

平成30年 5月25日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20549

研究課題名(和文) 歯髄誘導因子の同定および微小環境再構築による歯髄再生

研究課題名(英文) EDTA soluble chemical components and the conditioned medium from mobilized dental pulp stem cells (MDPSCs) contain inductive microenvironment

研究代表者

林 勇輝 (Hayashi, Yuki)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：10756547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄再生に効果がある化学的微小環境を検討した結果、以下の結論を得た。塩酸、ゲアニジン塩酸、EDTAにて段階的に処理後にEDTA処理をすることで歯髄再生能、血管新生能および象牙芽細胞数が著しく減少したことから、歯髄再生に関与する化学的微小環境はEDTA抽出液に含まれることが示唆された。歯髄幹細胞培養上清にて歯髄組織再生、血管新生、歯髄マーカーの発現を認めたことから、歯髄幹細胞培養上清内には歯髄再生に関与する化学的微小環境が含まれることが示唆された。EDTA抽出液だけでは歯髄は再生しなかったが、EDTA抽出液と歯髄幹細胞培養上清の両方を付着させることで、歯髄再生能を向上させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Expression of an odontoblastic marker, enamelysin, and a pulp marker, thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme (TRH-DE), was lower, and expression of a periodontal cell marker, anti-aspurin/periodontal ligament-associated protein 1 (PLAP-1), was higher in the transplant of the EDTA-extracted teeth compared with the GdnHCl-extracted teeth. The autoclaved teeth reconstituted with the GdnHCl extracts or the EDTA extracts have weak regenerative potential and minimal angiogenic potential, and the CM significantly increased this potential. Combinatorial effects of the EDTA extracts and the CM on pulp/dentin regeneration were demonstrated in vivo, consistent with their in-vitro effects on enhanced proliferation, migration, and odontoblastic differentiation.

研究分野：再生歯学

キーワード：歯髄再生 微小環境 幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

組織の初期発生、損傷時の修復および再生時には生物学的に複雑なメカニズムが存在する。現在、組織工学および組織再生の三要素として、幹細胞、成長因子、足場/微小環境の組合せが重要と考えられている¹⁾。間葉系幹細胞 (MSCs) は生理活性因子を分泌し、損傷を受けた細胞に直接的または間接的に効果を示すことが報告されている^{2,3)}。MSCs から分泌されるサイトカイン、炎症性メディエーター、細胞外基質と抗菌性タンパク質は、組織修復のために適切な微小環境を生み出す⁴⁾。これまでに、脳梗塞モデル、下肢虚血モデル、異所性歯根移植または抜髄後歯髄再生モデルにおいて歯髄・骨髄・脂肪のいずれの細胞を移植しても同様な歯髄組織が再生することが示されている^{5,6)}。また、歯髄・骨髄・脂肪幹細胞培養上清 (CM) を異所性歯根移植モデルに添加した場合も、歯髄組織が再生することもわかってきた⁷⁾。これらの報告の中で、再生組織は移植細胞の由来組織には依存しないことが示唆された。細胞の様々な挙動は、物理的要因と化学的要因による周囲の微小環境によって制御されている^{8,9)}。幹細胞の運命も、可溶性因子、あるいは多くの固有可溶性因子による不溶性マトリックスの複合体に影響され、周囲の微小環境によって管理されているが¹⁰⁾、その詳細なメカニズムは明らかではない。

可撤性義歯および歯科用インプラントによる補綴治療が歯の欠損に対して行われてきた。現在、組織工学による再生歯の開発が試みられている。これまでの研究^{5,7,12,13)}では、移植細胞由来に関わらず、細胞移植した根管内に歯髄が再生してくることから象牙質自体が象牙質/歯髄複合体再生のために必要な微小環境であることを示唆している。しかし、象牙質に含まれ、歯髄再生に関与する化学的要因はまだ解明されていない。したがって本研究では、歯の微小環境構成因子の抽出方法の検討を目的に以下の実験を行った。はじめに、遊走歯髄膜分取幹細胞 (mobilized dental pulp stem cells, MDPSCs) による異所性歯根移植モデルを用いて、塩酸、グアニジン塩酸、EDTA の順に歯根処理した時の象牙質/歯髄再生能を検討した。次に、オートクレーブ処理し化学微小環境を失活させ物理的微小環境のみとした歯根に、それぞれの抽出した因子を再結合させた時の MDPSCs の象牙質/歯髄再生能を評価した。

2. 研究の目的

再生組織の特異性は移植細胞の組織に由来するのではなく、移植部位の微小環境に依存する事が知られている。間葉系幹細胞の分化は、物理的および化学的微小環境により制御される。歯髄の化学的微小環境はグアニジン塩酸および EDTA により抽出できることが示唆されている。しかし、歯髄を誘導する因子は明らかにされていない。したがって本研究は、歯髄の化学的微小環境を構成する歯髄誘導因子を同定し、さらに物理的微小環境とともに再構築することにより歯髄を再生することを目的とする。

3. 研究の方法

全ての動物実験は愛知学院大学歯学部、動物実験倫理委員会の承認 (承認番号: AGUD156) を得て行われた。

1. ブタ歯髄幹細胞分取と上清調整

ブタ歯髄幹細胞は Murakami ら¹³⁾の方法によって、下顎側切歯より酵素消化法により分取した。

50%コンフルエント時に無血清培地に交換、24 時間後に、培養上清液 (CM) として回収した。その上清を終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ に濃縮した。

2. ブタ歯根の化学的微小環境抽出処理

0.6M 塩酸、グアニジン塩酸¹⁴⁾、EDTA¹⁵⁾ の順で、1 週間ずつ各液に切断した歯根を浸漬し、各段階の処理歯根を作製した。

3. マウス異所性歯根移植モデルによる再生組織解析

1) 異所性歯根移植モデル

Ishizaka ら⁶⁾の方法に基づき、*in vivo*における未処理歯根及び、各処理歯根における歯髄再生能を検討するために異所性歯根移植モデルを作製した。

2) 再生組織量の解析

Hematoxylin-Eosin (HE) 染色後、各移植歯根の再生歯髄量を、実体顕微鏡で歯の全体画像を取得した。

3) 細胞密度解析

再生歯髄における細胞密度は、Hoechst 33342核染色を行った。

4) 血管新生の解析

移植28日後の血管新生は、マウス抗RECA 1を用いた免疫染色によって観察した。

5) 歯髄・象牙質複合体の再生

移植 28 日目において、歯髄マーカー thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme (TRH-DE) の発現を *in situ* hybridization と、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。各歯根移植 28 日後の再生組織における、歯髄マーカー TRH-DE の mRNA 発現を real time RT-PCR をにて解析した。

再生歯髄細胞の象牙芽細胞への分化を解析するために、*enamelysin* に対するプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。再生組織中の歯根膜マーカーが発現しているか免疫染色にて観察した。移植28日後の試料を用いて、ウサギ抗 PLAP-1を用いた免疫染色を行った。

4. 移植歯根の化学的微小環境の再構築

未処理歯根を 121°C 、2 気圧にてオートクレーブ処理を行い、化学的微小環境因子を失活させ、前述した EDTA 抽出液、上清、およびその混合液を凍結乾燥処理後に、オートクレーブ処理した歯根に付着させ、EDTA 付着歯根、上清付着歯根および混合液付着歯根を作製した。

5. 統計学的解析

データは平均 \pm 標準偏差で表した。統計処理には一元配置分散分析および多重比較テスト (Tukey法) を用い、統計学的有意差は危険率 5% で判定した。なお、統計学的分析には統計解析ソフト SPSS ver21.0® (IBM, NY,

USA)を用いた。

4. 研究成果

1. 各処理歯根による歯髄、象牙芽細胞再生能

SCID マウスに対し歯髄幹細胞を各処理歯根を異所性移植した際の歯髄再生能を比較した。28 日後には新生血管に富む歯髄様組織の再生が未処理歯根内に認められた (図 1 A, E)。塩酸、グアニジン塩酸、EDTA 処理歯根では未処理歯根と比べ疎な歯髄様組織の再生が認められた (図 1 B-D, F-H)。次に、移植 28 日後の再生組織を組織学的に解析すると、各処理歯根の歯髄組織再生量は、未処理歯根より有意に少なかった (図 1 I)。塩酸処理歯根とグアニジン塩酸処理歯根の間では組織再生量に有意差は認められなかった。しかし、EDTA 処理を行うことで組織再生量がさらに有意に減少することが認められた (図 1 I)。再生組織内において Hoechst 33342 陽性細胞数は未処理歯根 (図 1 J) と比較して、グアニジン塩酸処理歯根および EDTA 処理歯根では有意に少なかった (図 1 K-M)。細胞移植後 28 日の再生組織を RECA 1 抗体にて観察したところ、全ての再生組織中に RECA 1 陽性細胞を認めた (図 1 O-R)。そこで、血管新生密度を組織学的に測定すると、未処理歯根は各処理歯根より有意に血管新生量が多いことが認められた。また、塩酸処理歯根とグアニジン塩酸処理歯根の間では血管新生量の有意差は認められなかった。しかし、EDTA 処理を行うことで血管新生量が有意に減少した (図 1 S)。

移植後 28 日の再生組織において、歯髄マーカー TRH-DE の mRNA 発現を *in situ* hybridization で観察したところ、未処理歯根、塩酸処理歯根およびグアニジン塩酸処理歯根の再生組織にその発現が認められたが、EDTA 処理歯根の再生組織にその発現は認められなかった (図 2 A-D)。次に、再生組織より RNA を抽出し、歯髄マーカー TRH-DE による real-time RT-PCR を行ったところ、再生組織における発現量は未処理歯根、塩酸処理歯根、グアニジン塩酸処理歯根間で同等に認められたが、EDTA 処理歯根では発現が認められなかった (表 1)。

表 1 異所性歯根移植 28 日後の再生歯髄と正常歯髄の TRH-DE 発現量の比較

処理	TRH-DE
Non treated	1.0±0.1
HCl	0.8±0.2
EDTA	0.9±0.2
正常	0

組織学的に未処理歯根、塩酸処理歯根およびグアニジン塩酸処理歯根の再生組織を観察すると、根管壁に並列した象牙芽細胞様細胞が *Enamelysin* を発現し、突起が細管内に伸長していた (図 2 E-G)。しかし、EDTA 処理歯根において *Enamelysin* の発現は認められなかった (図 2 H)。*Enamelysin* 陽性細胞数は、未処理歯根、塩酸処理歯根およびグアニジン塩酸処理歯根間において有意差は認められなかったが、EDTA 処理との間において有意に減少した (図 2 I)。細胞移植後 28 日の再生組織を PLAP-1、periostin による歯根膜マーカーにて観察したところ、未処理歯根と塩酸処理歯根間での PLAP-1 陽性細胞率において有意差は無かったが、グアニジン塩酸処理歯根では、未処理歯根と塩酸処理歯根

と比べ、有意に PLAP-1 陽性細胞率が高かった (図 2 J-R)。また、EDTA 処理歯根では、他の移植歯根より PLAP-1 陽性細胞率が有意に高かった (図 2 N)。

2. 化学的微小環境を再構築させた移植歯根の歯髄再生能

歯髄幹細胞の歯髄再生能を比較するために、オートクレーブ処理歯根、EDTA 抽出液付着歯根、上清付着歯根、および混合液付着歯根を異所性に移植した。28 日後にてオートクレーブ処理歯根、EDTA 抽出液付着歯根において歯髄様組織の再生は認められなかった (図 3 A, B, E, F)。上清付着歯根では未処理歯根と比べ疎な歯髄様組織の再生が認められた (図 3 C, G)。混合液付着歯根では上清付着歯根と比べ、歯髄様組織の再生量が有意に多かった。(図 3 D, H) 移植 28 日後の再生組織を組織学的に観察すると、混合液付着歯根での歯髄組織再生量は、上清付着歯根より有意に多かった (図 3 I)。再生組織内における Hoechst 33342 陽性細胞数は、オートクレーブ処理歯根、EDTA 抽出液付着歯根および上清付着歯根では未処理歯根と比較して有意に少なかったが、混合液付着歯根と未処理歯根の間では有意な差が認められなかった (図 3 J-N)。細胞移植後 28 日の血管新生を RECA 1 抗体にて観察したところ、オートクレーブ処理歯根および EDTA 付着歯根には再生組織中に RECA 1 抗体陽性細胞が認められなかったが、上清付着歯根および混合液付着歯根においてその陽性細胞は観察された (図 3 O-R)。血管新生密度を組織学的に測定すると、未処理歯根は各付着歯根より有意に高く、上清付着歯根と混合液付着歯根において血管新生量の有意差は認められなかった。(図 3 S) 移植後 28 日の再生組織において、歯髄マーカー TRH-DE の mRNA 発現を *in situ* hybridization で観察したところ、オートクレーブ処理歯根および EDTA 抽出液付着歯根内には発現は認められなかったが、上清付着歯根および混合液付着歯根の再生組織に発現が認められた (図 4 A-D)。さらに、再生組織より RNA を抽出し、歯髄マーカー TRH-DE による real-time RT-PCR を行ったところ、再生組織における発現量は上清付着歯根および混合液付着歯根で正常歯髄と同等であった (表 2)。

表 2 異所性歯根移植 28 日後の再生歯髄と正常歯髄の TRH-DE 発現量の比較

処理	TRH-DE
Non treated	0
HCl	0.8±0.3
EDTA	1.0±0.3

オートクレーブ処理歯根、EDTA 抽出液付着歯根において、*Enamelysin* の発現は認められなかった (図 4 E, F)。しかし、上清付着歯根、混合液付着歯根の再生組織の根管壁に並列した象牙芽細胞様細胞は *Enamelysin* を発現し、突起を細管内に伸長させていた (図 4 G, H)。未処理歯根と比較して、上清付着歯根における *Enamelysin* 陽性細胞数は有意に少なかった (図 4 I)。一方で、混合液付着歯根における陽性細胞数は上清付着歯根より有意に多く、未処理歯根との有意差は認められなかった (図 4 I)。上清付着歯根における PLAP-1 陽性細胞率は、未処理歯根より有意に高く、混合液付着歯根の PLAP-1 陽性細胞率は、上清付着歯根と比べ有意に低く、未

処理歯根との有意差は認められなかった (図4J-R)。

文 献

- 1) Khademhosseini A, Karp J.M, Nir GS, Ferreira L, Annabi N, Sirabella D, Novakovic VG, Langer R: Embryonic Stem Cells as a Cell Source for Tissue Engineering. Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition, 609-638, 2014.
- 2) Caplan AI, Dennis JE: Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry* 98:1076–1084, 2006.
- 3) Maumus M, Guérit D, Toupet K, Jorgensen C, Noël D: Mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: applications in rheumatology. *Stem Cell Research and Therapy* 2 (2), 14, 2011.
- 4) Yu B, Zhang X, Li X.: Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 15 (3): 4142-4157, 2014
- 5) Ishizaka R, Iohara K, Murakami M, Fukuta O, Nakashima M: Regeneration of dental pulp following pulpectomy by fractionated stem/progenitor cells from bone marrow and adipose tissue. *Biomaterials*, 33:2109-2118, 2012.
- 6) Ishizaka R, Hayashi Y, Iohara K, Sugiyama M, Murakami M, Yamamoto T, Fukuta O, Nakashima M: Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp. *Biomaterials*, 34:1888-1898, 2013.
- 7) Hayashi Y, Murakami M, Kawamura R, Ishizaka R, Fukuta O, Nakashima M: CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and angiogenesis leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 6 (6), 111, 2015.
- 8) Guvendiren M, Burdick JA: The control of stem cell morphology and differentiation by hydrogel surface wrinkles. *Biomaterials*, 31 6511-6518, 2010.
- 9) Li H, Fu X: Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell Tissue Res*, 348, 371–377, 2012.
- 10) Tenney RM, Discher DE: Stem cells, microenvironment mechanics, and growth factor activation. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 630–635, 2009
- 11) Lei M, Li K, Li B, Gao L-N, Chen F-M, Jin Y: Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. *Biomaterials*, 35 (24), 6332-6343 2014.
- 12) Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S: The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 8 (3), 191-199, 2005
- 13) Murakami M, Horibe H, Iohara K, Hayashi Y, Osako Y, Takei Y, Nakata K, Motoyama N, Kurita K, Nakashima M: The use of granulocyte-colony stimulating factor induced mobilization for isolation of dental pulp stem cells with high regenerative potential. *Biomaterials* 34 9036-9047, 2013.
- 14) Takata T, Errico JAD, Atkins KB, Berry JE, Strayhorn C, Taichman RS, Somerman MJ: Protein Extracts of Dentin Affect Proliferation and Differentiation of Osteoprogenitor Cells In Vitro. *J Periodontol* ; 69: 1247-1255, 1998.
- 15) Sodek KL, Tupy JH, Sodek J, Grynpus MD: Relationships between bone protein and mineral in developing porcine long bone and calvaria. *Bone* 26, 189 –198, 2000.
- 16) Linde A, Bhowm M, Butler WT: Noncollagenous protein of dentin. *The Journal of Biological Chemistry*, 255, 12, 25, 5931-5942, 1980.
- 17) Butler WT: Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci*, 106 ,204-210, 1998.
- 18) Prasad M, Butler WT, Qin C: Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connective Tissue Research*, 51:5, 404-417, 2010.
- 19) Yamamoto R, Oida S, Yamakoshi Y: Dentin Sialophosphoprotein-derived Proteins in the Dental Pulp. *Journal of Dental Research* , Vol. 94(8) 1120–1127, 2015.
- 20) Wu L, Zhu F, Wu Y, Lin Y, Nie X, Jing W, Qiao J, Liu L, Tang W, Zheng X, Tian W: Dentin Sialophosphoprotein-Promoted Mineralization and Expression of Odontogenic Genes in Adipose-Derived Stromal Cells. *Cells Tissues Organs*, 187, 103–112, 2008.
- 21) Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Müller R, Goldberg M, Kulkarni AB: Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biology* 28, 221–229, 2009.
- 22) Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K: Acceleration Effect of Human Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2 on Differentiation of Human Pulp Cells Into Odontoblasts. *Journal of Endodontics*, 30, 4, 205-208, 2004.
- 23) Boskey A, Spevak L, Tan M, Doty SB, Butler WT, Dentin Sialoprotein (DSP) Has Limited Effects on In Vitro Apatite Formation and Growth *Calcif Tissue Int*, 67:472–478, 2000.
- 24) Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J,

Simmer J, Macdougall M: Investigation of Osteocalcin, Osteonectin, and Dentin Sialophosphoprotein in Developing Human Teeth. *Bone* Vol. 30, No. 2, 377–385, 2002.

25) Lesot H, Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Mitolo V, Ruch JV. Epigenetic Signals during Odontoblast Differentiation. *Adv Dent Res* 15:8-13, 2001.

26) Bagutti C, Hutter C, Chiquet-Ehrismann R, Fassler R, Watt FM: Dermal Fibroblast-Derived Growth Factors Restore the Ability of $\beta 1$ Integrin-Deficient Embryonal Stem Cells to Differentiate into Keratinocytes. *Developmental Biology*, 231, 321–333, 2001.

27) Horibe H, Murakami M, Iohara K, Hayashi Y, Takeuchi N, Takei Y, Kurita K, Nakashima M: Isolation of a stable subpopulation of Mobilized Dental Pulp Stem Cells (MDPSCs) with high proliferation, migration, and regeneration potential is independent of age. *PLoS ONE*, Volume 9, Issue 5, e98553, 2014.

28) Bronckaers A, Hilkens P, Fanton Y, Struys T, Gervois P, Politis C, Martens W, Lambrechts I: Angiogenic Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *PLoS ONE*, 8, (8), 2013.

29) HUNG S-C, POCHAMPALLY RR, CHEN S-C, HSU S-C, PROCKOP DJ: Angiogenic Effects of Human Multipotent Stromal Cell Conditioned Medium Activate the PI3K-Akt Pathway in Hypoxic Endothelial Cells to Inhibit Apoptosis, Increase Survival, and Stimulate Angiogenesis. *STEM CELLS* ; 25: 2363–2370, 20087

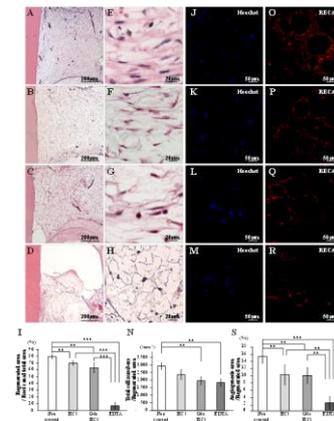
30) Kim NR, Lee DH, Ahn S-J, Lee I-S, Yang H-C: The differentiation-inducing effect of conditioned media obtained from dental pulp cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 107:e54-e59, 2009.

31) Nakao K, Itoh M, Tomita Y, Tomooka Y, Tsuji T: FGF-2 potently induces both proliferation and DSP expression in collagen type I gel cultures of adult incisor immature pulp cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325, 1052–1059, 2004.

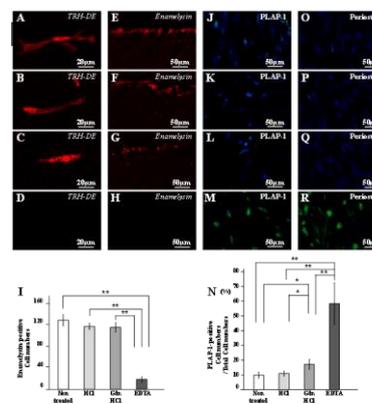
32) Li TX, Yuan J, Chen Y, Pan LJ, Song C, Bi LJ, Jiao XH: Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Human Umbilical Cord Tissue into Odontoblast-Like Cells Using the Conditioned Medium of Tooth Germ Cells In Vitro. *BioMed Research International*, Article ID 218543, 10, 2013.

33) Lai RC, Tan SS, The BJ, Sze SK, Arslan F, Kleijn DP, Choo A, Lim SK: Proteolytic Potential of the MSC Exosome Proteome: Implications for an Exosome-Mediated Delivery of

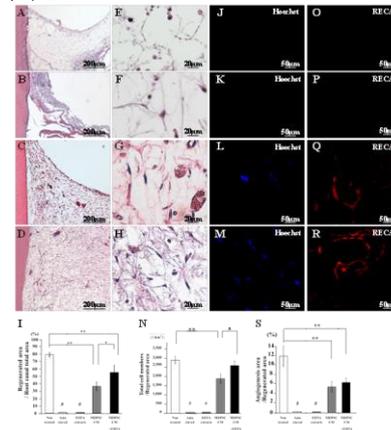
☒ 1



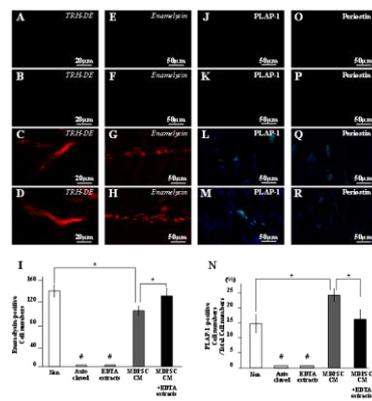
☒ 2



☒ 3



☒ 4



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 1 件)

1. EDTA soluble chemical components and the conditioned medium from mobilized dental pulp stem cells contain an inductive microenvironment, promoting cell proliferation, migration, and odontoblastic differentiation. Kawamura R, Hayashi Y, Murakami H, Nakashima M.

Stem Cell Res Ther. (査読あり) 2016; 7: 77. doi:10.1186/s13287-016-0334-z

[学会発表] (計 2 件)

1. 第 10 回アジア小児歯科学会 2016. 5. 26 東京ドームホテル (東京都文京区)

2. 第 17 回外傷歯学会 2017. 7 月. 9 日. 愛知学院大学 (愛知県千種区)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 勇輝 (Yuki, Hayashi) 愛知学院大学
歯学部 助教

研究者番号:

10756547

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()