

令和元年5月22日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20661

研究課題名(和文) 歯の移動時における末梢循環性間葉系幹細胞の歯根膜組織内への遊走能の解析

研究課題名(英文) Migration Ability of Mesenchymal stem cells in Periodontal Ligament

研究代表者

八城 祐一 (Yashiro, Yuichi)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：00740185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯根膜線維芽細胞に特異的に発現しているCXCL12の歯根膜組織における間葉系幹細胞の遊走能を明らかにすることを目的に、GFP陽性マウス間葉系幹細胞の尾静脈投与による遊走能の評価を行った。また、本研究に使用した間葉系幹細胞については、血管内移植前に表面抗原マーカーの発現、細胞付着性、多分化能の検討を行った。商業的に利用できるマウス間葉系幹細胞を入手し、推奨される試薬・培地類を使用し維持培養を行い6～9継代目のマウス間葉系幹細胞を本研究で使用した。マウス尾静脈投与により恒常時での循環性間葉系幹細胞の遊走を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根膜の線維芽細胞に高発現する遺伝子CXCL12の歯根膜における機能について解明することであり、さらには歯を移動した際の歯根膜の修復におけるCXCL12の関与を明らかにすることで、従来移動困難とされる骨性癒着歯などの矯正学的歯の移動などに有用な知見が得られると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The expression level of CXCL12 in the periodontal ligament fibroblasts(HPDL) was much higher than that in Dermal Fibroblasts in vitro and in vivo. HPDLF drew significantly high number of mesenchymal stem cells in the migration assay. In addition, the migrated MSCs expressed some genes that are characteristics of osteoblast.

研究分野：分子生物学

キーワード：歯根膜 CXCL12 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、平成 26 年度から 2 年間にわたり研究活動スタート支援の交付を受け、「歯根膜線維芽細胞に発現する CXCL12 の歯の移動における間葉系幹細胞遊走能の解析」をテーマに研究を行った。平成 26 年度には、歯根膜線維芽細胞がほかの結合組織の線維芽細胞と比較して、間葉系幹細胞の遊走因子である CXCL12 を高発現し、その CXCL12 が共培養での細胞遊走試験において間葉系幹細胞を有意に高く遊走することを報告した。その結果から歯根膜への細胞供給には血管からの間葉系幹細胞の供給という可能性があることを示唆してきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1 歯根膜線維芽細胞に高発現する CXCL12 の歯根膜組織における間葉系幹細胞の遊走能、2 歯の移動に伴う歯根膜の組織反応における間葉系幹細胞の遊走能の亢進状況を、分子生物学的並びに免疫組織学的に検討し、歯根膜組織への細胞供給における CXCL12 の機能を明らかにすることである。

3. 研究の方法

CXCL12 の発現量の検討 (in vivo)

本研究に先立ち in vitro での予備実験の結果から、歯根膜線維芽細胞と皮膚線維芽細胞の比較から CXCL12 の有意な発現の知見を得ている。それらの結果を組織レベルで検討するためマウスを用いて歯根膜組織と皮膚組織の CXCL12 について発現を比較検討する。マウスを十分な麻酔下のもと屠殺を行い、上顎第一臼歯部と頬部皮下組織を採取し液体窒素にて急速凍結を行う。その後 OCT コンパウンドにて包埋後、凍結した試料から連続切片を作製し、mRNA 発現量、タンパク発現量の解析を行う。mRNA 発現量、タンパク発現量については、凍結切片上で歯根膜組織と皮下結合組織をそれぞれレーザーマイクロダイセクション法にて採取し、CXCL12 の mRNA レベル(RT-PCR) およびタンパクレベル(ELISA)での発現量を解析する。

レポーター遺伝子陽性間葉系幹細胞の作製 (in vitro)

血管内投与を行った間葉系幹細胞の歯根膜領域への生着の検討に先立ち、レポーター遺伝子陽性間葉系幹細胞の作製を行う。レポーター遺伝子である Green Fluorescent Protein(GFP)を哺乳類細胞発現用遺伝子ベクターに導入する。作製したベクターを評価するため DNA シークエンシングにて塩基配列の正確性を確認する。前述のベクターを不活性化したレトロウイルスを用いてマウス間葉系幹細胞に遺伝子の安定導入を行う。レトロウイルスベクターは目的遺伝子を感染細胞染色体に安定に組み込むことができるため、目的遺伝子の長期安定発現ベクターとして本実験に有用であると判断した。その後、薬剤選択により耐性を持つ細胞から GFP 遺伝子のプロモーターもドライブした細胞のみを選択するため、リミッティングダイセクション法により GFP 陽性細胞の選別を行う。間葉系幹細胞のマーカー遺伝子および GFP を発現している細胞を RT-PCR にて発現遺伝子プロファイルの検討をすることで GFP 陽性間葉系幹細胞株(MSCs-GFP+細胞)とする。

矯正学的歯の移動時におけるレポーター遺伝子陽性間葉系幹細胞の投与 (in vivo)

歯の移動を行った際の間葉系幹細胞の遊走能を検討するため、前述の計画に従って GFP 陽性間葉系幹細胞を免疫不全マウスの尾静脈に血管内投与する。さらに、Waldo 法に準じてゴム小片を第一臼歯と第二臼歯間に挿入し 12, 24, 36, 48, 60, 72 時間の経過後、凍結切片を作製し蛍光顕微鏡にて GFP 陽性間葉系幹細胞の遊走傾向を検討する。右側臼歯部はネガティブコントロールとする。歯根膜領域ではその矯正力により圧迫側および牽引側領域が生じるため、近遠心側の歯根表面について遊走能を評価する。また、各時間の実験群でその領域の組織をレーザーマイクロダイセクション法にて採取し、CXCL12 遺伝子量を RT-PCR にて定量し、間葉系幹細胞の遊走数との比較検討を行う。また、適正な矯正力を負荷させる装置を適用するためにマウスを用いて同様の実験を行い、血管内投与した GFP 陽性間葉系幹細胞が歯根膜に定着するかを確認する。

4. 研究成果

当初の計画では矯正学的歯の移動を行ったのちに凍結切片を作成し圧迫測および牽引側領域の歯根表面について遊走能を評価する予定であったが、間葉系幹細胞の尾静脈投与後マウスの致死率が高くまた歯根の破損を避けて摘出を行う手技、矯正装置による適切な矯正力の適用が非常に困難であった。そのため実験動物をラットへの変更を検討し、ラットへの装置の適用および矯正力の負荷については再現可能であることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。