

平成21年 6月 8日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791409

研究課題名（和文）不死化歯髄細胞を用いた覆髄実験

研究課題名（英文）Direct pulp capping by using immortal dental pulp cells

研究代表者

半田 慶介 (HANDA KEISUKE)

北海道医療大学・歯学部口腔機能修復・再建学系う蝕制御治療学分野・講師

研究者番号：40433429

研究成果の概要：

象牙芽細胞の分化機構に関して不明な点が多く残されており、そのメカニズムを解明することは象牙質再生に大きく貢献すると考えられる。このため、本研究ではヒトテロメラーゼ触媒サブユニット (hTERT)、16型ヒトパピローマウイルス(HPV)のE6、E7遺伝子を導入することにより不死化したイヌ歯髄細胞株の樹立を試みた。また、樹立した細胞株の *in vitro* での特性について解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,400,000	0	2,400,000
20年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：象牙質再生、覆髄、細胞不死化

## 1. 研究開始当初の背景

歯科分野における再生医療は、8020運動推進のために再生医療とティッシュエンジニアリング技術を応用し、失われた咬合咀嚼機能を回復することが最重要課題となっている。特に保存学領域においては、齲蝕によって喪失した象牙質-歯髄複合体を再生させることが要求されている。これまで行われてきた水酸化カルシウム製剤や接着性レジンによる直接覆髄法に取って代わり、生物学的根拠に則り象牙質発生機構に基づいた覆髄技術の開発が期待されている。歯髄細胞の性質や分化能を

失うことなく、細胞を増やすことができれば歯科領域における再生医療の発展に大きく寄与すると考えられる。本研究では、ヒトパピローマウイルスのE6遺伝子やE7遺伝子、ヒトテロメラーゼ触媒ユニットの遺伝子本を歯髄細胞に導入することによって、不死化歯髄細胞を作製し、名々これまで不明であった象牙質形成機構を明らかにする予定である。また、将来的に自分の細胞で自分を治療するというオーダーメイドの治療を目指すため、自家細胞移植実験を目的にしている。

## 2. 研究の目的

不死化遺伝子(ヒトパピローマウイルスの E6 遺伝子や E7 遺伝子、ヒトテロメラーゼ触媒ユニットの遺伝子)を駆使して不死化イヌ歯髓細胞株を樹立することで象牙質再生療法の確立および不明であった象牙質形成機構を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 不死化イヌ歯髓細胞株の樹立

イヌ歯髓細胞を樹立し、レトロウイルスを用いた遺伝子導入によって細胞の不死化を行う。得られた不死化イヌ歯髓細胞の生化学的な性質を *in vitro* で調べる。

#### ①細胞採取および細胞不死化

#### ②不死化細胞の発現遺伝子

#### ③不死化歯髓細胞の石灰化能の検索

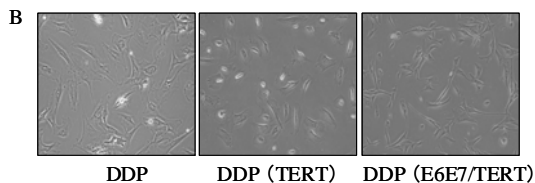
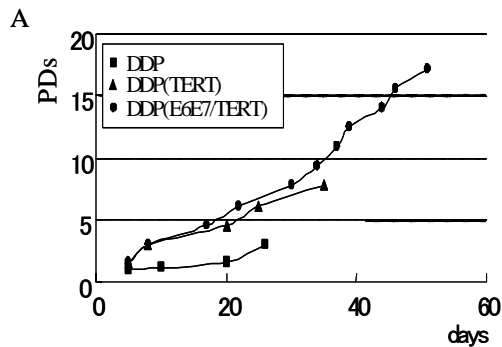
(2) 不死化イヌ歯髓細胞株を用いた覆髓実験  
19年度に作成した不死化イヌ歯髓細胞(iDDP)を用いた覆髓実験を行う。

#### ④ビーグル犬を用いた覆髓実験

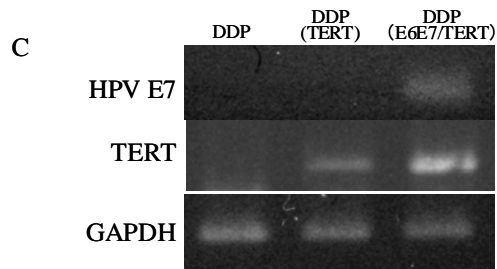
#### ⑤形態学および免疫組織化学的な検索

## 4. 研究成果

① 正常細胞である DDP は集団倍加係数 (population doubling; PD)=3, hTERT のみを導入した DDP(TERT)も PD=7.7 を超えると細胞増殖を停止することが明らかになった(図 A)。また、遺伝子導入した細胞は正常細胞と同様の紡錘状の形態を示していた(図 B)。

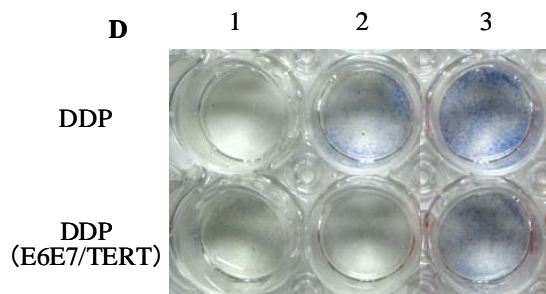


②hTERT 遺伝子を導入した DDP(E6E7/TERT)および DDP(TERT)では、hTERT 発現が認められ、HPV E6 E7 遺伝子を導入した DDP(E6E7/TERT)においてのみ HPV E7 遺伝子の発現が RT-PCR 法で確認された(図 C)。

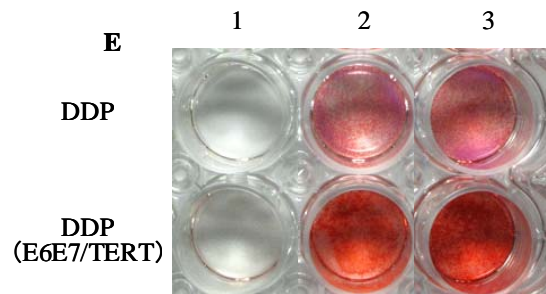


### ③ALPase 活性および石灰化

DDP (E6E7/TERT) の分化能および石灰化能を解析する目的で、ALPase 染色とアリザリンレッド染色を行った。10 % FBS 添加 DMEM 培地で DDP および DDP (E6E7/TERT) を 6 日間培養したところ、ALPase 活性および石灰化ともに確

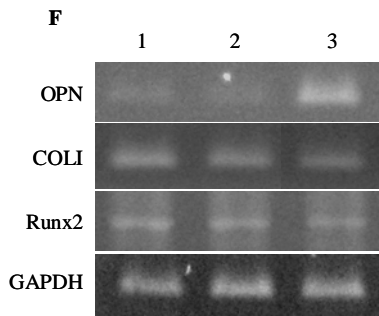


認できなかった(図 D レーン 1, E レーン 1)。しかし培地を石灰化誘導培地に変えることによって DDP および DDP (E6E7/TERT) において ALPase 活性の上昇(図 D レーン 2, 3)および石灰化が誘導され、ともに同等の染色性を示した(図 E レーン 2, 3)。さらに、石灰化誘導培地に rhBMP-2 を添加することで ALPase 活性および石灰化がやや強く誘導された(図 D レーン 2, 3)。



### 硬組織関連遺伝子発現の確認

DDP (E6E7/TERT) における、硬組織関連遺伝子(OPN, COLI, Runx2)の発現に関して RT-PCR 法で解析を行った。石灰化誘導培地または rhBMP-2 添加石灰化誘導培地で 6 日間培養を行って解析した結果、COLI mRNA および Runx2 mRNA 発現が確認された(図 F)。また、OPN mRNA 発現は rhBMP-2 添加によって増強された。



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)

半田慶介、小池俊之、清野透、斎藤隆史  
 不死化イヌ歯髄細胞株の樹立とその特性の解析、日本保存学会誌、査読有、in press

[学会発表] (計4件)

日本保存学会第126回秋季学術大会(大宮)  
 不死化イヌ歯髄細胞の石灰化能について  
 半田慶介、小池俊之、立松祐哉、斎藤隆史

平成19年度秋期第50回日本歯科理工学会学術講演会および国際歯科材料会議2007(タイ、バンコク11月)

Establishment of dog dental pulp cell line as a screening tool for direct dental pulp capping.  
 Handa K, Koike T, Saito T

第50回歯科基礎医学会(東京)  
 イヌ歯髄細胞の不死化と分化能について  
 半田慶介、小池俊之、斎藤隆史

第129回日本歯科保存学会(秋)(富山)  
 不死化イヌ歯髄細胞の特性について  
 半田慶介、小池俊之、斎藤隆史

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0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0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

半田慶介 (Handa Keisuke)

北海道医療大学・歯学部口腔機能修復・再建学系  
 う蝕制御治療学分野・講師

研究者番号：40433429

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：