

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861791

研究課題名(和文)脱落乳歯歯髄幹細胞による神経再生に関する研究

研究課題名(英文) Toward the cell therapy for central nerve system disease with stem cells from human exfoliated deciduous teeth

研究代表者

北村 尚正 (KITAMURA, Takamasa)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：50614020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：主たる研究に付随し次のような研究結果を得た。
含歯性嚢胞による骨吸収の分子メカニズムは明らかにされておらず、嚢胞内圧上昇による周囲組織への圧迫により骨吸収が生じると考えられている。細胞外圧力が嚢胞を構成する細胞にどのような影響を与えるのか歯原性嚢胞を想定した圧迫培養法を用いて検討した。Real time RT-PCR法を用いて、骨吸収に関連する分子群の解析を行ったところ、持続的な低圧に対して間葉組織から骨吸収サイトカインが放出され、骨芽細胞においては、むしろ骨形成に関連する遺伝子の上昇が認められた。これらの結果から、嚢胞による緩徐な骨吸収には間葉系組織が中心的な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：I got the following research result with a main study.
Molecular mechanism of bone resorption by a dentigerous cyst is unknown, but it has been suspected that it makes bone resorption to press to the surrounding organization by the increased pressure in the cyst. It was considered using the press cultivation which assumed odontogenic cysts what kind of influence the cell external pressure power had on the cell of which a dentigerous cyst is composed. Since when molecular group related to a bone desorption was analyzed using modal Real time RT-PCR, cytokines related to a bone resorption were released from a mesenchymal tissue to continuous low pressure, and putting it in the osteoblast, in fact, the mount of mRNA expression that related to a bone formation increased. From the above, it was suggested that for the gentle and quiet bone resorption due to the cyst, a mesenchymal tissue plays a central role in a bone resorption.

研究分野：小児歯科

キーワード：圧迫培養 含歯性嚢胞 歯原性上皮細胞 歯肉線維芽細胞 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、複数の異なる細胞に分化できる幹細胞が発見され、これらの細胞の性質を治療に応用した再生医療が発展した。生体のあらゆる細胞に分化が可能な ES 細胞 (embryonic stem cell) や iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) はその中心的な存在として期待されている。一方、これらの細胞以外にも体性幹細胞と呼ばれる幹細胞があり、その代表として間葉系幹細胞である骨髄幹細胞が挙げられ、これを用いた骨や心筋の再生の臨床応用が進んでいる。また、歯の内腔にある歯髄から、骨髄中の間葉系幹細胞と同等な分化能を持つ幹細胞が発見された。これは歯髄幹細胞 (dental pulp stem cell) と呼ばれ、高い増殖能があり、容易に採取できることから新たな幹細胞源として注目を集めている。このなかでも、脱落乳歯の歯髄中に存在する歯髄幹細胞 (stem cells from human exfoliated deciduous teeth、以下 SHED) は、より高い分化能と増殖能を有していることが明らかになってきた。最近まで、これら体性幹細胞は分化に制限があると考えられてきた。しかし、高い分化能を有する間葉系幹細胞の一部は胚葉間を越えた分化を行うことが報告された。SHED は中胚葉系に属する間葉系幹細胞であるが、外胚葉系である中枢神経細胞などに、胚葉を超えて分化することが報告されている。

中枢神経系における再生医療は現在、最も注目を集めている分野の一つである。中枢神経は出生前にほぼすべての神経細胞 (ニューロン) が分裂を終了し、一度損傷を受けるとその再生は困難であると思われていた。そのため脊髄損傷、アルツハイマー病およびパーキンソン病に代表される中枢神経系の疾患の根本的治療は不可能と考えられてきた。近年、海馬歯状回や側脳室周辺には神経幹細胞が多数存在し、ニューロンやグリア細胞など複数の脳細胞に生涯にわたって増殖および

分化を続けていることが判明し、この細胞を培養して移植することで、難病とされてきた神経疾患の治療に光明が当たることになった。しかし、神経幹細胞は移植後、脳内環境の影響を受け、多くの場合ニューロンの活動をサポートするアストロサイトに分化することが多く、目的のタイプのニューロンに分化させることは難しいため、幹細胞が維持されニューロンに分化しうる Niche の特徴を研究することが重要な課題となっている。

本研究は SHED の高い分化能に着目し、この細胞を中枢神経系に移植し、その動態を調べることで、再生医療へ貢献できるか調べるために計画された。

この主たる研究に付随して、細胞周囲の環境が細胞自体の分化能、増殖能、形態にどのような影響を与えるかを調べた。含歯性嚢胞は胎生期の歯原性上皮遺残を由来とする発育性嚢胞のうち、埋伏歯の歯冠を含んで形成される嚢胞である。含歯性嚢胞のような発育性嚢胞による骨吸収の分子メカニズムは明らかにされておらず、嚢胞内圧上昇による周囲組織への圧迫により骨吸収が生じると考えられている。付随して行われた本研究では、細胞外圧力が嚢胞を構成する細胞にどのような影響を及ぼすか、圧迫培養法を用いて検討した。

2. 研究の目的

含歯性嚢胞は、嚢胞内側に歯原性上皮由来の非角化扁平上皮の層と、嚢胞壁である間葉系結合組織とで構成されている。嚢胞内圧の上昇による圧迫による顎骨の吸収が生じると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。そこで、細胞外圧力が嚢胞を構成する細胞にどのような影響を及ぼすか解析を試みた。

3. 研究の方法

含歯性嚢胞の病理切片において、抗 RANKL 抗体を用いて免疫組織学的検討を行なった。免疫染色には、DAB 染色(チラミドシグナル増幅法併用)に、対比染色として HE 染色を行なった。また、免疫蛍光法でも染色を行なった。

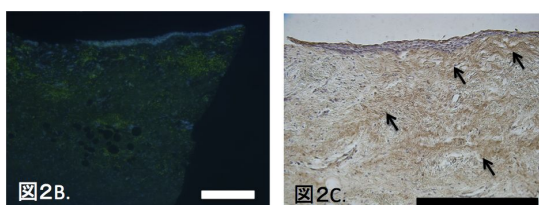
歯原性上皮として HAT7(ラット歯原性上皮細胞株)、間葉系結合組織として HGF(ヒト骨肉線維芽細胞株)、骨芽細胞および骨組織として SaOs-2(ヒト骨肉腫由来細胞株)を使用した。

培養条件は D-MEM+10%ウシ胎児血清を培地とし、0.01MPa(約 80mmHg)の炭酸ガス圧迫条件下にて、37℃の恒温槽内で培養した群(圧迫群)と、未圧迫で 37℃の恒温槽内で培養した群(対照群)の 2 群間で、骨形成および骨吸収に関連する遺伝子の mRNA の変化を Real time RT-PCR 法を用いて解析した。解析手法には Student's t-test を用いた。

本実験では圧迫培養を行なった期間で、3 時間と 6 時間の 2 系統を行い分析した。

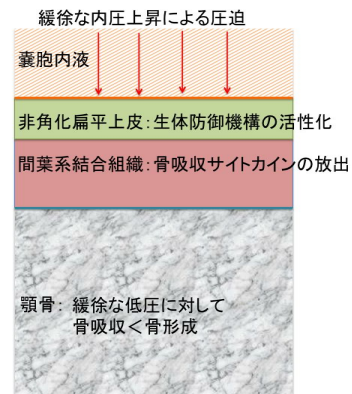
4. 研究成果

含歯性嚢胞の嚢胞内圧は約 0.01MPa であったという報告から、含歯性嚢胞を構成する細胞種に対して密閉空間にて同圧をかけて培養することで、歯原性嚢胞を想定した圧迫培養を行った。病理組織を用いた免疫組織学的検討においては、RANKL 陽性細胞は間葉系結合組織、とくに隣接する組織との境界付近に多く発現していた(下図)。



(緑: RANKL、青: DAPI、矢印: RANKL 陽性細胞、Bar: 300 μm)

また、3 および 6 時間の圧迫培養を行った各細胞について骨吸収に関連する分子群の解析を行ったところ、持続的な低圧に対して間葉組織から骨吸収サイトカインが放出された。6 時間圧迫を受けた骨芽細胞においては、むしろ骨形成に関連する遺伝子の上昇が認められた。これら結果から、嚢胞による緩徐な骨吸収には間葉系組織が中心的な役割を担っていることが示唆された(図)。



(図 嚢胞による顎骨吸収機構)

細胞は組織構築において、隣合う細胞を含めた細胞環境によってその細胞動態、細胞運命が決定される。これは病態においても同様であり、組織破綻の機構にも共通される現象である。今後さらなる詳細な分子メカニズムを解析し、これらを応用した新規治療法の開発、再生医療への応用を目指していきたい。

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 1 件)

Yuki Akazawa, Tomokazu Hasegawa, Yoshimura Yoshitaka, Chosa Naoyuki, Asakawa Takeyoshi, Kimiko Ueda Yamaguchi, Sugimoto Asuna, Takamasa Kitamura, Hiroshi Nakagawa, Ishisaki Akira and Tsutomu Iwamoto, Recruitment of mesenchymal stem cells by stromal

cell-driven 1 in pulp cells from deciduous teeth.、International Journal of Molecular Medicine,査読有、36、2015、442-448

〔学会発表〕(計 3 件)

北村尚正、2 根管性上顎乳中切歯の存在により後継永久歯の萌出遅延がみられた 1 例、第 3 4 回小児歯科学会中四国地方会、2015.10.4、高知城ホール(高知県高知市)

北村尚正、含歯性嚢胞の間葉系結合組織層が骨吸収に与える影響、第 5 6 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014.9.27、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

北村尚正、鼻腔底に近接した上顎正中埋伏過剰歯由来の含歯性嚢胞の 1 例、第 5 2 回小児歯科学会大会、2014.5.16、きゅりあん(東京都品川区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 尚正 (KITAMURA, Takamasa)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：50614020

(4) 研究協力者

杉本 明日菜 (SUGIMOTO, Asuna)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・大学院
生