

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592102

研究課題名 ヒト歯髄細胞への効果的な遺伝子導入法の研究開発

研究課題名 Characterization of human dental pulp-derived cell lines

研究代表者 勝呂 尚 (Suguro Hisashi)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：90318452

研究成果の概要：歯髄細胞は数種類の異なる細胞から構成されていることが知られている。しかしながら、その活性は低く、長期にわたる継代培養は困難である。そこで本研究では、歯髄細胞の性質をより詳細に検索するためにヒト歯髄由来細胞の樹立と解析を行った。本申請期間では、9種類のクローン細胞を樹立し、樹立したクローン細胞間の遺伝子発現の違いを Differential Display により検索し、8種類の遺伝子を検出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：医学・歯学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：ヒト歯髄由来細胞株, SV40 Large T antigen, Differentially expressed genes, Thy-1

## 1. 研究開始当初の背景

近年のう蝕治療では、象牙質-歯髄複合体といった歯髄の保存治療を基本とした考え方が主流となっており、最近では、象牙質および歯髄再生療法を行うといった考え方が注目されている。再生療法の一環として遺伝子導入法 (Transfection) という手法が試みられている。遺伝子導入法は、細胞内部に特定の遺伝子を発現するための有効な手段として知られている。この特定の遺伝子を細胞の外から中に入れることは、遺伝子機能の研究やガン、エイズの

遺伝子治療の際に必須の操作である。

つまり、これは細胞に対して遺伝子を導入することによって目的の生体組織を作ろうとする再生治療への一法である。

しかしながらこの遺伝子導入法を用いた手法に関する報告は、歯科に関しては数少なく、他の細胞に比べ歯髄細胞は活性が低く、遺伝子導入が難しいとされている。

## 2. 研究の目的

歯髄細胞はいくつかの異なった構成細胞から出来ている事から、ヒト抜去歯から分離

培養した歯髄細胞を用いて、ヒト不死化歯髄細胞を作製することにより歯髄由来細胞株の樹立と解析究を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞

ヒト歯髄細胞は、日本大学歯学部附属病院に通院し、本実験の主旨を説明し同意の得られた患者からの抜去歯を使用した。取り出した歯髄は、10% fetal calf serum(FCS) 加 Dullbecco's Modified Eagle Medium(10% FCS D-MEM)を用いて培養した。

#### (2) Transfection

継代2代目で用いた Lipofectamine Plus transfection 法により SV40 large T antigen の遺伝子導入を行った。

その後、増殖した歯髄細胞をネオマイシン(G418) 400 $\mu$ g/ml を含有する選択培地で培養し、selection を行った。

7日後、colony を形成した細胞をクローニングリングで回収し、更に細胞を限界希釈法によってクローニングした。

#### (3) 免疫蛍光染色

樹立した細胞株に一次抗体として anti-vimentin, anti-fibroblast を染色、二次抗体として FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) もしくは FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) 抗体で染色を行い、免疫蛍光染色法を行った。

#### (4) Differentially expressed genes

樹立されたクローンに遺伝子発現の違いが見られるかどうかを確かめるために differential display を行った。

クローンは Gene Fishing DEG Kit を用いて2種類以上の試料間で発現量の異なる遺伝子 (Differentially Expressed Genes : DEGs) のスクリーニングを行った。

発現の違いの見られた DNA フラグメントを抽出し、TOPO TA cloning vector 中でサブクローニングを行い、sequence 解析を行い、遺伝子の同定を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞

本実験で、我々は9種類の不死化歯髄細胞株を樹立した。

さらに樹立した細胞株を調べるため、免疫蛍光染色を行った所、9種類すべてに anti-vimentin, anti-fibroblast 抗体に対して陽性反応を示し、すべての細胞株が線維芽細胞様細胞の性格を有することが予想された (図1)。

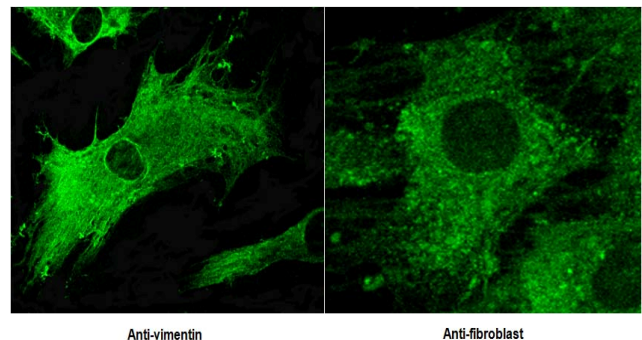


図1 Immunofluorescence staining

#### (2) Differentially expressed genes

次に9種類の細胞に遺伝子発現の違いが見られるかどうかを確かめるために differential display を行い、8種類の遺伝子を検出した (表1)。

2種類の遺伝子は未知の遺伝子であった。その他の6種類の遺伝子については DNA 配列に基づき sequence 特異的な primer (表2) を作製し、各細胞間での遺伝子発現の違いを RT-PCR により再確認した。その結果、細胞株 No.3, 4, 6, 7, 8, 9 では予想された大きさなバンドが検出され細胞間で発現量に違いを認めた。また、No.1, 2, 5 では、すべての遺伝子で発現が認められなかった (図2)。

表 1 Cloning

	Genes
DEG1	Homo sapiens complement component 1, s subcomponent, transcript variant 2
DEG2	Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 1
DEG3	Homo sapiens triosephosphate isomerase 1 (TPI1)
DEG4	Homo sapiens alkB, alkylation repair homolog 5
DEG5	Homo sapiens ubiquitin-activating enzyme E1
DEG6	Unknown sequence
DEG7	Unknown sequence
DEG8	Homo sapiens Thy-1 cell surface antigen (THY1)

表 2 Sequencing

	Sequences	
DEG1	Sense	TAGCTCCTTTAAGAAAATGC
	Antisense	GAACAGGTAAGAGGAAACA
DEG2	Sense	ACTTTATTGAATGACACTGT
	Antisense	AAGTCTAGGGACAGGAAGAT
DEG3	Sense	AATTCGTGGACATCATCAAT
	Antisense	ATGGGTGGTTCACATACACA
DEG4	Sense	AACCAATGCAGACATCAGT
	Antisense	TGAAGAATAGAATTGGCCAG
DEG5	Sense	AGGATTCAGGTTTCAAACAA
	Antisense	ATGCTCTATTCTTTCAT
DEG8	Sense	ATGCAGSTTGACCAGGAAA
	Antisense	AGAGGCTTGGTTTTATTGTG

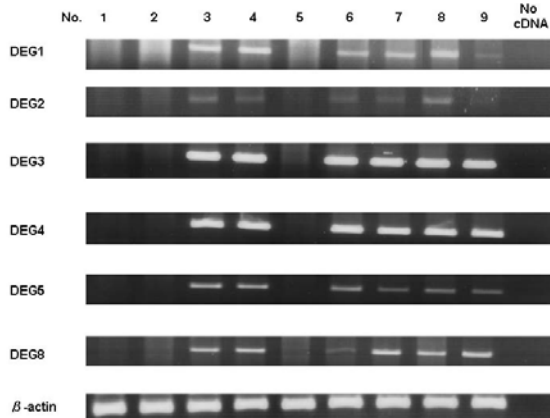


図 2 RCT-PCR 法

### (3) Thy-1

検出された遺伝子のうち DEG8 は、T cell marker である Thy-1 をコードするものであった。現在までに歯髄における Thy-1 の発現については報告がないため、Thy-1 の発現の有無について正常な歯髄組織を用いて検討した。その結果、図 3 に示すように、anti-Thy-1 抗体に濃染する細胞の存在

を確認した。

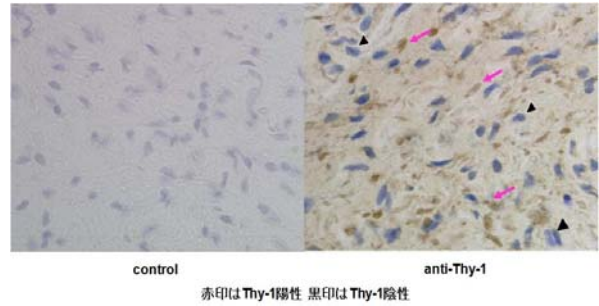


図 3 Immunohistochemical staining

### (4) 考察

歯髄細胞は数種類の異なる細胞から構成されていることが知られている。

しかしながら、その活性は低く、長期にわたる継代培養は困難である。

そこで本研究では、いわゆる歯髄細胞の性質をより詳細に検索するためにヒト歯髄由来細胞株の樹立と解析を行った。

我々は SV40 large T antigen を用いて、Lipofectamine 法による遺伝子導入を行い、9 種類のクローン細胞株を樹立した。

樹立された細胞株のすべては、anti-vimentin, anti-fibroblast 抗体に陽性反応を示した。結果は示さないが更に anti-collagen type I および type III 抗体にも陽性反応を示し、線維芽細胞様細胞の性格を持つ事が判明した。

しかしながらそれぞれの細胞株間で免疫蛍光染色の強度に明らかな差が認められた事から、同じ線維芽細胞様細胞であってもその特徴には差があるものと考えられた。

すなわち、線維芽細胞中に種々の subclone が存在する可能性が考えられた。

そこで、樹立されたクローン細胞株間に遺伝子発現の違いが見られるか否かを検討するために differential display を行った。

その結果、各細胞間で発現の異なる 8 種類の遺伝子を検出する事が出来た。

今回の実験では現在までに歯髄組織における発現が報告されていない Thy-1 に注目し検索したが歯髄組織中には明らかに陽性を示す Thy-1<sup>+</sup> 細胞が存在することが判明した。

今回、differential display 法で使用した

arbitrary primer は 20 種類に過ぎず, primer の種類を増やす事によってさらに報告されていない遺伝子の検出が可能であると考えられ, 今後の検討課題となる。

Thy-1 は, 細胞外領域に免疫グロブリンスーパーファミリーの中で最小単位の Ig 様 V 領域を 1 つ有する糖タンパク質であり, 卵巣ガン細胞, 内皮細胞, 腫瘍細胞, 造血細胞の表面に Thy-1 が発現されると報告されている。

Thy-1<sup>+</sup>細胞の存在はまた歯根膜においても確認されており, 細胞増殖活性に差がある可能性が示唆されている。さらに Thy-1 は細胞接着, 細胞伝達, アポトーシスもしくは細胞増殖などの多くの生物学的機能を寄与していると報告されており, 歯髄組織における発現の機能的意義については今後更に検討する必要がある。

#### 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 3 件)

- ① Suguro H, Asano M, Kaneko Y, Omagari D, Ogiso B, Moro I, Komiyama K, Characterization of human dental pulp-derived cell lines, Int Endod J, 41, 609–616, 2008, 査読あり
- ② Omagari D, Iijima M, Suguro H, Sato I, Asano M, Moro I, Differential Distribution of mouse polymeric immunoglobulin receptor (mpIgR): Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay system for mpIgR Scand J Immunol, 68, 543-551, 2008, 査読あり
- ③ 勝呂尚, 浅野正岳, 尾曲大輔, 尾形英大, 小木曾文内, 茂呂周, 小宮山一雄, ヒト歯髄由来細胞株の樹立と解析, 消化器と免疫, 44, 24-28, 2008, 査読なし

[学会発表] (計 3 件)

- ① 勝呂尚, ヒト歯髄由来細胞株の樹立と解析, '07 秋季日本歯科保存学会, 岡山, 2007.11.8

- ② 勝呂尚, ヒト歯髄由来細胞株の樹立と解析, 第 44 回日本消化器免疫学会, 東京, 2007.7.9

- ③ 培養ヒト培養歯髄細胞株への一時的なタンパク質発現, '06 秋季日本歯科保存学会, 鹿児島, 2006.11.9

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

勝呂 尚 (Suguro Hisashi)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：90318452

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

浅野正岳 (Asano Masatake)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号：10231896