

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11844

研究課題名(和文) 歯髄由来間葉系細胞中Muse細胞の特性解析と歯周組織再生医療応用への展開

研究課題名(英文) Analysis of the Muse cells characteristics of were obtained from dental pulp, and development of periodontal regenerative therapy

研究代表者

長野 孝俊 (NAGANO, Takatoshi)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：10386914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄には間葉系幹細胞が存在することが知られているが、特性は明らかになっていない。近年、報告されたMuse細胞はあらゆる間葉系組織に存在すると報告されているものの、口腔組織中に存在するとの報告は少ない。そこで本研究は、歯髄組織中にMuse細胞が存在しているか検討した。歯髄細胞より分離したSSEA-3陽性細胞は約0.5%であり、その細胞は3胚葉性の遺伝子発現に加え自己複製能を示した。また、歯髄細胞由来SSEA-3陽性細胞を石灰化誘導培地で分化させたところ、高い石灰化誘導能を示した。この結果から、ヒト歯髄組織由来SSEA-3陽性細胞は骨形成能を有する細胞に分化する能力が高いことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Muse細胞は、表面抗原であるCD105とSSEA-3の抗体を用いて二重染色後、ソーティングを行い得られるが、SSEA-3単独での分離を行った細胞でも一定程度の幹細胞が得られ、その細胞は石灰化能を有することが本研究により明らかとなった。

歯髄組織は比較的低侵襲で細胞を得ることが可能で、便宜抜歯や智歯抜歯で得られる抜去歯は医療廃棄物であり、それらの抜去歯から歯髄組織を得ることができる。現在、主に骨髓細胞を用いた再生医療が歯科領域では行われているが、それと比較してもより低侵襲で細胞を得られるメリットがあり、今後も新たな細胞供給源として歯髄組織の有効性を検証することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells are known to exist in pulp tissue. However, the detailed characteristics of the stem cells have not been elucidated. Recently, the presence of novel Muse cells which has been reported. Researches mentioned that Muse cells exist in all mesenchymal tissues. However, there is hardly any report regarding the existence of Muse cells in oral tissues. Therefore, the purpose of this study was to determine the presence of Muse cells in dental pulp tissue.

About 0.5% of SSEA-3 positive cells were isolated from dental pulp cells by cell sorter. The isolated cells showed self-renewal ability in addition to expressing the genes representing the three germ layers. Furthermore, the isolated cells showed a high calcification ability when subjected to calcification-inducing medium. The results suggest that SSEA-3 positive cells derived from human dental pulp tissue are similar to Muse cells, highly capable of differentiating into osteogenic cells.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯髄 幹細胞 SSEA-3 フローサイトメトリー 歯周組織再生療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、幹細胞を用いた再生医療の研究が盛んにおこなわれている。再生医療に用いられる細胞としては特に ES 細胞、iPS 細胞などについての研究が進んでいる。2011 年には、間葉系細胞中に SSEA-3 と CD105 の両陽性を示す細胞が存在し、この細胞は iPS 細胞、ES 細胞と同じく体のあらゆる細胞に分化可能であることが示され Muse 細胞として報告された。Muse 細胞の特徴として iPS 細胞などと比較して腫瘍性を持たないことがある。また Muse 細胞は血管を介して移植することで損傷部位に細胞が集積し、自発的に組織に応じた細胞に分化することで損傷を受けた組織の修復、再生を行うことが報告されており、早期の再生医療への応用が期待されている。Muse 細胞は間葉系組織であれば体組織のどこにでも数%の割合で存在するとされている。これまでの主な研究から骨髄、皮膚、脂肪組織より Muse 細胞が採取できることが報告されている。しかし、歯科領域での研究は少なく、口腔組織中に Muse 細胞が存在しているとの報告や研究は歯根膜から採取された Muse 細胞の存在に関する報告のみである。

2. 研究の目的

歯根膜は歯周組織の維持と再生に中心的役割を果たしており、この機能を維持しうるのは歯根膜細胞が状況に応じて線維芽細胞、骨芽細胞あるいはセメント芽細胞に分化しうる多能性を備えているからであると考えられている。歯根膜細胞は単一の細胞集団ではなく、多数の異なる細胞集団であることが知られている。また、これまでの研究で歯根膜組織中には幹細胞マーカーを有する細胞が存在することが報告されているが、歯根膜と近接しており、類似した特性を有することが考えられる歯髄組織中の幹細胞の存在に関する Muse 細胞の報告は見当たらない。そこで本研究では歯髄細胞中に Muse 細胞が存在するかを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

本実験はコマーシャルベースのヒト歯髄細胞 (HDPSC) を用いて実験を行った (鶴見大学歯学部倫理審査委員会承認番号:1113)。Dulbecco's Modified Eagle Medium 培地に 10% fetal bovine serum、0.1 mg/mL kanamycin を添加した培地を増殖培地として用いた。HDPSC を T75 フラスコにそれぞれ 3.0×10^5 個播種し 5% CO₂ 条件下で培養した。72 時間毎に培地交換を行い、細胞がサブコンフルエントに達した時点で Trypsin-EDTA を用いて剥離、継代を行った。継代数 3 継代目の細胞をオーバーコンフルエントに達するまで培養しソーティングに用いた。

(2) フローサイトメトリーとセルソーティング

オーバーコンフルエントに達した 3 継代目の HDPSC を Trypsin-EDTA にて剥離、回収し一次抗体として抗 SSEA-3 抗体、二次抗体として FITC conjugated anti-rat IgM を用い染色を行い、phosphate buffered saline に 2mM EDTA-2Na、0.5% bovine serum albumin を添加し作製した FACS バッファーを使用してフローサイトメーターにてソーティングを行った。

(3) 細胞増殖能の観察

ソーティングにより得られた SSEA-3 陽性細胞の増殖能を観察するため、6 穴プレートに 1.0×10^4 個の細胞を播種し、増殖培地を用い培養した。培地は 72 時間毎に交換した。播種直後と、播種後 24 時間おきに 10 日間細胞数を計測し、増殖能の測定を行った。

(4) クラスタ形成能と自己複製能の観察

ソーティングにより得た細胞を単一細胞で Poly 2-hydroxyethyl methacrylate でコーティングした 96 穴プレートに播種し 3 日に 1 度培地を加え浮遊培養を行った。直径 25 μ m 以上のものをクラスタとして定義し、播種後 5~7 日後の単一細胞からのクラスタ形成を観察した。さらに

形成されたクラスターをピックアップしてゼラチンコーティングした 24 穴プレートに播種し、付着培養を行った。付着増殖した細胞から RNA を採取するとともに再度単一細胞で浮遊培養しクラスター形成を観察した。

クラスター形成した細胞を付着培養させたのち、再度浮遊培養にてクラスター形成能を維持しているか観察することで自己複製能の観察を行った。

(5) 3 胚葉性の遺伝子発現 (quantity PCR: Q-PCR)

Nucleo spin RNA XS を用いて total RNA を採取し、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA へ逆転写を行った。PCR は FastStart Essential DNA Green Master を用いて行った。内在性コントロールとして hGAPDH、内胚葉性マーカーとして α -fetoprotein (AFP)、GATA6、中胚葉性マーカーとして Brachyury、外胚葉性マーカーとして nestin の発現を観察した。

(6) 石灰化誘導 (Q-PCR 、 Alkaline Phosphatase 染色、アリザリンレッド染色、Ca 定量)

ソーティングにより得た細胞を付着培養したものをを用いて石灰化誘導を行った。6 穴プレートに 3.0×10^4 個の細胞を播種し増殖培地にて 37°C 5% CO_2 条件下のインキュベータ内で培養、翌日付着を確認したのち石灰化誘導培地 (10% FBS、10nmol/L dexamethasone、0.05mmol/L ascorbic acid、10mmol/L β sodium glycerol phosphate 添加 DMEM) に変え 72 時間毎に交換した。石灰化誘導開始後 1 日、3 日、5 日目における石灰化関連遺伝子発現を Q-PCR で観察、石灰化誘導開始後 1 週、2 週、3 週目で ALP 染色、アリザリンレッド染色を行うとともに、Ca 沈着量の観察を行った。

< ALP 染色 >

石灰化誘導後 1 週、2 週、3 週目に 6 穴プレートにて石灰化誘導を行った細胞でそれぞれの細胞中の ALP を染色し両者の細胞活性を評価した。培養上清を除去し細胞を PBS で洗浄後 100% メタノールにて細胞をウェル内に固定、その後固定液を除去し PBS で 3 回洗浄した。次に調整した基質液を各ウェルに加え 37°C で 30 分反応させた。最後に PBS で 3 回洗浄したのち、ウェルを乾燥させその染色を観察した。

< アリザリンレッド染色 >

石灰化誘導後 1 週、2 週、3 週目に 6 穴プレートにて石灰化誘導を行った細胞でアリザリンレッド S 染色を行った。ウェル内の培養上清を除去し、PBS で洗浄し 100% エタノールで固定、その後蒸留水で 3 回洗浄した。次に 1.0% アリザリンレッド S 染色液を加え室温にて 10 分静置後、再び蒸留水にて 3 回洗浄したのち、ウェルを乾燥させその染色を観察した。

< Ca 定量 >

石灰化誘導開始後 1 週、2 週、3 週目に 6 穴プレート中に形成されたカルシウム量を計測した。ウェル内の培養上清を除去し、PBS で洗浄後 0.5M 塩酸にて付着細胞を溶解し、懸濁液を計測に用いた。測定にはカルシウム E-テストワコーを用い、プレートリーダーにて 570nm の波長を計測しカルシウム量を算出した。

4 . 研究成果

(1) フローサイトメトリーとセルソーティング

オーバーコンフルエントに達した HDPSC 細胞を抗 SSEA-3 抗体、FITC を用いてソーティングした結果、SSEA-3 陽性率は約 0.5% (図 1) であった。

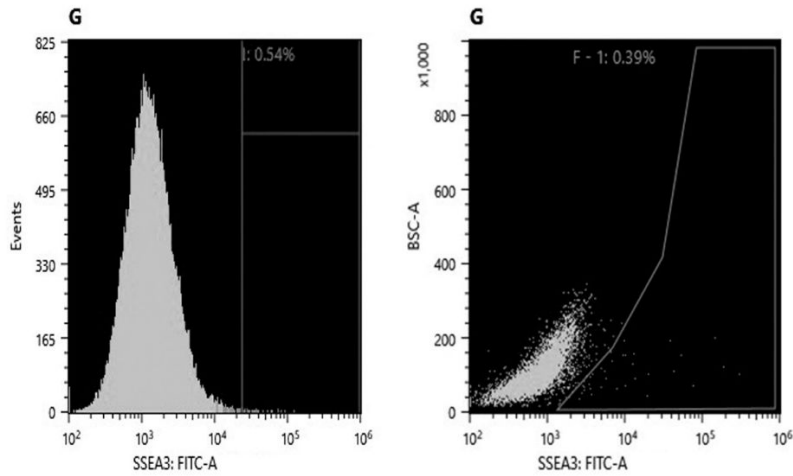


図1 ソーティング結果

(2) 細胞増殖能の観察

HDPSC 由来 SSEA-3 陽性細胞を 6 穴プレートで培養したところ、増殖曲線を描き、播種後 10 日でコンフルエントに達した(図 2)。

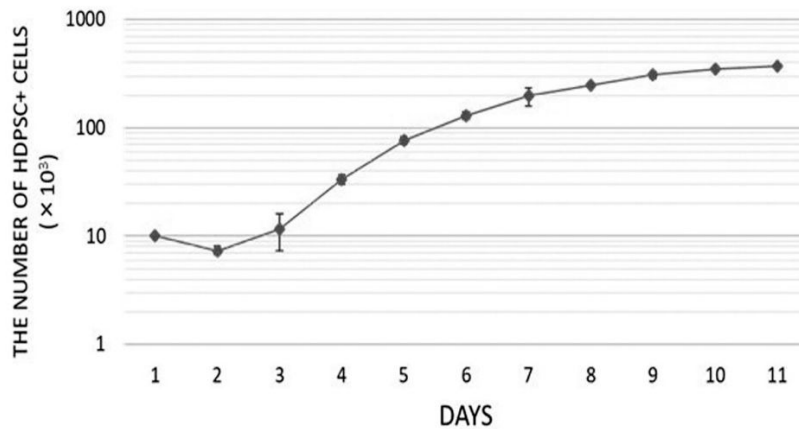


図2 細胞増殖能

(3) クラスター形成と自己複製能の観察

HDPSC からソーティングにより得られた SSEA-3 陽性細胞を poly-HEMA コーティングした 96 穴プレートにて単一細胞ごとに浮遊培養した結果、直径 25 μ m を超えるクラスターが観察された(図 3A)。また、このクラスターはゼラチンコーティングしたディッシュに播種することで付着増殖し、剥離して poly-HEMA コーティングした 96 穴プレートにて単一細胞ごとに浮遊培養することで再度クラスターを形成した(図 3B)。

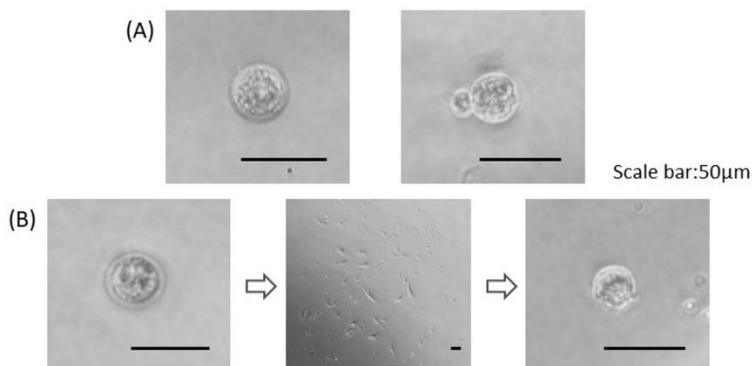


図 3A および B クラスター形成と自己複製能

(4) 3 胚葉性の遺伝子発現 (Q-PCR)

多能性の検証のため、HDPSC から分取して得た SSEA-3 陽性細胞から採取した RNA をもとに 3 胚葉性の遺伝子発現を Q-PCR にて観察したところ、3 胚葉遺伝子に関する全ての遺伝子発現が観察された。特に外胚葉性遺伝子の nestin が強く観察された(図 4)。

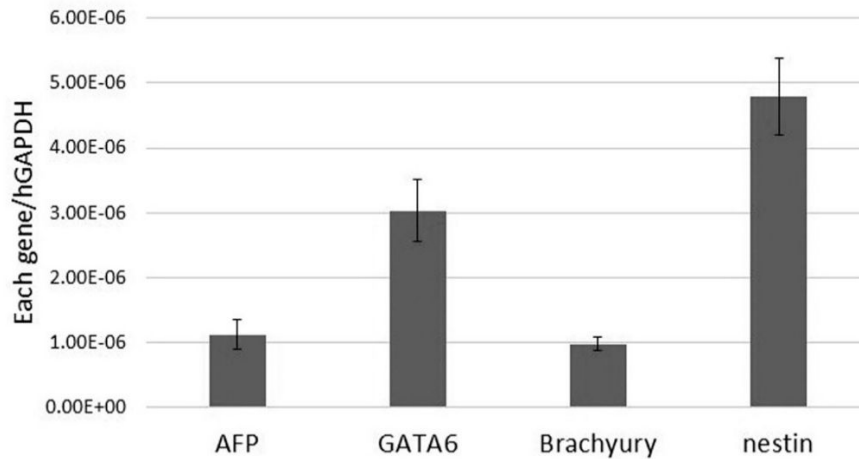


図 4 3 胚葉性遺伝子の発現

(5) 石灰化誘導 (Alkaline Phosphatase (ALP) 染色、アリザリンレッド染色、Ca 定量)

<ALP 染色>

SSEA-3 陽性細胞を 6 穴プレート上で石灰化誘導培地にて培養し、石灰化誘導開始後 1 週、2 週、3 週で ALP 染色を行った。HDPSC 由来 SSEA-3 陽性細胞は濃く染色され、ALP が活性化されていることが確認された。

<アリザリンレッド染色>

ALP 染色と同じ方法で SSEA3 陽性細胞を培養、石灰化誘導を行い、同じタイムポイントでアリザリンレッドによる染色を行った。HDPSC 由来 SSEA-3 陽性細胞では経時的に濃く染色され、3 週目では石灰化物がはっきりと染色されたため、高い石灰化能を有することが確認された。

<Ca 定量>

6 穴プレートで培養していた SSEA-3 陽性細胞の石灰化誘導開始後 1 週、2 週、3 週目のカルシウム量を計測したところ、経時的なカルシウム濃度の上昇を認め、特に石灰化誘導開始後 3 週では著明なカルシウムの産生が確認された (図 5)。

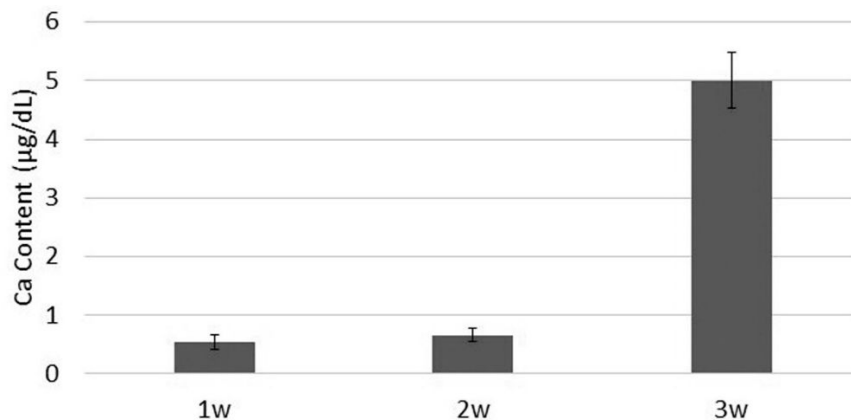


図 5 Ca の定量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 T. Nagano, T. Funatsu, K. Gomi.	4. 巻 28
2. 論文標題 Characterization of SSEA-3 Positive Cells Derived from Human Dental Pulp Stem Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Hard Tissue Biology.	6. 最初と最後の頁 335-340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhtb.28.335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 T. Funatsu, K. Gomi, Y. Matsushima, Y. Ujiie, T. Nagano.	4. 巻 27
2. 論文標題 Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from Periodontal Ligament.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hard Tissue Biology.	6. 最初と最後の頁 131-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhtb.27.131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長野孝俊、船津太一郎、五味一博
2. 発表標題 歯髄細胞由来SSEA-3陽性細胞の特性解析
3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 船津太一郎、松島友二、長野孝俊、五味一博
2. 発表標題 歯根膜細胞由来SSEA-3陽性細胞の特性解析
3. 学会等名 第60回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	金指 幹元 (KANAZASHI Mikimoto) (80339811)	神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師 (32703)	削除：2017年9月11日