

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659422

研究課題名（和文）神経堤と中胚葉を標識できるマウスを用いた歯髄及び骨髄幹細胞の起源と性状の解明

研究課題名（英文）Analysis of the origin and properties of dental and bone marrow mesenchymal stem cells by using mice to label NC-derived and mesodermal 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（和文）：中胚葉或いは神経堤由来細胞を蛍光標識できるマウスを用いて歯の間葉の大部分が神経堤細胞に、骨髄の間葉細胞の半分が中胚葉由来及び神経堤に由来する細胞からなることを明らかにした。また、間葉系幹細胞の検出法である Colony-Forming Unit Fibroblast (CFU-F) アッセイにより歯の CFU-F 形成細胞は主に神経堤に、骨髄の CFU-F 形成細胞は神経堤のみならず、中胚葉に由来する細胞からなることを明らかにした。また歯髄の間葉細胞が骨髄の間葉細胞と同様に B 細胞や破骨細胞の分化を支持する能力を持つ事を見いだした。

研究成果の概要（英文）：By using transgenic mouse which enabled us to trace NC-derived or mesodermal cells, we showed that dental mesenchyme was composed of mainly NC-derived cells, whereas half of bone marrow (BM) mesenchyme was composed of cells other than NC-derived and mesodermal cells. Furthermore, a colony-forming unit-fibroblast (CFU-F) assay indicated that CFU-Fs in the dental pulp are derived from NC, and BM are derived from both NC and mesodermal cells. Furthermore, we showed that dental mesenchyme supported the differentiation of B lymphocytes and osteoclasts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	0	1,100,000
2010 年度	1,100,000	0	1,100,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	240,000	3,240,000

研究分野：幹細胞学・再生医学

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・中胚葉・間葉系細胞・歯髄細胞・骨髄間葉系細胞・象牙芽細胞・胚性幹細胞・細胞系譜追跡

## 1. 研究開始当初の背景

神経堤細胞は、脊椎動物の胚発生初期に神経管背側部より出現する細胞集団で、特に頭部神経堤細胞は骨、軟骨や象牙芽細胞等の間葉系細胞への分化能を有し、脊椎動物のボディプランを特徴づける重要な細胞と考えられ

ている。間葉系細胞は中胚葉及び神経堤細胞に由来し、特に頭部の間葉は主に神経堤に、体幹部の間葉は、主に中胚葉に由来すると考えられているが、実際は両者の区別は難しい。最近、神経堤細胞に特異的に遺伝子発現を誘導出来る制御

領域の下流に Cre を連結したマウスと LoxP 配列を持つレポーター遺伝子を組み合わせることで、神経堤に由来する細胞を標識できるようになった (Dev. Biol, Yamauchi, 1999; Development, Chai, 2000)。我々も、これらのマウスを用いて、歯の間葉には骨や軟骨や象牙芽細胞への分化能を持つ多数の細胞が存在し、それらが神経堤のみならず神経堤以外に由来する可能性を示した (Int Immunol, Yamazaki, 2005; Stem cells. Yamazaki, 2007)。そこで、中胚葉由来細胞を標識できるマウス (Development, Saga, 1999) を用いて、歯胚や歯髄間葉に中胚葉由来の細胞が寄与している事を明らかにした。最近、骨髄細胞にも、神経堤に由来する細胞が多数寄与していることが明らかになったが (Takashima, Cell 2008)、さらに我々は骨髄細胞のなかでも間葉系幹細胞は主に神経堤に由来する可能性を明らかにした。我々は、歯の幹細胞は主に神経堤細胞に由来する可能性を示したので、歯髄と骨髄間葉系幹細胞は同一の細胞に由来する可能性があり、両者の分化能と遺伝子発現様式を調べる事は大変重要な研究であると判断した。

## 2. 研究の目的

脊椎動物の間葉を構成するのは主に神経堤或は中胚葉に由来する細胞であるが、個々の器官や組織を構成する間葉細胞の詳細な由来は殆どわかっていない。最近、骨髄間葉細胞を用いた再生医療が行なわれているが、歯髄にも様々な幹細胞の存在の報告がある。そこで、中胚葉と神経堤由来細胞を別々に標識し、骨髄と歯髄を形成する間葉系幹細胞の由来と性状を明らかにし、その類似点と相違点を明らかにすることである。また、骨髄に代わる、歯の間葉系幹細胞を用いた再生医療の実現の可能性を検討することが本研究の主目的である。神経堤細胞や中胚葉由来細胞に加えて、象牙芽細胞を蛍光色素で標識できるマウスを用いることで、骨髄細胞の象牙芽細胞への分化能も併せて検討したいと考えている。

## 3. 研究の方法

(1) 中胚葉或いは神経堤由来細胞を蛍光蛋白で標識できるマウスを用いた歯胚 (歯髄) と骨髄の間葉系幹細胞の由来と性状の解析

① 骨髄及び歯髄の間葉細胞を単離し、フローサイトメトリーを用いて蛍光蛋白を指標に細胞の由来と細胞表面受容体の発現を解析する

② 間葉系幹細胞の検出系として知られる

Colony-Forming Unit Fibroblast (CFU-F) アッセイを用いて、歯髄及び骨髄の間葉系幹細胞の由来を検討する

③ これらのコロニー形成細胞が2次コロニーを形成できるかを検討し、幹細胞の性質をもつか更に検討する

④ 歯髄及び骨髄の間葉系細胞を単離し、骨、脂肪、軟骨への分化能を検討する。また、コロニー形成細胞から由来する単一クローンを単離し、多分化能を調べる

(2) 象牙芽細胞に特異的に発現する Dentin sialophosphoprotein (Dspp) 遺伝子座に蛍光蛋白遺伝子を挿入した ES 細胞株の作製と、これらの ES 細胞株を用いたキメラマウスの作製

① 組み換え遺伝子ベクターの作製

② 組み換え ES 細胞株の単離

③ 組み換え ES 細胞株を用いたキメラマウスの作製

(3) 中胚葉或いは神経堤由来細胞を標識できるマウス歯髄及び骨髄の間葉系細胞を用いた血液細胞の分化支持能の検討

① 歯髄の細胞の単離と B 細胞分化誘導

② 歯髄の間葉細胞での破骨細胞の分化誘導

## 4. 研究成果

(1) 中胚葉或いは神経堤由来細胞を蛍光蛋白で標識できるマウスを用いた歯胚 (歯髄) と骨髄の間葉系幹細胞の由来と性状の解析

① 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、歯の間葉細胞の大部分が神経堤に由来し、一部は中胚葉に由来することを明らかにした。またこれらの間葉細胞の性質や細胞表面の受容体の発現を調べた所、神経堤に由来する歯の間葉細胞は、PDGFR-alpha或はPDGFR-betaを高発現し、一方中胚葉に由来する細胞は、PDGFRを発現せず、主に血管内皮様の分子を発現する事がわかった。一方で骨髄の間葉細胞は神経堤のみならず、中胚葉に由来する細胞からなり、またPDGFR-alpha或はPDGFR-betaを発現する細胞は神経堤及び中胚葉由来の両者からなることを明らかにした。また、骨髄の間葉の半分以上は神経堤或は中胚葉由来細胞を標識するこの実験系では標識できないことがわかった。

② 間葉系幹細胞の試験管内検出法である、colony-forming unit-Fibroblast

(CFU-F)を調べた所、歯の間葉系幹細胞様の性質を持つのは神経堤由来の細胞であり、一方で骨髄のCFU-F形成細胞は神経堤のみならず、中胚葉に由来する細胞からなることを明らかにした。

③ また、CFU-Fを形成する細胞が、2次コロニー形成能を持つかを検討した所、歯の神経堤由来細胞は、2次コロニー形成能を持ち、また骨髄の2次コロニー形成能を持つ間葉細胞の多くは神経堤由来であることを明らかにした。

④ 歯髄のコロニー形成細胞は、象牙芽細胞のみならず、軟骨細胞、脂肪細胞、骨芽細胞への分化能を併せ持つことがわかった。コロニーは単一細胞由来である事から歯には脂肪細胞、骨芽細胞や軟骨細胞への多分化能を持つ細胞が存在する事がわかった。一方で骨髄の間葉細胞コロニー形成細胞も軟骨細胞、脂肪細胞、骨芽細胞への分化能を併せ持つことがわかった。

(2)象牙芽細胞に特異的に発現する Dentin sialophosphoprotein(Dspp) 遺伝子座に蛍光蛋白遺伝子を挿入した ES 細胞株の作製と、これらの ES 細胞株を用いたキメラマウスの作製

①象牙芽細胞に特異的に発現すると考えられている dentin sialophosphoprotein (Dspp) の遺伝子の開始コドンの直下に蛍光蛋白である GFP を挿入した遺伝子ベクターを作製した。

②本ベクターを用いて相同組み換え ES 細胞株を得た。

③象牙芽細胞を標識できる ES 細胞株を用いて injection 法によりキメラマウスの作製を行なっている。

(3)中胚葉或いは神経堤由来細胞を標識できるマウス歯髄及び骨髄の間葉系細胞を用いた血液細胞の分化支持能の検討

①骨髄と歯髄の間葉細胞の比較として造血支持能について検討した。まず、造血に関するサイトカインをコードする遺伝子の発現を調べた所、骨髄の間葉細胞のみならず歯髄の間葉細胞も Stem cell factor (SCF)等をコードする遺伝子を発現している事を見いだした。②さらに、歯髄の間葉細胞上で単離した造血幹細胞を培養した所、骨髄の間葉細胞と同様に B 細胞や破骨細胞の分化を支持する事がわかった。従って、歯髄はいろいろな点で骨髄の間葉細胞に類似しており、本結果より造血細胞治療のソースとして有用であることが示唆された。

## 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)

① Methods for investigation of osteoclastogenesis using mouse embryonic stem cells. Tsuneto M, Yamane T, Hayashi S. Methods Mol Biol. (査読有) 690:239-253. (2011)

②医療に関連するトピックス 再生医療と幹細胞 山崎英俊 理学療法ジャーナル 医学書院 (査読無) Vol.44.No8 :682 (2010)

③ Expression of AA4.1 marks lymphohematopoietic progenitors in early mouse development. Yamane T, Hosen N, Yamazaki H, Weissman IL. Proc Natl Acad Sci U S A. (査読有) 106(22): 8953-58 (2009)

④Comparison of osteoclast precursors in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis and osteoporosis patients. Nose M, Yamazaki H, Hagino H, Morio Y, Hayashi S, Teshima R. J Bone Miner Metab. (査読有) 27(1):57-65 (2009)

[学会発表] (計16件)

① Characterization of the earliest hematology progenitors in mouse ontogeny. 山根利之、鷲野亜矢、山崎英俊 第73回日本血液学会学術集会 2011年10月14日 名古屋

② 様々な器官における間葉細胞の由来と神経堤細胞の間葉系幹細胞としての可能性 山崎英俊 (招待講演) 第53回歯科基礎医学会学術大会 サテライトシンポジウム8「神経堤細胞の未知なる可能性：個体発生から再生医療へ」 2011年9月30日 岐阜

③ マウス血液細胞発生過程における因

子依存性 鷺野亜矢、重岡稔章、山崎英俊、山根利之 第33回日本分子生物学会 2010年12月7-10日 神戸

④ Involvement of p38a in blood cells in the regulation of obesity and blood glucose level Sadatugu Ookuma, Takahiro Fujikawa, Kazuto Sugimura, Toshiyuki Yamane, Hidetoshi Yamazaki, Kinya Otsu, Masato Ogata 第33回日本分子生物学会 2010年12月7-10日 神戸

⑤ 神経堤細胞特異的 ALK3 シグナルノックダウンによる顔面形態形成異常の解析 齊藤浩充、山崎英俊、鈴木昇 第33回日本分子生物学会 2010年12月7-10日 神戸

⑥ 歯、胸腺、骨髄の間葉系幹細胞の起源と性状の解析 山崎英俊、磯野加奈、重岡稔章、山根利之 第33回日本分子生物学会 2010年12月7-10日 神戸

⑦ Developmental origin of the earliest hematolymphoid progenitors. Yamane Toshiyuki, Aya Washino, Yamazaki Hidetoshi. 第72回日本血液学会総会 日本血液学会 2010年9月24日 横浜

⑧ Lymphoid lineage potential and developmental origin of the earliest hematopoietic progenitors in mice. Toshiyuki Yamane, Aya Washino, and Hidetoshi Yamazaki. 14<sup>th</sup> International congress of Immunology, Kobe, Japan, 23 August 2010年

⑨ Contribution of neural crest-derived cells and mesoderm-derived cells to the thymic and bone marrow mesenchyme from fetus to adult. Hidetoshi Yamazaki, Toshiyuki Yamane. 14<sup>th</sup> International congress of Immunology, Kobe, Japan, 23 August 2010年

⑩ Developmental origin of the earliest mouse hematolymphoid progenitors. Yamane Toshiyuki, Yamazaki Hidetoshi. 8<sup>th</sup> International Society for Stem cells Research ISSCR. San Francisco, CA USA. 16

Jun, 2010

⑪ 歯胚（歯髄）の間葉系細胞の由来とその性質 山崎英俊、山根利之 第32回日本分子生物学会 2009年12月9-12日 横浜

⑫ Developmental origin of the earliest definitive hematopoietic progenitors. Yamane Toshiyuki, Yamazaki Hidetoshi 第39回日本免疫学会学術集会 2009年12月2-4日 大阪

⑬ Identification and characterization of the earliest hematolymphoid progenitors in mouse development. Yamane Toshiyuki, Yamazaki Hidetoshi 第71回日本血液学会学術集会 2009年10月23-25日 京都

⑭ マウス胚性幹細胞から神経堤様細胞の分化誘導 山崎英俊 第51回日本歯科基礎医学学術大会 2009年9月9-11日 新潟

⑮ 神経堤細胞と器官形成 第11回日本口腔顔面顎外傷学会(招待講演) 山崎英俊 2009年7月18日 札幌

⑯ Induction of neural crest-like cells from murine embryonic stem cells. Yamazaki Hidetoshi, Miyazaki Katsuyuki, Yamane Toshiyuki. 第7回国際幹細胞学会年次集会 2009年8-11, July, スペイン(バルセロナ)

[その他]  
ホームページ等  
[http://www.medic.mie-u.ac.jp/physiol\\_regener/](http://www.medic.mie-u.ac.jp/physiol_regener/)

## 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

川添 真史郎(KAWAZOE SHINJIRO)  
三重大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：30467360

(3)連携研究者 ( )  
研究者番号：