する方法を確立し、特性解析、in vitroでの機能性検定を通じ、当該細胞が歯再生への有効な資材となり得ることを証明することを目的とした。

3. 研究の方法

小児期の乳歯から得た神経に存在すると考えられる神経幹細胞の幹細胞としての特性を主にin vitroでの視点から解明した。即ち、ヒト乳歯歯髄由来の初代培養細胞への遺伝子導入が可能かどうかを検討した。神経幹細胞の存在の可能性について神経幹細胞マーカー遺伝子発現を指標に分子生物学的に検索した。培養神経幹細胞がin vitroで成熟した神経細胞へ分化できるかどうか、その分化ポテンシャルを検討した。

4. 研究成果

ヒト乳歯歯髄由来の初代培養細胞への遺伝子導入、それによる遺伝子の解析はあまり行われていない。これまで、当該細胞への効率的遺伝子導入系が検討されていなかったことが背景にあると思われる。PiggyBac(PB)トランスポゾンによる遺伝子導入法(図1)は、哺乳類細胞でも効率よく外来性の遺伝子導入を達成でき、当該遺伝子が宿主ゲノムに挿入された遺伝子導入安定株を通常の系よりも効率よく導入できる。今回、この方法を乳歯歯髄細胞に適用した。

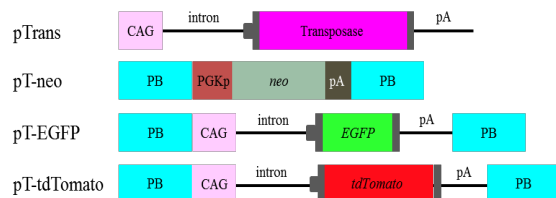


図1. PiggyBac トランスポゾンによる遺伝子導入法

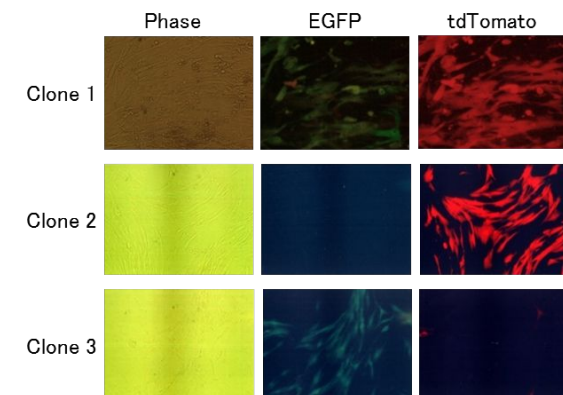


図2. 3か月培養後の蛍光発現

電気穿孔法(Invitrogen, Neon system)にて上記PiggyBac トランスポゾン系プラスミ

ドを遺伝子導入し、G418 (neomycin アナログ) で薬剤選抜した。3ヶ月の長期培養後のマーカー遺伝子の発現を図2示す。

また、廃棄乳歯歯髄を神経細胞培養培地で培養した。増殖した細胞が神経幹細胞の特性を示すかを神経幹細胞マーカー抗体で検索した。廃棄歯髄の初代培養細胞を神経細胞分化誘導培地にて培養し、神経突起が出るかを観察し神経細胞の同定はRT-PCRと免疫染色で行った。

次に遺伝子工学的的手法による歯髄幹細胞の単離を行った。哺乳類細胞への遺伝子導入の効率が非常に高いとされるトランスポゾン的一种 PiggyBac 系で遺伝子導入した。プラスミドだけの導入では安定株が得られなかったものが、Piggy Bac 系では確実に取得することが出来た。Piggy Bac 系を用いた乳歯歯髄細胞への遺伝子導入により、遺伝子導入安定株は効率的に取得できることが明らかとなった。また、乳歯歯髄細胞から歯髄幹細胞を遺伝子工学的に単離し、その幹細胞特性について検討したところ、神経幹細胞特異的マーカーの遺伝子発現を認めた。in vitroにて分化誘導を行ったところ、神経細胞様の細胞を認めた(図3)。

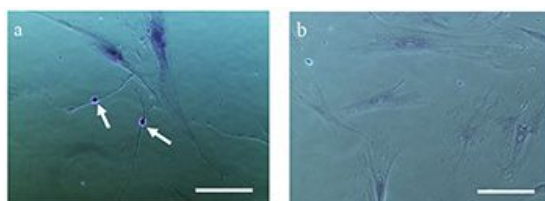


図3 . In vitro 神経細胞への分化誘導(ニッスル染色:左図矢印)

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 3 件)

Inada E, Saitoh I, Kubota N, Murakami T, Soda M, Sawami T, Yamasaki Y, Sato M, Alkaline phosphatase and OCT-3/4 as useful markers for predicting susceptibility of human deciduous teeth-derived dental pulp cells to reprogramming factor-induced iPSC cells, J Invest Clin Dent, 査読有、2016、
DOI: 10.1111/jicd.12236

Saitoh I, Inada E, Iwase Y, Noguchi H, Murakami T, Soda M, Kubota N, Hasegawa H, Akasaka E, Matsumoto Y, Oka K, Yamasaki Y, Hayasaki H, Sato M, Choice of feeders is important when first establishing iPSCs derived from primarily cultured human deciduous tooth dental pulp cells, Cell Medicine,

査読有、2015、Dec 17; 8(1-2): 9-23、
DOI: 10.3727/215517915X689038

Inada E, Saitoh I, Miura H, Ohtsuka M, Murakami T, Sawami T, Yamasaki Y, Watanabe S, Aoki R, Sato M, PiggyBac transposon-mediated gene delivery efficiently generates stable transfectants derived from cultured primary human deciduous tooth dental pulp cells (HDDPCs) and HDDPC-derived iPSC cells, Int J Oral Sci, 査読有、2015、7(3): 144-154
DOI: 10.1038/ijos.2015.18.

[学会発表](計 5 件)

Murakami T, Saitoh I, Sato M, Inada E, Soda M, Iwase Y, Sawami T, Suzuki A, Ohshima H, HAYASAKI H, The genetic engineering-based isolation of lymphoid enhancer-binding factor-1 (LEF1) positive stem-like cells from human deciduous tooth cell-derived iPSCs, 45rd Annual Meeting & Exhibition of the AADR, Los Angeles (USA)、2016年3月16-19日

Soda M, Saitoh I, Inada E, Murakami T, Suzuki A, Sawami T, Kagoshima A, Iwase Y, Terao Y, Ohshima H, Hayasaki H, Sato M, ALP as a reliable marker for predicting early reprogramming, 45rd Annual Meeting & Exhibition of the AADR, Los Angeles (USA)、2016年3月16-19日

村上智哉、齊藤一誠、左右田美樹、澤味規、鹿兒島暁子、寺尾豊、大島勇人、早崎治明、Lymphoid enhancer factor-1 promoter を用いた乳歯歯髄幹細胞様細胞の単離. 平成 27 年度新潟歯学会第 2 回例会、新潟大学歯学部講堂(新潟県新潟市) 2015 年 11 月 7 日、新潟歯会誌 45(2)、67 頁

稲田絵美、佐藤正宏、齊藤一誠、窪田直子、澤味規、村上智哉、左右田美樹、早崎治明、山崎要一、ヒト乳歯歯髄細胞のアルカリホスファターゼ活性と OCT-3/4 発現は iPSC 細胞樹立の可否を予測する有効なマーカーである、第 53 回日本小児歯科学会大会、広島国際会議場(広島県広島市) 2015 年 5 月 21-22 日、小児歯科学雑誌 53(2)、217 頁

稲田絵美、齊藤一誠、窪田直子、松本裕子、村上智哉、澤味規、山崎要一、piggyBac トランスポゾンによるヒト乳歯歯髄細胞からの遺伝子導入安定株の

効率的取得、第 52 回日本小児歯科学会
大会、品川区立総合区民会館(東京都品
川区)、2014 年 5 月 16-17 日、小児歯科
学雑誌 52(2)、364 頁

〔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

澤味 規 (SAWAMI, Tadashi)
新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教
研究者番号：90710442

(2) 研究分担者

佐藤 正宏 (SATO, Masahiro)
鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発
研究センター・教授
研究者番号：30287099

齊藤 一誠 (SAITOH, Issei)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：90404540

野口 洋文 (NOGUCHI, Hirofumi)
琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：50378733

稲田 絵美 (INADA, Emi)
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教
研究者番号：30448568