

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592980

研究課題名(和文)骨分化能の高い歯髄由来間葉系幹細胞の単離・同定と効率的な顎骨再生への応用

研究課題名(英文) The isolation and identification of the higher bone differentiation of mesenchymal stem cell from the pulp of human teeth and the application for the jaw bone regeneration.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯冠完成期の歯髄由来間葉系幹細胞(DPSC)において、骨分化マーカーRunx2の発現が、歯根形成期・歯根完成期DPSCと比較して骨分化誘導前から有意に上昇していることから、Runx2の時期特異的発現異常による骨分化能抑制が原因として考えられた。歯冠完成期由来DPSCの骨分化過程において、ALPの発現が、他時期由来DPSCと比較して有意に低いことが分かった。そこで、歯冠完成期由来DPSCにALPを遺伝子導入することで、Runx2の発現、骨分化能について解析した。その結果、ALP遺伝子導入群では、正常な骨分化誘導が見られることが分かったが、Runx2の発現抑制は見られないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the crown completion stage of the dental pulp derived mesenchymal stem cells (DPSCs), the expression of the Runx2 have been increased significantly in the DPSCs of root formation stage and root completed stage from the previous time of bone differentiation induction. This result was considered due to the Runx2 stage abnormal specific expression for potential the suppression of bone differentiation. In the bone differentiation process of crown completed stage from DPSCs, expression of ALP were significantly lower form the other timing derived DPSCs. Therefore, the expression of Runx2 was analyzed for bone differentiation potential by the gene transfer of ALP to the DPSCs of crown completion. As a result, the normal bone differentiation induction was observed in the ALP gene transfer group. But it revealed that suppressing the expression of Runx2 is not observed. In the future, we will analyze a system for regulation of expression of Runx2 in DPSC.

研究分野：再生医学による顎骨再建

キーワード：間葉系幹細胞 細胞表面マーカー 自家移植 骨分化能

1. 研究開始当初の背景

(1) 顎口腔外科領域ではインプラント治療・顎骨再建する際に、口腔内の顎骨からの採取量では限界があり、口腔外からの骨採取が必要となるケースが多い。しかし、腸骨や脛骨より骨髓を採取し、治療に用いる場合、患者への侵襲が大きいことが問題である。

代わりに人工骨を用いた場合、生体適合及び骨置換等への効率性に問題があり、加えて感染症併発等の副作用を伴う点が指摘されている。以上のことから、患者の利便性を高めるためにも侵襲の少ない効率的新しい骨再生法の導入が喫緊の課題である。

智歯は智歯周囲炎、矯正治療などのために抜歯される機会が多く、抜去歯は処分され医療廃棄物となる。歯髄は間葉系幹細胞(MSC)を含み、自家移植のソースとして大いに注目され、特に智歯は検体数も多く適した材料である。しかし、採取したMSCは単一の細胞集団とは言い難く、細胞治療を行う際により機能的なMSCの単離および同定が求められる。歯髄由来MSCは骨、軟骨、脂肪などの間葉系細胞への分化をはじめ、さまざまな分化能を有していることが報告されている。さらに高い骨分化能を有する歯髄由来MSCの単離および同定をすることにより、効率よく顎骨の再生を行える可能性が期待される。

歯髄から間葉系幹細胞(歯髄幹細胞 dental pulp stem cells: DPSC)が単離されることが報告されているが、その機能については未だ十分な解析が行われていない。

DPSCと歯根由来幹細胞を比較したところ、歯根由来MSCは増殖能に優れ、いい細胞ソースである。連携研究者である大根田らは、骨髄・脂肪組織・胎盤・臍帯血由来アルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)活性により骨分化能の高い間葉系幹細胞を単離・同定できることを報告している。

同方法を用いDPSCのALDH活性を指標として単離・培養し、それぞれの細胞増殖能・骨分化能をin vitro分化法とマウス骨折モデルで解析した。しかしDPSCはALDH活性が低く、市販のキットでは分離が難しかった。

2. 研究の目的

DPSCを異なる発生段階の智歯から単離・培養し、その機能について解析する。すなわち歯冠完成期、歯根形成期、歯根完成期の智歯の根尖組織の3群を比較し、骨形成能に優れたDPSCの分子機能解明を本事業の目的とし、解析を進める。

より骨分化能の高いDPSCを単離・同定し

in vitroおよびin vivo機能解析を行うこと、増殖能・骨分化能に優れたDPSC群と増殖能・骨分化能が劣るDPSC群との間で遺伝子発現を比較検討することにより、関連遺伝子を見出す。さらに、関連遺伝子を導入することにより効率的に骨を形成することにより、顎骨再生への応用を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 筑波大学附属病院歯科口腔外科で、矯正治療などのために抜歯が必要とされた智歯を使用した。歯根の完成期に関しては、パノラマX線写真をもとに、歯冠完成期、歯根形成期、歯根完成期にそれぞれ分類した。

Developmental stage of teeth

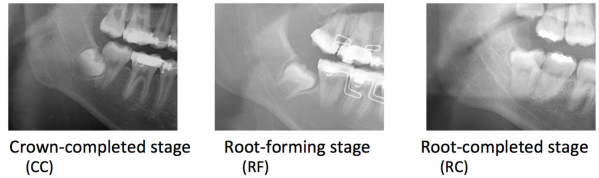


図1. 形成期による分類(歯冠完成期、歯根形成期、歯根完成期)

(2) 智歯より根尖組織をピンセットで分離し、コラゲナーゼ処理後に細胞を単離した。37℃, 5% CO₂条件下で培養を行った。培地には、IMDM + 10% FBSにL-glutamine 20 μg/mLと10 ng/mL basic-FGFを添加した。

(3) in vitro骨分化法は、細胞を4穴plateに細胞を播種し、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、28日間培養した。Alizarin Red S染色にてカルシウムの沈着を検出した。加えてAlizarin Red Sの吸光度を測定し、定量化した。

(4) 2 mm角のゼルフォームに目的の細胞を播種し、2時間静置する。C57/BL6マウスの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ゲージ針で髓内固定し閉創する。28日後にX線撮影を行い骨の修復を解析した。

4. 研究成果

(1) ALDH 活性による細胞分離は、DPSC の酵素活性が低く、分離が難しいことが分かっている。そこで智歯根尖組織を歯冠完成期、歯根形成期、歯根完成期の3群に分類し、比較解析することで、骨形成能に優れた DPSC 同定を行なった。

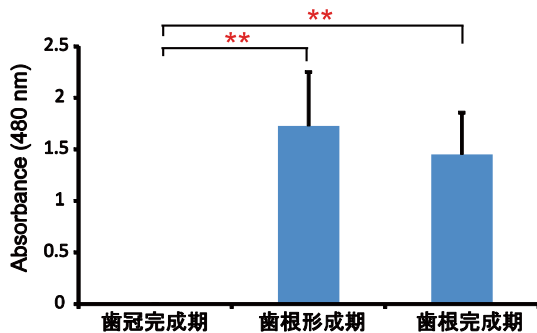


図 2. 歯の形成期による骨分化能の評価

アリザリンレッド染色法と吸光度測定による定量評価により骨分化能を評価した。歯根形成期、歯根完成期群は歯冠完成期群と比較して有意に高い骨分化能を示すことが明らかとなった。

(2) 歯根形成期・歯根完成期の DPSC において骨形成能が優れていることが、*in vitro* の骨分化法及び *in vivo* のマウス骨折モデルを用いて明らかにすることができた。

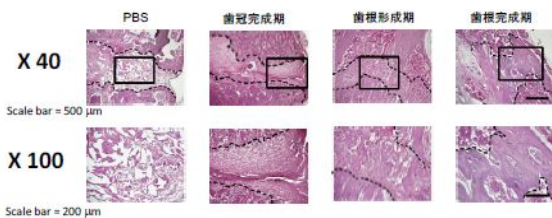


図 3. マウス骨折モデルによる歯の形成期ごとの骨形成能の評価

歯根完成期では骨折部位に軟骨細胞の形成、歯根形成期では線維骨の形成、歯根完成期では層板骨の形成を認めた。

また、接合部新生骨のデンストメトリー定量化では、コントロールと比較していずれの形成期でも有意に骨形成能が高かった。

(3) RT-PCR 法により DPSC 分化誘導前後の骨分化関連遺伝子の発現を比較解析した。骨分化において、Runx2 は初期から中期までは促進的に、中期から後期において抑制的に作用することが報告されている。

Oct-4 の発現は歯根完成期 DPSC が歯冠完成期、歯根形成期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が歯冠完成期、歯根形成期と比較して有意に高かった。

Col1, OPN, OC は Runx2 の標的遺伝子であり、それぞれ分化初期、中期、後期の骨分化マーカー遺伝子であることが報告されている。

歯根形成期・歯冠完成期群では骨分化誘導後に Runx2、OC の発現が上昇したのに対し、歯冠完成期群では分化誘導前からそれらの遺伝子発現は高く、逆に誘導後には発現減少が見られた。

いずれの群においても、分化誘導後に ALP 遺伝子発現が有意に上昇したが、歯冠完成期群における ALP 遺伝子発現は、歯根形成期・歯冠完成期群より低いことが分かった。

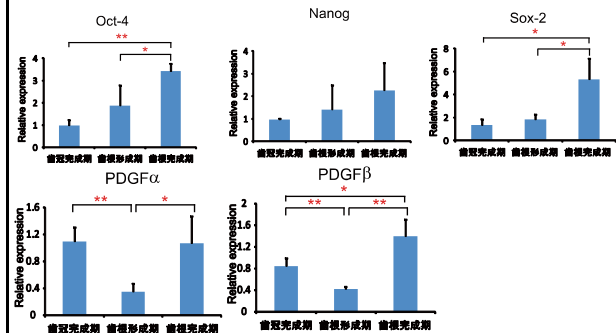


図 4. 形成期ごとの遺伝子発現

(4) マウス骨折モデルを用いた *in vivo* 解析実験において、3つの群はいずれも骨形成能促進に作用するが、3群間における有意差は認められなかった。

In vitro の解析結果から、分化誘導前に高い発現を示した Runx2 の発現が、歯冠完成期群の骨分化を抑制している可能性、さらに骨分化に際し、ALP 遺伝子発現上昇が抑制されている可能性が示唆された。

そこで、歯冠完成期 DPSC に対して、ALP 遺伝子を導入し、骨分化能について解析を行なった。ALP 遺伝子を導入した群において、導入していないコントロールと比較して、有意に骨分化促進に作用することが明らかとなった。

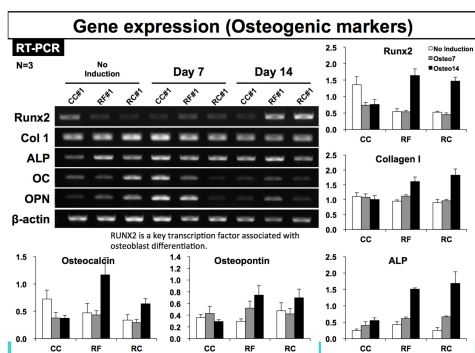


図 5. 遺伝子発現の様相

以上のことは、歯冠完成期 DPSC は骨分化能を有しているが、ALP 遺伝子発現が何らかの原因により抑制されていることで、歯根形成期および歯根完成期と比較して、有意に骨分化能が低下していることを示している。

次に、Runx2 の発現を制御している因子として、TGF-beta および BMP-2 の発現解析を行った。それらの遺伝子は、歯冠完成期の DPSC において、他時期由来の間葉系幹細胞と比較して有意に高い発現を示すことが分かった。そこで、TGF-beta 抑制因子を加えることにより、歯冠完成期の DPSC において正常な骨分化誘導が見られるかについて解析を行った。TGF-beta 抑制因子を加えた群では、抑制因子を加えなかった群と比較して、骨分化誘導前では、有意に Runx2 の発現を抑制しているが、骨分化誘導が進むにつれて、有意に Runx2 の発現を抑制しないことが明らかとなった。このことから、Runx2 の発現を制御している因子は、他に存在する可能性があることが推測された。

今後の研究課題として、歯冠完成期 DPSC における ALP 遺伝子発現低下の原因について明らかにすることを検討する。

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)

Kimura K, Nagano M, Salazar G, Yamashita T, Tsuboi I, Mishima H, Matsushita S, Sato F, Yamagata K, and Ohneda O. The role of CCL5 in the ability of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to support repair of ischemic regions. *Stem Cells Dev.* 2014; 23: 488-501. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

菊地豪、山縣憲司、佐藤和聡、木村健一、山下年晴、大根田修。「異なる歯組織形成段階における歯髓幹細胞の解析」、第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 22 日、横浜〔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:

出願年月日:

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

山縣 憲司 (YAMAGATA, KENJI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 00420084

(2) 研究分担者

大根田 修 (OHNEDA, OSAMU)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号: 30311872

長野 真澄 (NAGANO, MASUMI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 30436282