

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11970

研究課題名(和文) GDF-5と歯髄幹細胞ニッチを併用した新たな象牙質再生療法樹立の試み

研究課題名(英文) Trial of establishment of new dentin regeneration therapy using GDF-5 and dental pulp stem cell niche

研究代表者

丸谷 由里子 (Maruya, Yuriko)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：60400389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血管系構築と硬組織形成に着目した、効率よい歯髄組織の再生メカニズムの解明を目的とし、歯髄幹細胞に外来性にGDF-5を添加し、細胞増殖能、さらに象牙芽細胞および血管内皮細胞の分化マーカー遺伝子発現について検討した。

歯髄幹細胞にGDF-5を添加培養した群と、非添加群との細胞増殖について比較したところ、両群において細胞数に違いは認められなかった。よってGDF-5は歯髄幹細胞の細胞増殖に影響を与えないことが示された。また、歯髄幹細胞にGDF-5を添加し、培養した群においてSmad6および7の遺伝子発現を検討した。GDF-5非添加群に比較し、Smad7の遺伝子発現に有意な低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、歯の再生を目指し、歯髄組織再生を試みた報告が多数なされている。組織の発生・再生には、細胞に酸素と栄養を供給するという観点から、血管新生が重要であり、歯髄組織再生においても、組織内での血管系構築と、象牙質等の硬組織形成の作用を有する分子が重要だと考えられる。

GDF-5は、象牙芽細胞マーカーであるDSPP遺伝子の発現上昇を誘導したことから、歯髄幹細胞を象牙芽細胞へ直接分化促進する作用を持つ可能性が示され、また、VEGFの遺伝子発現を上昇させたことから、血管新生に関わることも示された。よってGDF-5は、歯髄組織再生を目指す上で有効な分子とすることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of elucidating of the efficient regeneration of dental pulp focusing on vascular system construction and hard tissue formation, GDF-5 was added exogenously to dental pulp stem cells, cell proliferation ability and the expression of odontoblast and vascular endothelial cell differentiation marker genes were examined.

When comparing the cell growth of the group in presence of GDF-5 and the group without GDF-5, no difference was found in the number of cells in both groups. Therefore, it was shown that GDF-5 does not affect the cell proliferation of dental pulp stem cells. In addition, the gene expression of Smad6 and 7 was examined in the group in which GDF-5 was added to dental pulp stem cells and cultured. A significant decrease in Smad7 gene expression was observed in the presence of GDF-5.

研究分野：小児歯科

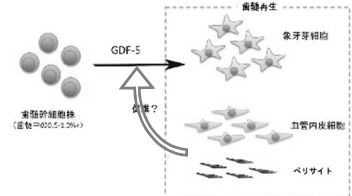
キーワード：歯髄再生 歯髄幹細胞 GDF-5

## 1. 研究開始当初の背景

歯は、う蝕や歯周病で喪失してしまうと、現時点では二度と再生しない組織の一つである。その中で歯髄組織は、象牙質の形成に関与し、歯の生活状態を保つ上で大変重要な役割を果たすが、歯髄は小さい根尖孔からのみ血管供給を受けるという特徴ゆえに、炎症性変化に対し脆弱で、容易に壊死に陥りやすい。その様な失活歯は脆く、寿命が短いため、歯髄組織の再生を試みた報告が多数なされている。

組織の発生・再生には、細胞に酸素と栄養を供給するという観点から、素早い血管新生が重要である。そこで、歯髄組織再生の為には、組織内での血管系構築と、象牙質等の硬組織形成の作用を有する分子が重要であると考えられる。血管新生においては、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) が重要な役割を演じていることが知られている。また TGF- $\beta$  ファミリー分子である BMPs は、局所において新生骨を誘導する因子として発見され、骨だけでなく、軟骨や歯など硬組織の形成にも重要な役割を持つことが知られており、再生医療での臨床応用が期待されている。growth/differentiation factor-5 (GDF-5) は、代表的な BMPs の 1 つであり、軟骨・骨形成を促進することが報告されている。また、骨髄幹細胞に GDF-5 を作用させ、骨分化を誘導させる際に、VEGF の遺伝子発現を上昇させることから、GDF-5 は骨形成における血管新生にも関わると考えられている。GDF-5 は口腔領域にも発現が認められる。歯根の形成過程においては、GDF-5 の遺伝子発現が歯根膜やセメント質表面の細胞に認められることから、歯根膜の成長に関与すると考えられている。さらに、GDF-5 は歯髄組織にもその存在が確認されている。しかしながら、歯の発生・再生に関わる歯髄幹細胞に対する GDF-5 の影響については、不明な点が多い。

申請者はこれまで、マウス歯髄由来幹細胞に GDF-5 を添加し培養すると、象牙芽細胞マーカー遺伝子の発現を上昇させることを報告し、GDF-5 が歯髄細胞を成熟象牙芽細胞に分化促進させる可能性を示した (丸谷ら, 小児歯, 2009)。その際、歯髄中の幹細胞の歯髄内微小環境としての血管内皮細胞あるいはペリサイトが、歯髄幹細胞の増殖・分化能力を増大させる幹細胞ニッチとして働く可能性は大きく、GDF-5 が有する歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化促進効果をさらに高めるものと考えられる。



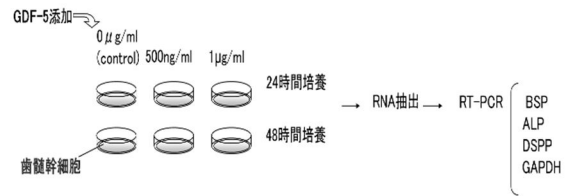
## 2. 研究の目的

血管新生と骨誘導の両作用を期待できる GDF-5 に着目し (図)、本分子の歯髄幹細胞に及ぼす影響を検討することを目的とした。本研究課題では、マウス歯髄幹細胞株を用いて、歯髄組織分化に対する GDF-5 の影響を検討することにより、GDF-5 の歯胚形成における役割、特に歯髄細胞に及ぼす影響と象牙質形成過程における分子機構を明確にする。

歯髄幹細胞については、通常の培養条件下では歯髄細胞の 0.5-1.0% 以下しか存在せず、象牙芽細胞の分化誘導を生化学的に評価するには不十分であった。そこで、本研究課題では、ある特定の遺伝子群を導入した後、ヘキスト色素の排出能を利用した細胞ソーティング法により、歯髄由来幹細胞を効率よく調整する方法によって樹立した歯髄幹細胞株を用い、細胞に GDF-5 添加した際の象牙芽細胞分化について、免疫組織学的、分子生物学的、生化学的手法による評価システムを確立する。

### 3. 研究の方法

マウス歯髓由来幹細胞株を継代培養し、セミコンフルエント到達後、recombinant mouse GDF-5 を 500ng/ml および 1 μg/ml の濃度で添加し、24 時間 および 48 時間培養した。培養後、GDF-5 添加群および非添加群の細胞から Total RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR を行い、BSP、ALP、DSPP の各遺伝子発現を測定した。



さらに、歯髄幹細胞に GDF-5 を 500ng/ml、BMP-2 を 200ng/ml それぞれ添加し、48 時間培養後、リアルタイム PCR 法を用いて DSPP、ALP、VEGF、Dentin matrix protein (DMP)、Nestin の遺伝子発現を調べた。

また、歯髄幹細胞をコンフルエント培養後、GDF-5 を 500ng/ml 添加し 0 時間、1.5 時間、3 時間、6 時間培養後リアルタイム PCR 法を用いて Smad-6、Smad-7 の遺伝子発現を調べた。

BMP と GDF-5 の相互作用を検討するため、歯髄幹細胞に、GDF-5 のみ 10ng/ml、100ng/ml、250ng/ml、500ng/ml 添加、また BMP-2 を 200ng/ml + GDF-5 をそれぞれの濃度添加し 54 時間培養後、ALP 活性を測定した。

### 4. 研究成果

#### 歯髄幹細胞に対する GDF-5 の影響

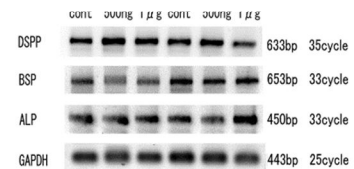
歯髄細胞の中には、多分化能を有する歯髄幹細胞の存在が知られていたが、通常、歯髄細胞の 1%以下しか存在しないため、象牙芽細胞分化誘導を生化学的に評価するには不十分だった。今回、株化に成功した歯髄幹細胞を用いることにより、この問題が解決できる。歯髄幹細胞に GDF-5 を添加し、24 時間培養した群の DSPP の遺伝子発現は、GDF-5 非添加群に比較し有意な上昇が認められた。また、BSP の遺伝子発現は培養 48 時間後において GDF-5 添加群で上昇し、ALP では、培養 24 時間後、48 時間後いずれにおいても GDF-5 添加による遺伝子発現の有意な変化は見られなかった。

幼若歯髄細胞と歯髄幹細胞を比較すると、歯髄幹細胞のほうが GDF-5 により、DSPP の発現誘導がより増強されていることが示された。

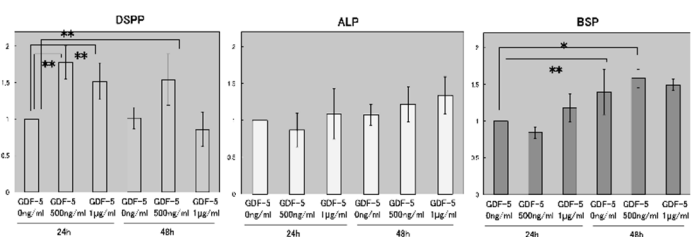
この結果はリアルタイム PCR においても同様であり、GDF-5 添加群においては非添加群に比較しこれら象牙芽細胞分化マーカーの遺伝子発現が上昇した。

BMP-2 と比較すると、DSPP においては GDF-5 の方が、DSPP の遺伝子発現を上昇させたが、ALP

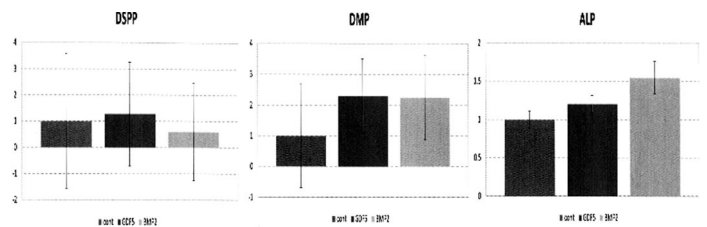
骨芽細胞・象牙芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現



骨芽細胞・象牙芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現 RT-PCR

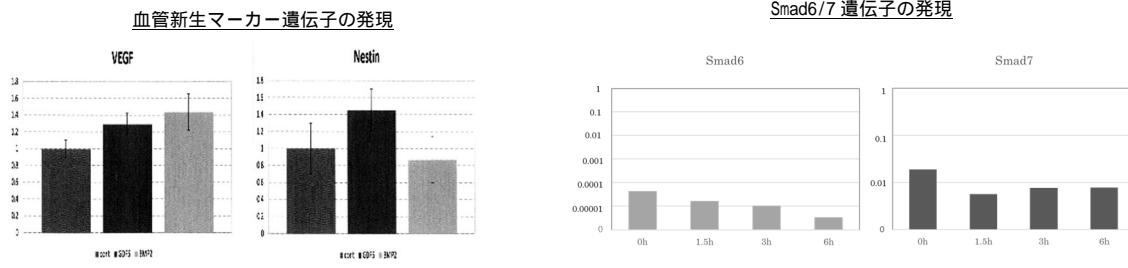


骨芽細胞・象牙芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現リアルタイム PCR



においては BMP-2 に比較するとその作用は弱かった。

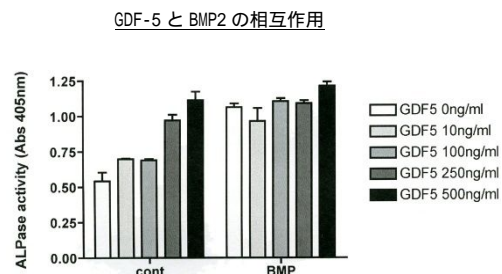
また、歯髄幹細胞に GDF-5 を添加し 48 時間培養した群の VEGF の遺伝子発現は非添加群に比較し上昇していた。この作用は BMP-2 においても認められた。また GDF-5 は、Nestin の遺伝子発現も上昇させた。以上から、GDF-5 は歯髄における血管新生にも関わる可能性があることが示唆された。



歯髄幹細胞に GDF-5 を添加培養した結果、1 時間培養群において Smad7 の遺伝子発現が有意に低下した。Smad7 は BMP シグナルを抑制すると考えられており、これが低下したということは GDF-5 が歯髄幹細胞においてそのシグナル活性を促進すると考えられた。

GDF-5 と BMP-2 の相互作用を ALP 活性に関して調べた結果、GDF-5 と BMP-2 をともに添加し培養した方が、ALP 活性を上昇させる傾向があった。

以前より、歯髄細胞中に存在する幹細胞は TGF-ファミリー分子により、象牙芽細胞への分化が誘導されることが報告されてきた。しかしながら、いずれも幹細胞以外の細胞集団を含む細胞培養条件下での解析であり、これら分子が直接幹細胞に作用しているのか、あるいは歯髄中に存在する他の細胞を介した現象であるのか明らかではなかった。また、TGF-ファミリー分子のなかでも GDF-5 に関する報告は皆無であった。以前、我々はラットの幼若歯髄細胞において、GDF-5 で処理した群と control 群で比較すると、ALP、OPN、BSP、DSPP の発現が上昇することを示し、GDF-5 が骨芽細胞あるいは象牙芽細胞分化に関与している可能性を報告した。



今回の、歯髄幹細胞を用いた実験において、GDF-5 は、象牙芽細胞マーカーである DSPP 遺伝子の発現上昇を誘導したことから、本分子は歯髄幹細胞を象牙芽細胞へ直接分化促進する作用を持つ可能性が示された。

DSPP 遺伝子発現の上昇は、500ng/ml 添加群のほうが、1  $\mu$ g/ml 添加群より著しかった。TGF-ファミリー分子は、濃度により細胞の分化誘導や増殖に対する影響が異なることが知られており、今回のケースでは、500ng/ml 程度の添加濃度が細胞を分化の方向に誘導するものと考えられた。また、時間的な観点からは、TGF-ファミリー分子の効果は一過性であり、長期的に培養すると逆に分化マーカーの発現を抑制してしまうものが多い。このような例は骨やエナメル芽細胞の分化で確認されている。今回の結果において、48 時間培養群の DSPP 遺伝子発現が、24 時間培養群に比べ低下していたことから、GDF-5 を象牙芽細胞分化誘導に応用する際には、分化の初期のみ作用させ、適切な時期に除去する必要があるのかもしれない。今回の結果より、GDF-5 が歯髄幹細胞を象牙芽細胞に分化促進させる可能性を示したが、同様に、間葉系の細胞に

石灰化を誘導する因子として、BMP-2がよく知られている。しかし、以上に述べたことから、GDF-5は初期分化に限局して作用することから、BMP-2よりもTGF- $\beta$ 1の作用に近い性質を有しているものと思われる。このことは48時間培養後のリアルタイムPCRの結果において、BMP-2添加群の方がGDF-5添加群よりALPの遺伝子発現が上昇していたことから支持されるであろう。多くのTGF- $\beta$ ファミリー分子は、骨基質やALPの発現を早期に調節するものが多く、DSPPのみを発現誘導するものはほとんどない。このことから、幹細胞を骨芽細胞でなく象牙芽細胞に分化誘導させるためにGDF-5は重要な役割を演じている可能性が認められた。また、GDF-5はVEGFの遺伝子発現を上昇させたことから、血管新生に関わることも示され、歯髄組織再生を目指す上で有効な分子とすることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石崎 明  (Ishisaki Akira)  (20356439)	岩手医科大学・歯学部・教授    (31201)	