

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792317

研究課題名(和文) 歯周組織に存在するストレス抵抗性多能性幹細胞の同定と歯周組織再生への応用

研究課題名(英文) The isolation of stress-enduring stem cells in periodontal tissue and the application of periodontal guided tissue regeneration.

研究代表者

和田 悟史 (Wada, Satoshi)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20581119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウス皮膚線維芽細胞にストレスを負荷し、幹細胞を分離できるか検討した。7週齢マウスを用いてストレス抵抗性細胞の分離し、核型を検討したところ、染色体数に異常は認められなかった。また分離した細胞は幹細胞マーカーであるSSEA1に陽性であった。以上の結果よりマウス皮膚線維芽細胞に化学的ストレス負荷を行い、SSEA1陽性細胞の分離を行うことが出来たことより、幹細胞がストレスに抵抗性を持ち、その性質を用いて分離できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined to conduct trypsin treatment to dermal fibroblasts and isolate stem cells. We isolated stress tolerant cells from 7-week-old mice fibroblasts. The cells did not show abnormal karyotypes and are positive for SSEA-1. These results suggested that stem cells are stress-tolerant and we could isolate from mice fibroblasts.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：幹細胞 ストレス 核型

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周組織の治療はインプラントなどの人工材料および組織再生誘導因子により行われているが、術後感染、人工材料の耐久性および歯周組織再生の精度に問題があり、全てを克服することは出来ていない。歯周組織を含む組織再生医療には、細胞、足場そして増殖因子の3つの要素が必要である。

近年、幹細胞の研究が多数報告されており、幹細胞を用いた再生医療への期待が高まっている。歯周組織は歯肉・歯根膜・歯槽骨セメント質より構成されるが、歯周組織障害時の組織再生には歯根膜に存在する幹細胞が重要な役割を演じていると考えられる。

(2) 現在、組織再生における基礎研究が数多く行われているが、その中でヒト皮膚線維芽細胞において外的ストレスに強い性質を持った多能性幹細胞 (multilineage differentiating stress enduring cells ; Muse 細胞) が存在することが報告されている (Kuroda, et al, 2010)。ストレス抵抗性幹細胞は成人の骨髄や真皮、脂肪細胞などに存在する多能性成体幹細胞であり、単一の細胞から三胚葉すべての細胞に分化することができる。またこの細胞はテロメラーゼ活性が低く、免疫不全マウスへの移植の際、奇形種の形成しないことより腫瘍化の危険性が低いことが示唆されている。

(3) 現在、ストレス抵抗性多能性幹細胞はヒト皮膚線維芽細胞で報告されており、マウスにおいて存在するか否かは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

今回、マウス皮膚線維芽細胞に化学的ストレスを負荷し、ストレス抵抗性細胞の分離を行い、その細胞が幹細胞の性質

を持つことを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ストレス抵抗性細胞の分離

マウス皮膚組織の摘出を行い、outgrowth 法により皮膚由来細胞の遊離・培養を行う (初代培養)。マウス皮膚組織片を摘出後、コラゲナーゼ、トリプシンなどの酵素処理によって皮膚由来細胞を分離する。分離した細胞を培養し2、3 継代後、Kuroda らが報告した方法に準じて歯根膜由来細胞からストレス抵抗性多能性幹細胞の分離を行う。8 時間のトリプシン処理後 (long-term trypsin incubation : LTT)、生き残った細胞の浮遊培養を行う。この際、LTT により生き残ったストレス抵抗性幹細胞が 50~150  $\mu\text{m}$  程度のクラスターを形成する。7 日間の培養後、ゼラチンでコーティングしたシャーレで培養を7 日間行う。この操作を5 回繰り返し、マウス皮膚組織よりストレス抵抗性細胞の分離を行った。

### (2) 核型の解析

マウス皮膚組織由来細胞より分離したストレス抵抗性細胞の染色体に異常がないか調べるために、ギムザ染色を行い、染色体の数を調べた。

### (3) 幹細胞マーカーの発現解析

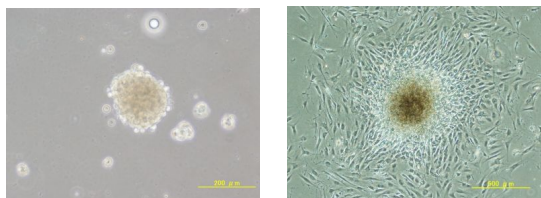
幹細胞マーカーである Nanog および Oct4 の発現を定量 PCR を用いて解析し、SSEA-1 は免疫組織化学を用いてその発現を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) マウス皮膚組織からのストレス抵抗性細胞の分離

5、7 および 10 週齢のマウスを用いて皮膚由来線維芽細胞の遊離および培養を行い、LTT 処理を行い、生き残った細胞の浮遊培養を行った。また生き残った細

胞の平面培養を行い、ストレス抵抗性細胞の分離を行った。各週齢において浮遊培養でクラスターの形成が認められ、ストレス抵抗性細胞の分離を行うことができた(図1)。



浮遊培養中のクラスター 接着培養中の細胞

図1. ストレス抵抗性細胞の分離

### (2) ストレス抵抗性細胞の核型

分離したストレス抵抗性細胞の染色体を調べるために、ギムザ染色を行った。その結果、5および10週齢マウスより分離した細胞の染色体の数が初代培養の時点で多い結果となったが、7週齢マウスより分離した細胞では初代培養時およびトリプシン処理後の染色体数に異常は認められなかった(図2)。

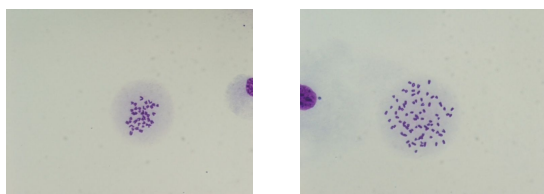


図2: ギムザ染色によるストレス抵抗性細胞の核型(左:7週齢由来 右:5週齢由来)

### (3) ストレス抵抗性細胞の幹細胞マーカーの発現

次に7週齢マウスより分離したストレス抵抗性細胞の解析を行った。定量PCRを用いて幹細胞マーカーのNanogおよびOctの遺伝子発現の検討を行った。初代培養細胞と同様に、NanogおよびOct4の発現は認められなかった。しかし免疫蛍光染色よりストレス抵抗性細胞は幹細胞マーカーであるSSEA-1に陽性であった(図3)。

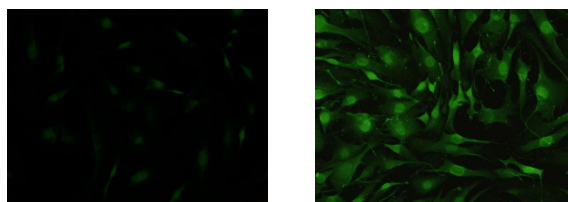


図3: SSEA-1の免疫染色

左:トリプシン処理前 右:トリプシン処理後

以上の結果より皮膚線維芽細胞に化学的ストレス負荷を行い、SSEA-1陽性細胞の分離が出来たことより、幹細胞がストレスに抵抗性を持ち、その性質を用いて分離できる可能性が示唆された。

## 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4件)

Wada S, Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Nakamura Y, Nakashima K, Kimura H, Shinkai Y, Tachibana M, Nifuji A. H3K9MTase G9a is essential for the differentiation and growth of tenocytes in vitro. *Histochem. Cell Biol.* 査読有, 144: 13-20, 2015. DOI: 10.1007/s00418-015-1318-2

Shimada A, Wada S, Inoue K, Ideno H, Kamiunten T, Komatsu K, Kudo A, Nakamura Y, Sato T, Nakashima K, Nifuji A. Efficient expansion of mouse primary tenocytes using a novel collagen gel culture. *Histochem. Cell Biol.* 査読有, 142: 205-215, 2014. DOI: 10.1007/s00418-014-1191-4

Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Wada S, Ideno H, Nakashima K, Amizuka N, Noda M, Nifuji A.

Alendronate promotes bone formation by inhibiting protein prenylation in osteoblasts in rat tooth replantation model. J Endocrinol. 査読有 219: 145-58, 2013. DOI: 10.1530/JOE-13-0040

Takahashi K, Kajii T, Tsukamoto Y, Saito F, Wada S, Sugawara-Kato Y, Iida J. Histological study of the nasal septal cartilage in BALB/c-*bm/bm* mouse which spontaneously induces malocclusion. Takahashi K, Kajii TS, Tsukamoto Y, Saito F, Wada S, Sugawara-Kato Y, Iida J. Orthod. Craniofac. Res. 査読有 15: 84-91, 2012. DOI: 10.1111/j.1601-6343.2011.01538.x

〔学会発表〕(計 8 件)

和田悟史、成宮毅、柘植厚志、菅崎弘幸、中村芳樹．矯正の歯の移動時に発現する ENPP1 の免疫組織化学的研究、第 73 回日本矯正歯科学会大会・第 5 回日韓ジョイントミーティング、2014 年 10 月 20-22 日、幕張メッセ (千葉県千葉市)

和田悟史、出野尚、島田明美、上運天太一、中島和久、中村芳樹、二藤彰．腱細胞の発生分化におけるヒストンメチル化酵素 G9a の機能、第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014 年 9 月 25-27 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

和田悟史、島田明美、出野尚、立花誠、中村芳樹、中島和久、二藤彰．ヒストンメチル化酵素 G9a による腱細胞の分化制御、第 32 回日本骨代謝学会学術集会、2014 年 7 月 24-26 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

Satoshi Wada, Akemi Shimada, Hisashi Ideno, Yoshiki Nakamura, Kazuhisa Nakashima, Akira Nifuji. Regulations of osteoblastic survival at enthuses. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

和田悟史、島田明美、二藤彰、中村芳樹．腱由来細胞による骨芽細胞制御、第 72 回日本矯正歯科学会大会、2013 年 10 月 7-9 日、キッセイ文化センター・松本市総合体育館 (長野県松本市)

和田悟史、島田明美、中村芳樹、中島和久、二藤彰．腱細胞による骨芽細胞制御、第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013 年 9 月 20-22 日、岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

Satoshi Wada, Akemi Shimada, Hisashi Ideno, Yoshiki Nakamura, Kazuhisa Nakashima, Akira Nifuji. Tenocytes regulate cell survival of osteoblasts in vitro. 国際骨代謝学会・日本骨代謝学会 第 2 回合同国際会議、2013 年 5 月 28 日-6 月 1 日、神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)

和田悟史、島田明美、出野尚、中村芳樹、中島和久、二藤彰．Soluble factors may mediate signals from tendons to bone. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

和田 悟史 (WADA SATOSHI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20581119

