

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791954

研究課題名（和文）骨分化能に優れた根尖部歯髄組織由来間葉系幹細胞の単離およびその解析
 研究課題名（英文）Functional analysis of the bone differentiation from isolated mesenchymal stem cell from the apical pulp of human teeth

研究代表者

山縣 憲司（YAMAGATA KENJI）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：00420084

研究成果の概要（和文）：歯の形成期の違いによる歯髄間葉系幹細胞（MSCs）の機能解析および高い骨分化機能を有する MSCs の単離および同定を目的に本研究を行った。その結果、*in vitro* の環境下では歯根完成期において他時期由来の MSCs と比較して高い骨分化能を有していることが分かった。また、骨形成能において MSCs の特性を分けるマーカーと報告されている CD349 の発現を指標として単離した CD349(+)MSCs は、*in vivo* 解析により骨分化能に優れている細胞であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to analyze the function of the bone differentiation for isolated mesenchymal stem cells (MSCs) from the apical pulp of human teeth. Function of bone differentiation was higher in the stage of completed root formation than other stages *in vitro*. The CD349 (+) MSCs which were isolated from CD349 marker expressing the function of bone formation were excellent for bone differentiation *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：歯科口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：骨分化能、間葉系幹細胞（MSCs）、骨折モデルマウス、智歯歯髄、CD349

1. 研究開始当初の背景

顎口腔外科領域ではインプラント治療・顎骨再建などで、骨が欠損している部位に骨移植を行うことがある。その際に自家骨や人工骨などを使用するが、自家骨においては、口腔内より採取可能な顎骨からでは採取量に限界があり、採取部位に侵襲および神経症

状を惹起する危険性もある。口腔外では、腸骨や脛骨から骨を採取し治療に用いられているが、口腔外他部位へ侵襲がおよび患者への負担がかかることが問題点として挙げられる。一方、人工骨では生体適合性や骨への置換性等に問題点があり、加えて人工骨が吸収されてしまう危険性および易感染性等、多くの欠点を有している。以上のことから、患

者の利便性を高めるためにも新しい骨再生法の導入が早急な課題である。

近年、歯髄から MSCs が単離されることが報告されたが、その機能については未だ十分な解析が行われていない。

2. 研究の目的

骨分化能の高い智歯歯髄由来 MSCs を単離・同定し、骨再生を促進することを最終目標に研究を行う。根未完成歯の歯髄は多分化能を有しているが、若年者にしか存在せず治療に使用できる対象は限られている。臨床応用を行う上では、成人の歯根完成歯を使用する必要がある、本研究では、成人の智歯に着目し、歯根完成歯の根尖部歯髄組織から CD349 を指標として増殖能および分化能の高い MSCs を単離し、その機能解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 智歯サンプルの入手および歯髄組織からの細胞培養、分離

筑波大学付属病院歯科口腔外科で、抜歯が必要とされた智歯を使用する。歯根の完成期に関してはパノラマ X 線写真により、歯冠完成期、歯根形成期、歯根完成期に分類する。智歯より根尖組織をピンセットで分離し、コラゲナーゼ処理を行い、細胞を分離する。37°C、5% CO₂ 条件下で培養を行う。培地は IMEM + 10% FBS に L-glutamine (20 µg / mL) と basic-FGF (10 ng / mL) を添加したものを用いる。

(2) 細胞増殖能の検討

細胞を 5x10⁴/dish の割合で 35mm dish に plating し、毎日 3 枚ずつトリプシンを用いて細胞を剥がし、トリパンブルー染色にて細胞数をカウントする。

(3) 骨分化能の検討 (*in vitro* 分化法)

細胞を 4 well plate に plating し、コンフルエントになった時点で IMDM + 1% FBS に 0.1mM デキサメサゾン、10 mM b-glycerol-2-phosphate、0.2mM アスコルビン酸、50 ng/mL ヒト EGF を添加した分化培地に変えて 28 日間培養する。Alizarin Red S 染色にてカルシウムの沈着を検出し、Alizarin Red S の吸光度を測定し定量化する。

(4) 骨分化能の検討 (マウス骨折モデル)

2mm 角のゼルフォームに目的の MSCs を播種し、37°C で 2 時間静置する。C57/BL6 マウス的大腿骨を中央部で切断し 2 mm の隙

間を作成したところに、細胞を含むゼルフォームを挟み、27 ゲージ針で髄内固定し閉創する。28 日後に X 線撮影を行い骨の修復を解析するとともに、大腿骨を Plank-Rychlo 液で処理し HE 染色を行う。マウスは術前 2 日から実験終了までサイクロスポリンにて免疫抑制を行い、移植した MSC のマウス内における拒絶を防ぐ。

(5) 細胞増殖能・骨分化能に優れた MSCs の遺伝子発現解析

CD349 は Wnt シグナルの受容体の 1 つ Frizzled-9 として知られている。CD349 は骨形成能、虚血改善能において MSCs の特性を分けるマーカーと報告されている。歯冠完成期および歯根完成期 MSCs を CD349 発現の違いにより分離し、解析を行った。

細胞増殖能・骨分化能の異なる細胞より RNA を抽出する。RNA を精製し cDNA に逆転写する。それぞれのサンプルを異なる蛍光色素で標識し、マイクロアレイ法を用いて遺伝子発現解析を行う。すなわち増殖能・骨分化能に優れた MSCs 群と増殖能・骨分化能が劣る MSCs 群との間で遺伝子発現を比較検討する。

4. 研究成果

(1) 形成段階の違いによる歯髄由来 MSCs の骨分化能比較

in vitro では、歯根形成期および歯根完成期 MSCs は歯冠完成期 MSCs と比較し有意に高い骨分化能を示した。骨折モデルマウスを用いた骨形成の解析では、PBS と比較し MSCs で有意に骨形成能が高いが、歯の形成期による違いは認めなかった (図 1、2)。

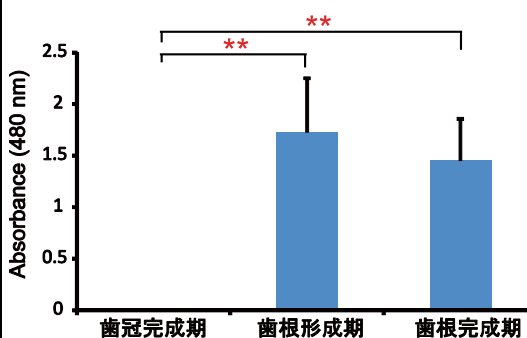


図 1. 形成段階の違いによる歯髄由来 MSCs の骨分化能比較

MSCs の骨分化能を比較するため、吸光度による定量化を行った。歯根形成期および歯根完成期 MSCs は歯冠完成期 MSCs と比較して、有意に骨分化した。Alizarin Red S 染色; 480 nm, **: p<0.01, n=3, (mean ± SD)

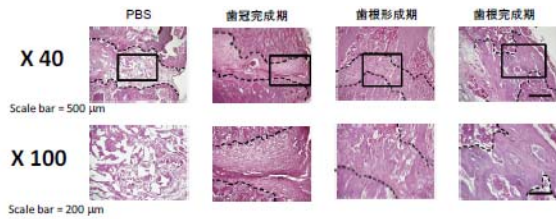


図2. 大腿骨骨折モデルマウスを用いて解析

PBS 群では線維芽様細胞が観察された。歯冠完成期 MSCs 群は骨折部位に軟骨細胞が多く観察された。歯根形成期 MSCs 群は骨折部位が線維骨に置き換わっていた。歯根完成期 MSCs 群は層板骨が形成されていた。

(2) CD349 を用いた機能的な MSCs の分離および解析

CD349 の発現を指標として単離した歯根完成期 CD349 陽性 MSCs は、陰性 MSCs と比較し骨分化能が高く、*in vivo* 解析において歯冠完成期 CD349 陽性 MSCs は陰性 MSCs と比べ骨形成能が高いことが明らかとなった。

組織所見では、歯冠完成期 CD349 陽性 MSCs で軟骨細胞や骨芽細胞が観察され、歯根完成期 CD349 陰性 MSCs で軟骨細胞、歯根完成期 CD349 陽性 MSCs で層板骨の形成が見られ *in vitro* の結果と一致した (図3、4)。

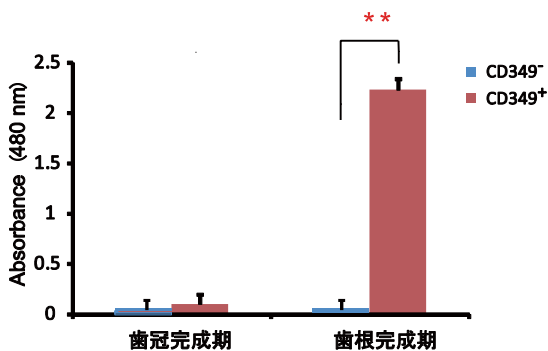


図3. CD349 発現の違いによる歯髄由来 MSCs の骨分化能比較

MSCs の骨分化能を比較するため、吸光度による定量化を行った。歯根完成期 CD349 陽性 MSCs は CD349 陰性 MSCs と比較して有意に骨分化した。

Alizarin Red S 染色; 480 nm, **: $p < 0.01$, $n = 3$, (mean \pm SD)

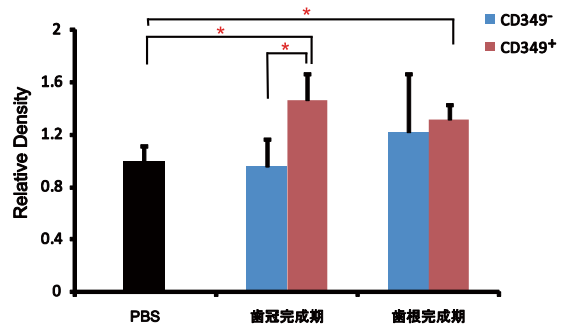


図4. CD349 発現の違いによる MSCs の *in vivo* における骨形成能の比較

接合部位の新生骨をデンスメトリーにて測定し定量化した。歯冠完成期において、CD349 陽性 MSCs は陰性 MSCs と比較して有意に骨形成能が高かった。また、PBS 群との比較では歯冠完成期、歯根完成期ともに CD349 陽性 MSCs の群で有意差が見られた。

*: $p < 0.05$, $n = 3$, (mean \pm SD)

(3) 歯の形成期ごとの遺伝子発現解析

歯の形成段階の違いにより分離した MSCs の遺伝子発現解析を行った。Oct-4 の発現は歯根完成期 MSCs が歯冠完成期および歯根形成期 MSCs と比較して有意に高かった。Sox-2 の発現も同様に歯根完成期 MSCs が歯冠完成期および歯根形成期 MSCs と比較して有意に高かった。一方、Nanog の発現は歯の発生段階の違いによる差は見られず一様に発現していた。PDGFa の発現は歯冠完成期 MSCs と歯根完成期 MSCs が歯根形成期 MSCs と比較して有意に高かった。また、PDGFb も同様に歯冠完成期 MSCs と歯根完成期 MSCs は歯根形成期 MSCs と比較して発現が有意に高かった。さらに、歯根完成期 MSCs は歯冠完成期 MSCs と比べて PDGFb の発現が高かった (図5)。

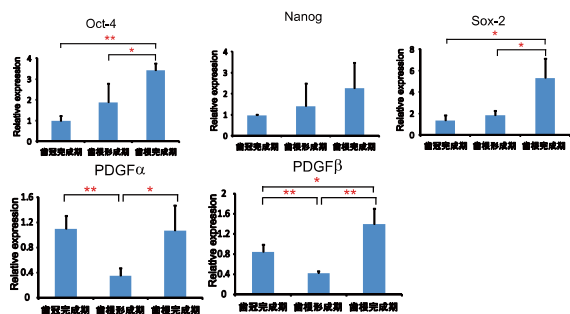


図5. 歯の形成段階の違いによる遺伝子発現解析

** : $p < 0.01$, * : $p < 0.05$, $n = 3$, (mean \pm SD)

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

①山崎加奈子, 木村健一, 山縣憲司, 長野真澄, 大根田修. 発生段階に応じたヒト歯髄由来間葉系幹細胞の機能解析. 第 10 回日本再生医療学会総会. 2011 年 3 月 1、2 日. 東京

②山縣憲司, 長野真澄, 木村健一, 菊地 豪, 佐々木裕芳, 瀬戸佳穂里, 内田文彦, 柳川 徹, 鬼澤浩司郎, 武川寛樹, 大根田 修. ヒト智歯歯髄由来間葉系幹細胞の骨分化能に対する機能解析. 2011 年 10 月 22 日. 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山縣 憲司 (YAMAGATA KENJI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 00420084