

平成 31 年 3 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06731

研究課題名(和文) ヒト歯髄細胞のドナー個体差を利用した脊髄損傷治療の研究

研究課題名(英文) Study of FGF2 Responsive Genes in human Dental Pulp Cells Facilitating Recovery in a Spinal Cord Injury Model

研究代表者

杉山 健 (Ken, Sugiyama)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30802673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、脊髄完全切断モデルラットにFGF2(塩基性線維芽細胞増殖因子)で処理したhDPCs(ヒト歯髄細胞)を移植し、損傷後の機能回復効果について報告した。しかしながら、hDPCsに対するFGF2の作用機構及び各hDPCs間の回復効果の差については不明のままであった。本研究では、豊富な歯髄細胞バンクを背景として、脊髄損傷後の治療効果においてドナー間に明らかな違いがあること、すなわち移植後の治療効果にドナー個体差が存在することを確認し、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析から、損傷後の回復効果及びFGF2処理と関連する応答性遺伝子を検討した。

研究成果の概要(英文)：The central nervous system in adult mammals does not heal spontaneously after spinal cord injury (SCI). We recently reported that FGF2-pretreated human dental pulp cells (hDPCs) can improve recovery in a rat model of SCI. This study aimed to investigate mechanisms underlying the curative effect of SCI enhanced via FGF2 pretreatment; we selected three hDPC lines upon screening for the presence of mesenchymal stem cell markers and of their functionality in a rat model of SCI. We identified FGF2-responsive genes via gene expression analyses in these lines. FGF2 treatment upregulated GABRB1, MMP1, and DRD2, which suggested to contribute to SCI or central the nervous system. In an expanded screening of additional lines, GABRB1 displayed rather unique and interesting behavior; two lines with the lowest sensitivity of GABRB1 to FGF2 treatment displayed an extremely minor effect in the SCI model.

研究分野：歯学

キーワード：ヒト歯髄細胞 FGF2 脊髄損傷 GABRB1

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに今後の再生医療への貢献を目的に、医療廃棄物として処理されていた抜歯後の智歯より 200 ライン以上のヒト歯髄細胞(human Dental Pulp Cell : hDPC)を樹立し、hDPCs の高い増殖能、低酸素や Chemicaldefined された環境での培養、iPS 細胞への誘導など、再生医療資源としての有用性を報告してきた(文献 1, 2, 3, 4)。また、近年、共同研究者である岐阜薬科大学の福光先生らのグループによって、脊髄完全切断モデルラットにおいて FGF2 処理した DPC を移植後、機能回復効果を認めたことが報告がされた(文献 5)。これまでの研究報告にて iPS 誘導効率において若年者と高齢者の DPC で違いがあることが分かっており(文献 4)、我々はドナーの違いで脊髄損傷モデルラットへの回復効果について差が存在するのかどうかについて着目した。またドナー個体差が存在すれば、この「個体差」を解析する事が、脊髄損傷治療過程における FGF2 処理したヒト歯髄細胞の役割の解析、そして脊髄損傷後の機能回復のメカニズムの解明に繋がると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

脊髄完全切断モデルラットに FGF2 で処理した hDPCs を移植し、hDPCs が神経損傷を回復させる効果を持ち、さらにはドナー間に明らかな効果の違いがあることを確認する。また回復効果を認めた群とあまり認めなかった群において遺伝子の解析を通して、FGF2 処理歯髄細胞による脊髄損傷の機能回復のメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1)年齢や性別、歯牙形成段階の異なるヒト第三大臼歯から樹立した歯髄細胞 [Dental Pulp (DP)1, DP31, DP165, DP296] を脊髄完全切断モデルラットに移植し、Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB)スコアを用いた運動機能回復評価、損傷部上位脊髄に電気刺激を行い損傷部下部脊髄で測位する電気生理学的評価、移植後8週間後の脊髄凍結切片に免疫組織学的染色を用いた形態学的評価にて解析した。

(2)FGF2 処理及び未処理の hDPCs における網羅的遺伝子解析(DNA マイクロアレイ)を行い、移植に用いたヒト歯髄細胞での遺伝子発現変化をリアルタイム-Polymerase Chain Reaction (PCR)にて検討した。

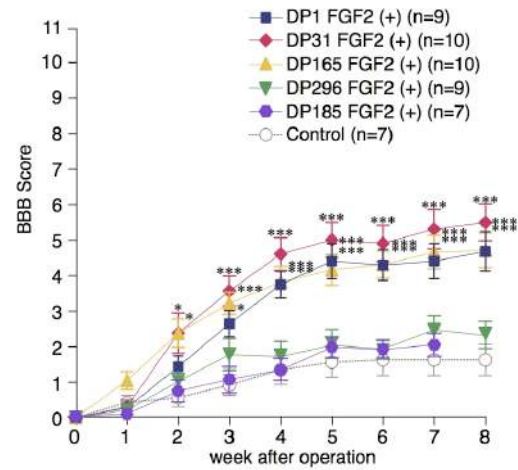
(3)回復効果を認める hDPCs に共通して発現変化を認めた遺伝子 GABA_A 受容体 β1 サブユニット (γ-aminobutyric acid type A receptor β1 subunit: GABRB1) の発現上昇が乏しい DP185 の移植実験を行い、回復効果を検討した。

(4)ウエスタンブロットを用いて、FGF2 処理前後の hDPCs における GABRB1 タンパク質発現を検討した。

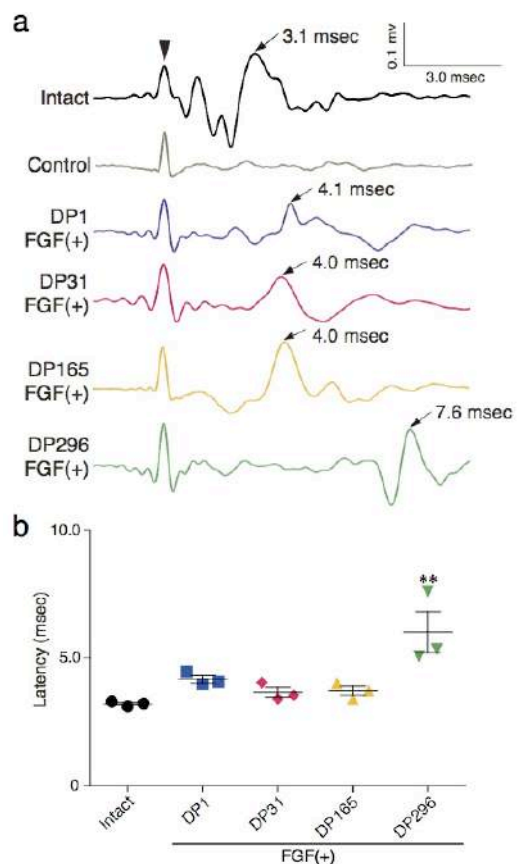
4. 研究成果

(1)BBB スコアを用いた運動機能評価を行い、リン酸緩衝食塩水 (Phosphate Buffered Saline: PBS) と比較し、DP1, DP31, DP165 は有意な運動機能回復を認めた。しかし、DP296 は有意な運動機能回復効果を示さなかった(図 1)。

(図 1)

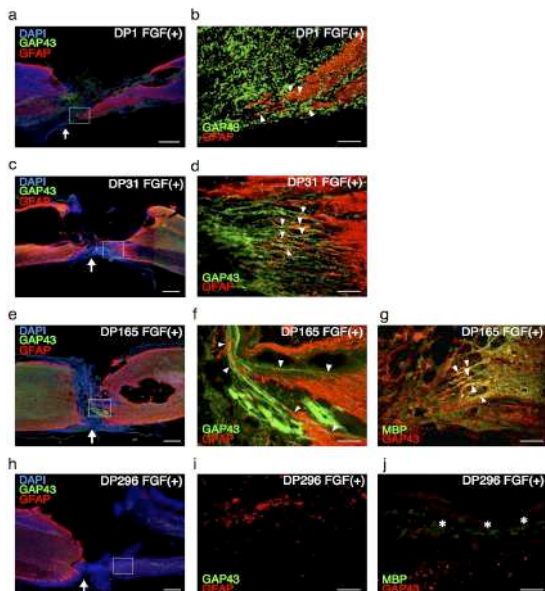


電気生理学的解析では、正常ラットと比較して DP1, DP31, DP165 において刺激に伴う誘発電位の潜時は有意な差が見られなかったが、DP296 において有意な遅延を認めた。(図 2)

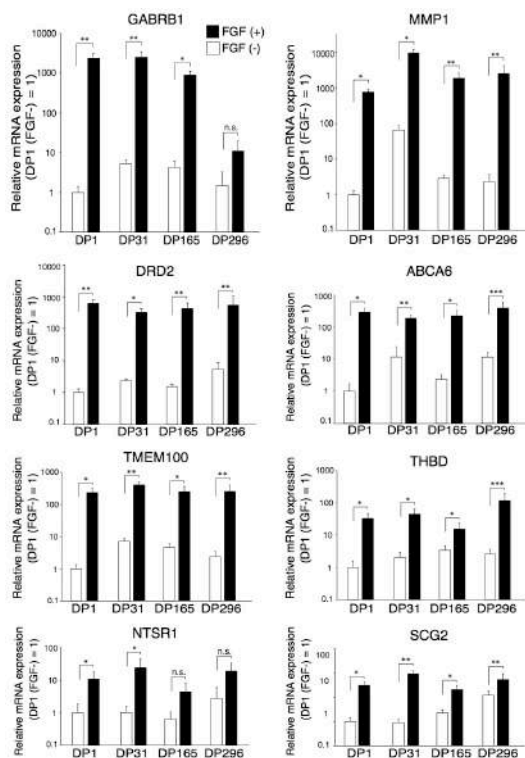


形態学的解析では、アストロサイトマーカーである Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性細胞は DP165 では損傷部下部にお

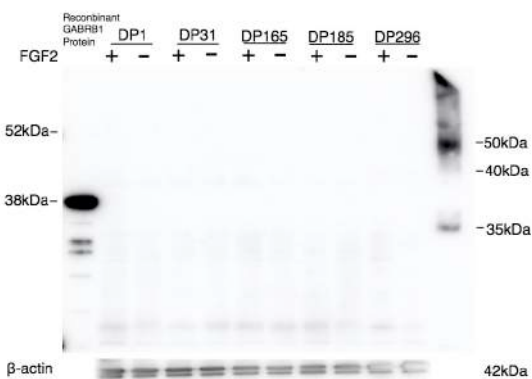
いても残存しているのに比較して、DP296 ではほとんど確認されなかった。また再生軸索マーカーである 43 kDa growth associated protein (GAP43)陽性細胞は DP165 では確認されたのに比較して、DP296 においてはほとんど認められなかった(図 3)。(図 3)



(2)DNA マイクロアレイ解析を行い、FGF2 処理による発現上昇を認めた 8 つの遺伝子に着目した。リアルタイム-PCR にて、治療効果が乏しかった DP296 では有意な発現上昇を認めず、治療効果を認めた DP1, DP31, DP165 に共通して発現上昇を認める遺伝子 GABRB1 を見出した。(図 4) (図 4)



(3)GABRB1 が回復効果と連動して発現変化する遺伝子の可能性を検証するため、新たな 10 個の hDPCs から FGF2 処理後に GABRB1 の有意な発現上昇を示さない DP185 を見出した。同様のモデルラットを用いた DP185 の移植を行い、運動機能評価解析から有意な運動機能回復を示さない結果が確認された(図 1)。(4)ヒト歯髄細胞において、明らかな GABRB1 のタンパク質発現は検出されなかった。(図 4) (図 4)



<引用文献>

- ① Takeda K, Tezuka K, et al. "Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs." *J Dent Res* 87(7), 676-681, 2008.
- ② Iida K, Tezuka K, et al. "Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells." *Arch Oral Bio* 55, 648-654, 2010.
- ③ Tamaoki N, Tezuka K, et al. "Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking." *J Dent Res* 89(8), 773-778, 2010.
- ④ Tamaoki N, Tezuka K, et al. The homeobox gene DLX4 promotes generation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 4: 7283. 2014.
- ⑤ Nagashima K, Fukumitsu H, et al. Priming with FGF2 stimulates human dental pulp cells to promote axonal regeneration and locomotor function recovery after spinal cord injury. *Sci Rep* 7: 13500. 2017.

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 FGF2-Responsive Genes in human Dental Pulp Cells Assessed using a Rat Spinal Cord Injury Model. Ken Sugiyama, Ken-ichi Tezuka, et al. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. (in press) DOI: 10.1007/s00774-018-0954-8

[学会発表] (計 2 件)

①杉山健、ヒト歯髄細胞における脊髄損傷後の回復効果と相関する FGF2 応答性遺伝子の探索、日本再生医療学会総会、2018 年 3 月 22 日、パシフィコ横浜（横浜市）

②杉山健、ヒト歯髄細胞における脊髄損傷後の回復効果を促進させる FGF2 応答性遺伝子の検討、日本口腔外科学会総会・学術大会、2017 年 10 月 21 日、国立京都国際会館（京都市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 健 (SUGIYAMA, Ken)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30802673