

平成 21 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592107

研究課題名（和文）胚性幹細胞から誘導された神経堤幹細胞及び歯胚（歯髄）の幹細胞を用いた硬組織再生

研究課題名 Regeneration of hard tissues using Neural crest stem cells induced from Embryonic stem cells and dental mesenchymal stem cells.

研究代表者 山崎 英俊（YAMAZAKI HIDETOSHI）

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00283987

研究成果の概要：

中胚葉或いは神経堤由来細胞を標識できるマウスを用いて、歯胚（歯髄）の間葉細胞の由来を解析し、歯の間葉には神経堤由来細胞と中胚葉由来の2つの間葉細胞が存在することを明らかにした。また、歯に存在する神経堤由来細胞は象牙芽細胞のみならず、骨や軟骨、脂肪細胞への分化能を持つことを明らかにした。神経堤或は中胚葉に由来する細胞を特異的に標識することができるマウス受精卵より胚性幹細胞株を樹立し、これらの胚性幹細胞株からレポーター遺伝子の発現を指標に神経堤に由来する細胞を誘導する系を確立した。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合 計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |
| 2008 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総 計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：発生学、幹細胞医学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：神経堤細胞、間葉細胞、胚性幹細胞、象牙芽細胞、歯髄、歯胚、骨芽細胞、中胚葉

1. 研究開始当初の背景

（1）近年、幹細胞医学の発展により細胞或いは器官レベルでの再生の可能性が論じられている。歯科医学の分野でも、幹細胞を用いた歯のみならず顎顔面領域の硬組織再生に実現に大きな期待が寄せられている。

（2）幹細胞とは自己増殖能と多分化能を持つ細胞集団として定義され、大きく胚性幹細胞（全能性幹細胞 ES 細胞）と組織幹

細胞に分けて考えられる。ES 細胞は全ての細胞系譜への分化全能性を有し、一方で組織幹細胞は限局的な分化能を持つことが知られ、脳、肝臓や歯等様々な器官にも組織幹細胞が存在することが報告されている。

（3）現在、ヒト歯髄及び歯根膜周囲に象牙芽細胞、骨様細胞、あるいはセメント芽細胞に分化できる細胞が存在することが報告されている（PNAS. Miura,

2003; Lancet. Seo, 2004) が、歯の幹細胞の由来はよくわかっていない。さらに、幹細胞はその多分化能と分化の制御が難しいことから、幹細胞の由来とその分化能を理解することが大変重要である。また、再生医療の材料としてはより多分化能を持つ細胞が好ましいが、生体内での制御を考えると、より限局的な分化能を持つ幹細胞を利用する方が好ましいという解決すべき点も多い。

(4) これまで、歯の間葉細胞は主に神経堤細胞に由来すると考えられており、実際にマウス神経堤由来細胞を特異的に標識する方法が最近報告され (Development, Chai, 2000)、神経堤細胞の研究が大きく伸展した。我々も神経堤細胞を標識できるマウスを用いて神経堤細胞の器官形成への関わりやその分化能を研究してきた。また、最近、神経堤由来細胞のみならず中胚葉に由来する細胞を標識できるマウスの報告も或り、これらの様々なマウスを併せ用いる事により幹細胞の由来を明らかにする研究が可能になってきた。

2. 研究の目的

(1) 間葉系細胞は主に神経堤由来細胞と中胚葉由来細胞に大別され、神経堤由来細胞を特異的に標識することのできるマウスと中胚葉由来細胞を特異的に標識することのできるマウスを用いて、歯胚・歯髄の間葉細胞の由来を明らかにし、その分化能や性質を明らかにすることである。

(2) 歯髄及び歯胚の間葉の幹細胞の由来と分化能、遺伝子発現等の性質を明らかにし、歯の幹細胞の本体を明らかにすることである。

(3) 歯の組織幹細胞ではなく、もう一つの幹細胞である胚性幹細胞を用いて、歯の象牙芽細胞を分化誘導する系を確立することである。まず、前段階として、神経堤由来細胞及び中胚葉に由来する細胞を蛍光のレポーター遺伝子で特異的に標識できる ES 細胞株を樹立し、神経堤細胞を試験管内で分化誘導する系を確立することが目標である。さらに、これら ES 細胞から誘導された神経堤細胞を用いて、各種の硬組織を形成する細胞系譜の分化誘導系を確立することが最終目的である。

3. 研究の方法

(1) 中胚葉或は神経堤由来細胞を標識できるマウスを用いた歯胚 (歯髄) の間葉細胞の由来の解析

①中胚葉或いは神経堤由来細胞を蛍光あるいは LACZ 等のレポーター遺伝子で標識できるマウスの歯胚或は歯髄細胞を回収し、間葉細胞を単離し、フローサイトメーターにてその占める割合を調べる。

②これらの二つの細胞系譜に由来する間葉細胞の表面分子解析を行なう。

(2) 神経堤に由来する細胞を蛍光或は LACZ 等のレポーター遺伝子で標識できるマウスから歯胚 (歯髄) の間葉細胞を単離し、これら間葉細胞の硬組織への分化能を検討する。

(3) 神経堤由来細胞をレポーター遺伝子で標識できる胚性幹細胞株の樹立① PO-cre 或は Wnt1-cre マウスと CRE の存在下でのみレポーター遺伝子の一つである蛍光蛋白 YFP を発現する Rosa26RYFP マウスを掛け合わせ、受精卵から胚性幹細胞株を樹立する。②神経堤細胞系譜の色素細胞の分化誘導条件において YFP 陽性細胞が色素細胞に分化するかを検討する。

(4) マウスの歯胚或は歯髄に存在する間葉細胞、特に神経堤由来細胞から象牙芽細胞の分化誘導系を確立する。

(5) 胚性幹細胞から試験管内で象牙芽細胞への分化誘導系を確立する。

(6) 象牙芽細胞を蛍光標識できる胚性幹細胞株を作製する。

4. 研究成果

上記の実験方法を行ない、以下の成果を得た。

(1) 中胚葉或いは神経堤由来細胞を蛍光標識できるマウス歯胚或は歯髄より神経堤由来細胞及び中胚葉に由来する細胞を単離し、細胞表面分子解析を併せて行なった。①歯胚及び歯髄の間葉には神経堤由来細胞と中胚葉由来の2つの間葉細胞が存在することを明らかにした。②また神経堤に由来する細胞は大部分が間葉系マーカーの一つとして知られる PDGFRα を発現し、一方中胚葉に由来する細胞は CD31 を発現していることがわかった (投稿準備中)。このことは、神経堤に由来する細胞と中胚葉に由来する細胞は、性質が異なることを意味し、異なった役割で歯の器官形成に寄与している可能性を示唆する。

(2) 神経堤に由来する細胞を蛍光或は LacZ で標識できるマウスから間葉細胞を単離し、分化誘導を行なったところ、歯に

存在する神経堤由来細胞は象牙芽細胞のみならず、骨芽細胞や軟骨細胞、脂肪細胞への分化能を併せ持つことがわかった（雑誌論文⑤）。このことは、歯髄の間葉細胞が現在行なわれている骨髄細胞を用いた、再生医療に代わる新しい再生医療のソースとして有効利用可能であることを提示するものである。

（３）①神経堤由来細胞をレポーター遺伝子で標識できる PO-cre 或は Wnt1-cre マウスと CRE の存在下でのみレポーター遺伝子の一つである蛍光蛋白 YFP を発現する Rosa26RYFP マウスを掛け合わせ、受精卵から胚性幹細胞株を樹立した。これらの胚性幹細胞株からレポーター遺伝子の発現を指標に神経堤に由来する細胞を誘導する系を確立した（投稿準備中）。この系を用いることで試験管内で神経堤由来細胞がどのような細胞集団から発生するのかを検討することが可能になり、これらの胚性幹細胞株は神経堤細胞研究を進める上で大変重要な道具となる。

②YFP を発現する細胞が高頻度に、神経堤細胞の派生物である色素細胞への分化能を有することを明らかにした。このことは、少なくとも色素細胞への分化能の点では、YFP 陽性細胞の中に、神経堤由来細胞が十分に含まれており、神経堤由来細胞が、YFP で標識できていることを意味する。

（４）我々は歯髄の神経堤由来細胞から象牙芽細胞に特異的に発現する遺伝子として知られている Dentin sialophosphoprotein (Dspp) の発現を指標に、象牙芽細胞を誘導する系を既に確立した（論文③）が、試験管内で歯胚の未分化神経堤細胞から象牙芽細胞への分化誘導系の確立には未だに至っていない。しかし、歯胚培養にて象牙芽細胞に相当する細胞がレポーター遺伝子を発現する事を確認しているので、神経堤に由来する細胞が象牙芽細胞への分化能を持つ事は明らかである。今後は、未分化神経堤細胞を象牙芽細胞へと分化誘導するための条件として、どのような細胞との共培養或は因子が必要であるのかを明らかにしなくてはならないであろう。

（５）我々は、神経堤由来細胞を蛍光標識できる ES 細胞株を樹立し、この細胞株を用いて、培養 9 日目の胚性幹細胞から骨芽細胞や脂肪細胞等の間葉系への分化能を持つ神経堤由来細胞を単離する系を確立した。現在、これらの神経堤由来細胞が象牙芽細胞への分化能を持つかを検討中である。（投稿準備中）

（６）象牙芽細胞の分化誘導の有無をレポーター遺伝子の発現を指標に検出する系を

確立する目的で、象牙芽細胞に特異的に発現する遺伝子として知られている Dentin sialophosphoprotein (Dspp) 遺伝子座にレポーター遺伝子蛍光蛋白の GFP 遺伝子を導入した ES 細胞株を作製中である。象牙芽細胞の分化の有無をレポーター遺伝子で正確に検出する系は未だに確立されていないので、この胚性幹細胞株は、試験管内、及び生体内での象牙芽細胞の分化の有無を検出する大変有効な道具になると考えられる。

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 ８件）

① Toshiyuki Yamane, Naoki Hosen, Hidetoshi Yamazaki, Irving Weissman. Expression of AA4.1 marks lymphohematopoietic progenitors in early mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2009) In press (査読有)

② Michinari Nose, Hidetoshi Yamazaki, Hiroshi Hagino, Yasuo Morio, Shin-Ichi Hayashi, and Ryota Teshima. Comparison of Osteoclast Precursors in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Rheumatoid Arthritis and Osteoporosis Patients. *J. Bone Mine. Metab.* (2008) In press (査読有)

③ Miya Yoshino, Hidetoshi Yamazaki, Shin-Ichi Hayashi. Analysis of capturing skin antigens in the steady state using milk fat globule EGF factor 8-deficient skin-hyperpigmented mice. *Immunology Letters*. 115(2) p131-137 (2008) (査読有)

④ 川添真史郎、駒田行哉、山根利之、山崎英俊「幹細胞生物学を基盤とした歯の再生」日本口腔顎顔面外傷学雑誌 第 7 巻 第一号 (2008) p2-7 (査読無)

⑤ Hiromitsu Saito, Toshimichi Yoshida, Hidetoshi Yamazaki, Noboru Suzuki. Conditional N-ras G12V expression promotes manifestations of neurofibromatosis in a mouse model. *Oncogene* 26(32), 4714-19 (2007) (査読有)

⑥ Hidetoshi Yamazaki, Motokazu Tsuneto, Miya Yoshino, Kenichi Yamamura, Shin-Ichi Hayashi. Potential of dental mesenchymal

cells in developing teeth. *Stem Cells*. 25. p78-87. (2007) (査読有)

⑦ Naoki Hosen N, Toshiyuki Yamane, M Muijtjens, K Pham, MF Clarke, IL Weissman. Bmi-1-green fluorescent protein (GFP)-knock-in mice reveal the dynamic regulation of Bmi-1 expression in normal and leukemic hematopoietic cells. *Stem Cells* 25: 1635-1644, (2007) (査読有)

⑧ 山崎英俊「神経堤細胞と器官形成及びその分化能」アニテックス Vol119, No.1 p34-40(2007) (査読無)

〔学会発表〕(計 14件)

① 門田大司、山根利之、川添真史郎、山崎英俊「胸腺と骨髄に存在する間葉細胞の由来および性状解析」第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月13日(神戸)

② 齊藤浩充、山崎英俊、澤木昭彦、鈴木昇「ドミナントネガティブタイプALK3過剰発現によるBMPシグナルの顔面発生過程における機能解析」第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月11日(神戸)

③ 宮崎勝行、山根利之、川添真史郎、山崎英俊「マウス胚性幹細胞を用いた神経堤細胞の誘導と分化能の検討」第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月11日(神戸)

④ 山根利之、山崎英俊「Characterization of the earliest hematopoietic stem cells with lymphoid potential at pre-fetal liver stages」第38回日本免疫学会年次集会 2008年12月2日(京都)

⑤ 山根利之、山崎英俊「マウス胚発生期におけるc-Kit, AA4.1両陽性細胞の局在および分化能の解析」第70回日本血液学会総会 2008年10月10日(京都)

⑥ 駒田行哉、川添真史郎、山崎英俊「歯胚および歯髄の間葉細胞の由来と分化能」第50回日本歯科基礎医学会 2008年9月23日(東京)

⑦ 山崎英俊、門田大司、駒田行哉、川添真史郎、山根利之「歯、胸腺及び骨髄の間葉細胞の由来およびその分化能の検討」第6回幹細胞シンポジウム 2008年5月16日(東京)

⑧ 宮崎勝行、山根利之、川添真史郎、山崎英俊「マウス胚性幹細胞を用いた神経堤細胞の誘導と分化能の検討」第6回幹細胞シンポジウム 2008年5月16日(東京)

⑨ 山崎英俊「歯の間葉細胞の由来とその分化能」第49回日本歯科基礎医学会 2007年8月30日(札幌)

⑩ 山崎英俊「歯の器官形成に關与する神経堤由来細胞とその分化能」第28回日本炎症再生医学会(シンポジウム) 2007年8月3日(東京)

⑪ Yamazaki Hidetoshi, Yamane Toshiyuki, Hayashi Shinichi 「Potential of dental mesenchymal cells in developing teeth」第40回日本発生生物学会 第59回日本細胞生物学会合同大会 2007年5月30日(福岡)

⑫ 山根利之、山崎英俊、Irving L. Weissman. 「マウス発生過程におけるAA4陽性造血前駆細胞の解析」第5回幹細胞シンポジウム 2007年5月18日(淡路島)

⑬ 山崎英俊「歯の間葉細胞の分化能」第112回日本解剖学会総会全国学術総会シンポジウム 2007年3月27日(大阪)

⑭ 山崎英俊「神経堤由来細胞と歯と歯周組織の再生」歯の発生の会「第5回歯の発生生物学と再生に関するシンポジウム」(第112回日本解剖学会総会全国学術総会) 2007年3月26日(大阪)

〔図書〕(計 2件)

① Methods for investigation of osteoclastogenesis using mouse embryonic stem cells. Motokazu Tsuneto, Toshiyuki Yamane, Shin-Ichi Hayashi. In: zur Nieden NI ed. Embryonic stem cell therapy for osteodegenerative diseases. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 'In Press' (2008) (査読無し)

②山崎英俊 他2名 南山堂 免疫学コア
講義 (分担執筆 免疫関連細胞) (2007) p12-23

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 英俊 (YAMAZAKI HIDETOSHI)
三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00283987

(2) 研究分担者

山根 利之 (YAMANE TOSHIYUKI)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30452220

(3) 連携研究者