

令和元年6月18日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11664

研究課題名(和文) 転写因子Gli1陽性歯髄幹細胞の象牙質再生に対する機能解析

研究課題名(英文) Roles Gli1-positive dental pulp stem cells during dentin regeneration

研究代表者

細矢 明宏 (Hosoya, Akihiro)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：70350824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄に多分化能を有する組織幹細胞が存在することが知られているが、この細胞の特性ならびに象牙芽細胞への分化機構は不明な点が多い。本研究では、転写因子Gli1を発現する細胞が、完成歯髄の血管周囲に散在性に存在し、高いCFU-F活性と多分化能を有することを明らかにした。また、窩洞形成後の象牙質再生過程において、Gli1陽性細胞が増殖して象牙芽細胞へ分化することを示した。従って、Gli1は歯髄幹細胞のマーカーとして有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の内部にある歯髄という組織に、幹細胞が存在することが知られている。しかしこれまで、どの細胞が幹細胞であるかを指し示すことは出来なかった。本研究では、Gli1という転写因子を発現する歯髄細胞が幹細胞の性質を有し、歯髄損傷後に増殖、分化して、象牙質を再生することが示された。今後、Gli1を指標として歯髄幹細胞の研究が進展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although pluripotent stem cells exist in dental pulp, the characteristics of these cells and the mechanisms of their differentiation into odontoblasts are controversial. In this study, we found that cells expressing the transcription factor Gli1 localized around the blood vessels in the dental pulp of mature mouse molar. In addition, these cells had high CFU-F activity as well as multipotency into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes in vitro. We also showed that Gli1-positive cells proliferate and differentiate into reparative odontoblasts during dentin regeneration after cavity formation. Therefore, these results suggest that Gli1 is a useful marker for dental pulp stem cells in the research of pulp biology.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：Gli1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢社会を迎え、口腔疾患の予防と Quality of Life (QOL) の向上を目指した歯科医療が望まれており、歯科医療に対するニーズも高度化、多様化している。このような状況下において歯の咬合機能を長期にわたって維持させることが益々重要であると考えられ、象牙質・歯髄複合体の保存、保護の重要性が再認識されている。一方、幹細胞研究の進展から、歯髄に多分化能を有する組織幹細胞が存在することが明らかにされ (Gronthos S et al., PNAS 97:13625-30, 2000; Miura M et al., PNAS 100:5807-12, 2003), 象牙質および歯髄再生療法における歯髄幹細胞の応用が検討されている。しかし、歯髄に存在する幹細胞は僅かであり、採取も難しいことから、この細胞の特性ならびに分化機構については不明な点が多い。

Gli1 は形態形成に必須なヘッジホッグシグナリングの下流にある転写因子である。我々は Gli1 陽性細胞が歯髄の血管周囲に局在することを明らかにした。また近年、子孫細胞をラベルする lineage tracing analysis (細胞系譜解析) により、Gli1 陽性歯原性間葉細胞はマウス切歯 (Zhao H et al., Cell Stem Cell 14:160-73, 2014) および臼歯 (Liu Y et al., Development 142:3374-82, 2015) 発生過程において、象牙芽細胞を含む多種類の細胞へ分化することが明らかになった。従って、Gli1 は歯髄幹細胞のマーカー遺伝子として有用であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、Gli1 陽性歯髄細胞の特性を明らかにするため、歯髄における Gli1 陽性細胞の局在ならびに in vitro での幹細胞特性を検討する。また、細胞系譜解析を用い Gli1 陽性歯髄細胞の正常歯髄ならびに象牙質再生時における動態を解析する。これらより、歯髄幹細胞の可視化と、Gli1 陽性歯髄細胞の in vitro ならびに in vivo での分化能を検討することを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

(1) 完成歯の歯髄における Gli1 局在の検討

生後 8 週齢 Gli1-CreERT2; Rosa26-loxP-stop-loxP-Tomato マウスにタモキシフェンを投与し、その 2 日後に上顎第一臼歯を 4%パラホルムアルデヒドで固定した。試料は非脱灰の状態 で凍結し、非脱灰凍結切片法 (川本法: Kawamoto T, Arch Histol Cytol 66:123-43, 2003; Hosoya A et al., Histochem Cell Biol 123:639-46, 2005) で厚さ 5 μ m の連続切片を作製した。Tomato (赤色) 蛍光の発現から Gli1 陽性細胞の局在を検討するとともに、血管内皮細胞のマーカー-Endomucin, 増殖細胞マーカー-Ki67 を発現する細胞との関係性を評価した。

(2) 歯根形成期歯胚ならびに完成歯の歯髄における Gli1 局在と細胞系譜解析

生後 2 および 8 週齢 Gli1-CreERT2; Rosa26-loxP-stop-loxP-Tomato マウスにタモキシフェンを投与し、2-28 日後に方法(1)と同様の検討を行った。

(3) 完成歯の歯髄における Gli1 陽性細胞の in vitro での分化能

生後 8 週齢 Gli1-CreERT2; Rosa26-loxP-stop-loxP-Tomato マウスにタモキシフェンを投与し、2 日後の上顎第一臼歯から歯髄組織を採取した。歯髄組織を 37 でコラゲナーゼとトリプシンに 30 分作用させ、歯髄の細胞を採取した。STEMCELL Technologies 社製 MesenCult Expansion Kit を用い、プロトコルに従いコロニー形成ユニット線維芽細胞 (CFU-F) アッセイを行った。また、増殖させた細胞を骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化誘導した。分化の

評価は、それぞれアルカリホスファターゼ、アルシアンブルー、オイルレッド染色で行った。

(4) 窩洞形成後における Gli1 陽性細胞の機能

生後 8 週齢 Gli1-CreERT2; Rosa26-loxP-stop-loxP-Tomato マウスにタモキシフェンを投与し、2 日後に上顎第一臼歯近心面に象牙質窩洞を形成した。術後、0-7 日後に 4%パラホルムアルデヒドで固定し、Gli1 陽性細胞とその子孫細胞の分布を評価した。

4. 研究成果

(1) 完成歯の歯髄における Gli1 発現細胞の局在

生後 8 週齢臼歯の歯髄において、Gli1-Tomato 発現細胞は血管周囲に散在性に認められた。Endomucin は血管内皮細胞で陽性であったが、Gli1 発現細胞は Endomucin と共局在を示さずに、ほぼ接する状態で分布していた。Ki67 陽性の増殖細胞は、歯髄ではほとんど認められず、Gli1 陽性細胞とも共局在は示さなかった。

(2) 歯根形成期歯胚ならびに完成歯の歯髄における Gli1 陽性細胞の分化能

歯根形成期である生後 2 週齢の歯髄（タモキシフェン投与後 2 日）においても、8 週齢と同様に Endomucin 陽性の血管周囲に Gli1 陽性細胞の局在が認められた。Gli1 陽性細胞のほとんどは Ki67 陰性であったが、一部に Ki67 と共局在を示す細胞も存在した。観察期間を長くすると、経時的に Gli1 陽性細胞の子孫細胞であることを示す Tomato 陽性細胞は数を増した。これらの細胞の多くは Ki67 陽性を示した。タモキシフェン投与後 14-28 日では、根尖部の象牙芽細胞も Tomato 陽性であった。このことから、歯根形成期歯胚の歯髄にみられる Gli1 陽性細胞は、一部が増殖しており、歯髄線維芽細胞や象牙芽細胞へ分化することが明らかとなった。

次に完成歯歯髄として 8 週齢マウスにおける Gli1 陽性細胞の動態を検討した。Gli1 陽性細胞は 2 週齢マウス歯髄と同様に血管周囲に散在性に局在していた。しかしこれらの細胞は、観察期間を長くしてもほとんど数を変えず、Ki67 も陰性であった。従って、8 週齢マウス完成歯の歯髄に存在する Gli1 陽性細胞は、ほぼ静止状態であることが示された。

(3) 完成歯の歯髄における Gli1 陽性細胞の幹細胞特性

採取した歯髄細胞を幹細胞増殖培地で培養したところ、5-7 日で円形のコロニー形成を認めた。これらコロニーのほとんどは Tomato 陽性細胞で構成されていたことから、Gli1 陽性歯髄細胞は高い CFU-F 活性を有することが示された。次に、幹細胞増殖培地で増殖させた細胞を採取し、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化誘導した。使用した細胞は Tomato 陽性と陰性細胞を含んでいたが、陽性細胞のみ骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化した。一方、陰性細胞は多分化能を有さなかった。これらから、Gli1 陽性歯髄細胞は、幹細胞特性を有することが明らかとなった。

(4) 象牙質再生に対する Gli1 陽性細胞の機能

窩洞形成後 3 日の歯髄において、多数の Gli1-Tomato と Ki67 共陽性を示す細胞が認められた。この Tomato 陽性細胞は経時的に数を増し、7 日後では窩洞直下のほとんどの細胞が Tomato 陽性であった。また、修復象牙質を形成する再生象牙芽細胞の全ては Tomato 陽性であった。

以上の結果から、歯髄の Gli1 陽性細胞は血管周囲に分布し、in vitro で幹細胞特性を示すことが明らかとなった。また、窩洞形成後の象牙質再生過程において、象牙芽細胞へ分化するこ

とが示された。従って, Gli1 は歯髄幹細胞のマーカーとして pulp biology 研究ならびに歯髄再生研究領域において有用であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Nagako Yoshiba, Naoki Edanami, Aiko Tohma, Ryosuke Takeuchi, Naoto Ohkura, Akihiro Hosoya, Yuichiro Noiri, Hiroaki Nakamura, Kunihiko Yoshiba. (2018) Detection of bone marrow-derived fibrocytes in human dental pulp repair. Int Endod J 51(11):1187-1195. 査読有

Kanji Horibe, Akihiro Hosoya, Toru Hiraga, Hiroaki Nakamura (2018) Expression and localization of CRAMP in rat tooth germ and during reparative dentin formation. Clin Oral Invest 22(7):2559-2566. 査読有

Makoto Tanaka, Akihiro Hosoya, Hiroshi Mori, Ryoji Kayasuga, Hiroaki Nakamura, Hidehiro Ozawa (2018) Minodronic acid induces morphological changes in osteoclasts at bone resorption sites and reaches a level required for antagonism of purinergic P2X2/3 receptors. J Bone Miner Metab 36(1):54-63. 査読有

Michiko Nakatsuka, Akihiro Hosoya, Koichiro Jin, Ji-Youn Kim, Satoshi Fujita, Hironori Akiyama, Shoko Gamoh, Shunji Kumabe (2017) Induced differentiation of rat periodontal ligament-derived cells using growth factor cocktail. J Dent Oral Health 3(9):96. 査読有

Yuko Nakamichi, Nobuyuki Udagawa, Kanji Horibe, Toshihide Mizoguchi, Yoko Yamamoto, Takashi Nakamura, Akihiro Hosoya, Shigeaki Kato, Tatsuo Suda, Naoyuki Takahashi (2017) Vitamin D treatment increases bone mass through VDR in osteoblast-lineage cells. J Bone Miner Res 32(6):1297-1308. 査読有

Akihiro Hosoya, Akira Takahama, Hiroaki Nakamura (2017) Localization of RELM-β/FIZZ2 is associated with cementum formation. Anat Rec 300(10):1865-1874. 査読有

Akira Yukita, Miroku Hara, Akihiro Hosoya, Hiroaki Nakamura (2017) Relationship between localization of proteoglycans and induction of neurotrophic factors in mouse dental pulp. J Oral Biosci 59(1):31-37. 査読有

Yoshimi Shigetani, Naoto Ohkura, Kunihiko Yoshiba, Hayato Ohshima, Akihiro Hosoya, Nagako Yoshiba, Takashi Okiji (2016) GaAlAs laser-induced pulp mineralization involves DMP1 and osteopontin expression. Oral Dis 22(5):399-405. 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

Shalehin Nazmus , Akihiro Hosoya , Hiroaki Takebe , Hasan MD Riasat , Kazuharu Irie 「Potential of Gli1-positive cells in periodontal ligament to regenerate alveolar bone」第 124 回日本解剖学会総会全国学術集会 2019 年 3 月 27 日 新潟市

建部廣明, 細矢明宏, Shalehin Nazmus , Hasan MD Riasat , 入江一元 「軟骨内骨化過程におけるポリコーム群タンパク質 Bmi1 の局在」第 124 回日本解剖学会総会全国学術集会 2019 年 3 月 27 日 新潟市

趙 麗娟、荒井 敦、堀部寛治、楊 孟雨、細矢明宏、小林泰浩、宇田川信之、高橋直之、溝口利英 「象牙芽細胞の枯渇は修復象牙質を誘導する」第 58 回歯科基礎医学会学術大会 平成 30 年 7 月 27 日 長崎市

Shalehin Nazmus, Hasan MD Riasat, 建部廣明, 細矢明宏, 入江一元 「Boric acid inhibits alveolar bone loss in rat experimental periodontitis」北海道医療大学歯学会第 36 回学術大会, 平成 30 年 3 月 17 日 札幌市

細矢明宏, 建部廣明, 入江一元 「象牙芽細胞分化におけるポリコーム群タンパク質 Bmi1 の役割」北海道医療大学歯学会第 36 回学術大会, 平成 30 年 3 月 17 日 札幌市

小野亜美、細矢明宏、中村浩彰 「歯の発生過程における DMP-1, DSP, FAM20C の局在」第 58 回歯科基礎医学会学術大会 平成 29 年 9 月 18 日 塩尻市

Shalehin Nazmus, Hasan MD Riasat, 建部廣明, 細矢明宏, 入江一元 「歯周炎による骨吸収へのホウ酸の効果」第 58 回歯科基礎医学会学術大会 平成 29 年 9 月 17 日 塩尻市

雪田 聡、二宮 禎、細矢明宏、中村浩彰 「ケモカイン CCL25 投与が乳幼児期マウス骨形成に与える影響」第 58 回歯科基礎医学会学術大会 平成 29 年 9 月 18 日 塩尻市

Hasan MD Riasat, Shalehin Nazmus, 建部廣明, 細矢明宏, 入江一元 「エナメルマトリックスタンパクによる歯周組織再生」第 58 回歯科基礎医学会学術大会 平成 29 年 9 月 17 日 塩尻市

細矢明宏、吉羽邦彦、吉羽永子、鷲尾絢子、諸富孝彦、北村知昭、山本昭夫、中村浩彰 「象牙芽細胞分化におけるポリコーム群タンパク質 Bmi1 の機能」第 145 回日本歯科保存学会秋期学術集会 平成 28 年 10 月 28 日 松本市

中塚美智子、細矢明宏、隈部俊二、田村 功 「スフェロイド形成による骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化誘導」第 58 回歯科基礎医学会学術大会 平成 28 年 8 月 26 日 札幌市

二宮 禎、細矢明宏、中村浩彰 「抜歯痕修復における間葉系幹細胞の CD91 の機能的役割」第 58 回歯科基礎医学会学術大会 平成 28 年 8 月 25 日 札幌市

二宮 禎、細矢明宏 「骨髄間葉系細胞における CD91 の機能的役割」第 34 回日本骨代謝学会学術集会 平成 28 年 7 月 21 日 大阪

中道裕子、溝口利英、山本陽子、中村貴、細矢明宏、堀部寛治、原田卓、斎藤一史、加藤茂明、須田立雄、宇田川信之、高橋直之「ビタミン D の骨量増加の薬理作用は、破骨細胞ではなく骨芽細胞の VDR を介する」第 34 回日本骨代謝学会学術集会 平成 28 年 7 月 21 日 大阪市

Nagako Yoshiba, Kunihiko Yoshiba, Naoto Ohkura, Naoki Edanami, Ryosuke Takeuchi, Aiko Tohma, Akihiro Hosoya, Hiroaki Nakamura, Takashi Okiji 「Fibrillin-1 microfibrils influence human dental pulp regeneration」IADR Pulp Biology Regeneration Group Symposium 2016 平成 28 年 6 月 28 日 Nagoya, Japan

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中村 浩彰

ローマ字氏名：NAKAMURA, Hiroaki

所属研究機関名：松本歯科大学

部局名：歯学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：50227930

研究分担者氏名：平賀 徹
ローマ字氏名：HIRAGA, Toru
所属研究機関名：松本歯科大学
部局名：歯学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：70322170

研究分担者氏名：吉羽 邦彦
ローマ字氏名：YOSHIBA, Kunihiko
所属研究機関名：新潟大学
部局名：医歯学系
職名：教授
研究者番号（8桁）：30220718

研究分担者氏名：溝口 利英
ローマ字氏名：MIZOGUCHI, Toshihide
所属研究機関名：東京歯科大学
部局名：歯学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：90329475

研究分担者氏名：建部 廣明
ローマ字氏名：TAKEBE, Hiroaki
所属研究機関名：北海道医療大学
部局名：歯学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：40638293

研究分担者氏名：入江 一元
ローマ字氏名：IRIE, Kazuharu
所属研究機関名：北海道医療大学
部局名：歯学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：70223352

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、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。