

機関番号：3 2 6 6 7

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008 年度～2010 年度

課題番号：20390538

研究課題名(和文) 歯周炎による全身疾患発生機序の研究：揮発性硫黄化合物の幹細胞におよぼす影響

研究課題名(英文) Study for the Process of Developing General Conditions Because of Periodontitis: Effects of Volatile Sulfur Compounds on Stem Cells

研究代表者

八重垣 健 (YAEGAKI KEN)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：40166468

研究成果の概要(和文)：ヒト乳歯・智歯歯髄幹細胞を CD117 抗体と磁気ソーティングを用い分離した。4 代毎に磁気ソーティングして継代培養し、これから肝臓様細胞・膵臓様細胞を分化させた。無血清培地での分化も可能とした。一方、0.1ng/10mL 硫化水素曝露下で幹細胞を分化させたところ、前者は尿素形成の促進や肝臓マーカーの強い発現など分化促進効果が見られ、後者はインシュリン合成抑制など若干の抑制が見られた。幹細胞そのものには強いアポトーシスが発現した。

研究成果の概要(英文)：Stem cells were isolated from human deciduous and wisdom teeth using CD117 antibody and magnetic separation. The cells were passaged using the magnetic separation using CD117 antibody at every 4 passages. Hepatic and Pancreatic cells were differentiated from the cells, also differentiated using serum free media. The cells were dedifferentiated under 0.1ng/10mL hydrogen sulfide. Hepatic differentiation was accelerated, since hepatic markers expressed more than in control, and as urea production was increased. But pancreatic was suppressed as insulin production was suppressed. The pulp stem cells themselves caused strong apoptosis under hydrogen sulfide exposure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2009 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,330,000	18,730,000

研究分野：歯周炎

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：歯周炎、幹細胞、肝細胞、硫化水素

1. 研究開始当初の背景

歯周炎の全身との関連が大きく注目されているが、オッズ比の範囲に止まるものばかりで。科学的説得力のある実験的検証はほとんど

どなかった。研究代表者らは口臭物質には青酸ガスに次ぐ毒性がある事実に着目し。その病原性について報告を積み重ね近年、口臭物質・揮発性硫黄化合物(VSC)が歯肉線維芽

細胞・歯肉上皮細胞にアポトーシスを惹起すると報告し、発生機序も MAPK、JNK、c-jun のルートと、ミトコンドリア・caspase3 に至るルートを解明した。以上の結果から「VSC は、アポトーシスを介した病原性を発揮する」と結論した。この結果は、以下の2点に於いて重要な意味を持つ。一方、VSC は幹細胞にも、同様の強い毒性を持ち病原性を発揮するとみられる。VSC による幹細胞の過剰なアポトーシスの発生は、組織にとって重篤な転帰を意味する。①VSC は非常に低濃度で、冠動脈、膵臓、肺、骨髄、赤血球、白血球、リンパ球などの組織で容易にアポトーシスを惹起するとの報告がある。特に冠動脈では、幹細胞自身が抗アポトーシス因子を放出して障害を予防するため、幹細胞自身のアポトーシスは重篤な障害を招く。すなわち、口腔由来 VSC は全身に到達するので、VSC による幹細胞アポトーシスの機序解明により、歯周病と全身疾患の関連を、論理的かつ明確に証明することができると考えられた。

2. 研究の目的

歯周炎由来硫化水素による幹細胞アポトーシスに着目して、「歯周炎が全身に悪影響を与える」あるいは「全身疾患を惹起する」との仮説の下、本申請研究では、ヒト間葉系幹細胞やマウス胚性幹細胞に及ぼす VSC の影響を検討する。ヒト間葉系幹細胞としては骨髄幹細胞が一般的であるが、採取が容易ではない。そのうえ本研究の普遍性を確立するには、多くの幹細胞 strain が必要となる。そこで、試料採取が容易なヒト抜去乳歯・智歯歯髄から幹細胞を得て、VSC の幹細胞への影響、上皮細胞、肝臓細胞、膵臓細胞、脂肪細胞への分化への分化法を確立する。そこで硫化水素の幹細胞や臓器分化への影響を明らかにする。硫化水素に着眼し仮説としたのは、サイトカインより遥かに容易に全身伝播するためである。本研究では、ヒト幹細胞あるいは上皮幹細胞、肝臓細胞や膵臓細胞への分化の過程で硫化水素がアポトーシスあるいは分化障害を生じるとの結果を予想する。これは、歯周病由来硫化水素が全身疾患に関わることを示す。

3. 研究の方法

(1) VSC の Mouse Embryonic Stem Cell (MESC) への影響

①MESC の培養

MESC (#66001-02, CELPROGEN, USA) を DMEM/F12 培地 10%FCS にて継代培養する。VSC インキュベーション 24, 48, 72 時間培養する。培養時間は予備実験にて既に決定している。硫化水素濃度は 1ng-100ng/ml 95 % air/5 % CO₂ の範囲で変動させ、培養液中濃度を 0.05-0.5ppm とし、アポトーシスとネクローシスの発現状況と硫化水素濃度の関連を明らかにする。

②アポトーシス、ネクローシスの測定

早期アポトーシス、後期アポトーシス + ネクローシスは、Guava PCA Nexin kit™ (GE Healthcare Bioscience Co. USA) による Annexin V/7-amino-actinomycin D (7-AAD) 染色を行い、Gava EasyCyte™ (GE. USA) にてフローサイトメトリーを行い、同定する³。さらに、細胞質中の histone-complexed DNA fragments を Cell Death Detection ELISA kit™ (Roche, USA) で測定し、フローサイトメトリー測定に加え、モノあるいはオリゴヌクレオチド定量によるアポトーシス測定結果とする³。ネクローシスは、細胞質から逸脱する lactate dehydrogenase を Cytotoxicity Detection kit™ (Roche) にて測定する。一方生細胞数測定は、0.25% トリパンブルー (Invitrogen) を用い行う。

(2) 歯髄肝細胞の分離と培養

① 歯髄の採取と培養

抜去歯を破碎し、歯髄を採取する。採取した歯髄を細切後 0.05%トリプシン+0.05%EDTA を 30 分から 1 時間作用させ strainer を通した後、DMEM/F12 medium with 20%FCS 中に 72 時間静置する。その後、DMEM/F12 培地 10%FCS にて継代培養する。最大 7 代までの継代とする。すでに、予備実験で DPSC の存在を確認している^{1, 2}。

② DPSC の分離

本研究では、マイクロ磁気ビーズ付き抗 CD271 抗体である MSC Research Tool Box-CD271 (Mitenyl Biotech GmbH, Germany) あるいは、抗 CD44 抗体にて自製したマイクロ磁気ビーズを作用させ、AutoMax™ separator (Mitenyl Biotech

GmbH, 購入予定)にて DPSC を分離する^{1, 2}. セルソーターは、分離後の生存率が低くなるため本研究では用いない。

③ DPSC 回収率の確認

CD271 にて細胞分離した場合は CD44-FITC 染色, CD44 の場合は CD271-FITC 染色そして PI immunofluorescence にて Gava EasyCyte™ (GE, USA) を用い確認する^{1, 2}.

(3) アポトーシスシグナル伝達機構

Caspase 活性を Caspase 3 Detection Kit™, Caspase-9 Colorimetric Assay Kit-100 Assays™, Caspase-8 Assay Kit-100 Assays™ (コスモバイオ, 東京) にて測定する. ミトコンドリアからの逸脱チトクローム C は Cytochrome C ELISA (コスモ・バイオ, 東京) により定量を行う. ミトコンドリアでの ROS の産生は MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator (Invitrogen, USA) と Gava EasyCyte™ (GE) にて ROS 陽性細胞数を測定する. カスパーゼ 3, 4, 6, 8, 9, 10 の膜透過性インヒビター (コスモ・バイオ) の曝露下でのアポトーシス阻害を Cell Death Detection ELISA kit™ (Roche) にて観察する.

(4) 肝臓様細胞の分化

幹細胞が 70% コンフルエントになったところで、20 ng/mL recombinant human hepatocyte growth factor (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN) と 2% FCS を添加した DMEM で 5 日間培養した。さらに 20 ng/mL recombinant human hepatocyte growth factor (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN) と 2% fetal calf serum、10 ng/mL Oncostatin M (R&D Systems Inc)、10 nmol/L dexamethasone (Wako Pure Chemicals)、1% Insulin-Transferrin-Selenium-X (Invitrogen) を添加した DMEM で 15 日間培養を行った。

(5) 膵臓様細胞の分化

2% FBS - DMEM に HGF - 20 ng/ml、FGF - 10 ng/ml を添加し、幹細胞を 5 日間培養した。次に、HGF - 20 ng/ml、EGF - 20 ng/ml、FGF - 10 ng/ml、β ME - 100 μM を添加

7 日間培養した。途中一回培地を交換した。最後に 2% FBS - IMDM に HGF - 20 ng/ml、Nicotinamid - 10mM を添加し 7 日間培養した

4. 研究成果

(1) 硫化水素ラット胚細胞への影響

ラット胚細胞に 50ng/mL 硫化水素を 24 時間、48 時間暴露したところ、5 割近いネクロージスを発現した。アポトーシスも発現したがネクローシスが主体であった。

一方、500 μg/mL NaHS で 12 時間インキューベーションでは、変化は見られなかった。

(2) 市販ヒト上皮由来 Keratinocyte stem cells をに 50ng/mL 硫化水素を 24 時間、48 時間暴露したところ、アポトーシスが発現した。24 時間で約 20% の細胞がアポトーシスを惹起し、48 時間では 37.8% ± 5.4 に対しコントロールが 4.7% ± 0.9 ($p < 0.01$, ANOVA) であった。ROS、ミトコンドリア脱分極、cytochrome C 遊離も増加した。caspase-9 や caspase-3 は増加したが、caspase-8 は増加しなかった。

(3) ヒト乳歯・智歯歯髄から幹細胞分離
ヒト乳歯・智歯歯髄から、幹細胞を分離して cell line 化した。すなわち CD117 陽性細胞を磁気分離し継代培養した。ただし 4-5 代毎に CD117 陽性細胞を磁気分離する必要があった。これらの細胞は CD117、CD44H、OCT3/4、nanog、nestin、CK19、ALP、SPARC、P63 は陽性であった。しかし CK18 には陰性であった。

(4) 肝細胞養分化

上記細胞を、hepatic growth factor、dexamethasone、Insulin-transferrin-selenium-x、oncostatin 存在下で培養し、肝臓様細胞を誘導した。Albumin、AFP、HNF 4α、IGF-1 は陽性で、グリコーゲン合成を認め、尿素合成量もコントロールに比べ有意に増加した。

(5) 膵臓様細胞への分化

前述のように HGF、FGF、EGF、β ME、Nicotinamid 存在下で膵臓様細胞に分化させたところ、インシュリン陽性細胞、グルカゴン陽性細胞、ソマトスタチン陽性細胞が確認された。

(6) 無血清培地による幹細胞の培養

無血清培地 (SFM) を4種作製した、SFM#1は 1% ITS-X と 100 µg/ml of Embryo-trophic Factor (ETF); SFM#2は 1% Insulin-Transferrin-Selenium-X; SFM#3は100 µg/ml ETF; SFM#4は100 µg/ml ETF、 1mM Sodium Pyruvate、 25µg/ml Ascorbic Acid、4ng/ml FGF-a からなる。なかでもSFM#1が、最も良好な増殖能、生存率そして幹細胞マーカー発現を示した。さらに、肝臓様細胞を誘導したところ、Albumin、AFP、HNF 4α、IGF-1は陽性で、グリコーゲン合成を認め、尿素合成量もコントロールに比べ有意に増加した。

(7) 硫化水素の幹細胞への影響

ヒト乳歯・智歯歯髄から、幹細胞を分離して cell line 化した CD117 陽性細胞を 50ng/mL 硫化水素に 48 時間暴露した。その結果、24 時間で 16.3 ± 1.87%の細胞がアポトーシスを惹起した、対照は 1.6%であった。ミトコンドリア脱分極も、対照の 7.2%に比べ 29.2 ± 7.2%と有意に増加し、cytochrome C 遊離も対照の 0.1 ng/mL に比べ 0.8 ± 0.1 ng/mL と有意に増加した。caspase-9 や caspase-3 も、それぞれ有意に増加したが、caspase-8 は増加しなかった。以上より、硫化水素はミトコンドリア経路を経て、幹細胞にアポトーシスを発生する事が分かった。

(8) 肝臓様細胞分化・膵臓様細胞分化への硫化水素の影響

幹細胞を hepatic growth factor, dexamethasone, insulin-transferrin-selenium-x, oncostatin 存在下で培養し、肝臓様細胞を誘導した。Albumin, AFP, HNF 4α, IGF-1 は陽性で、グリコーゲン合成を認め、尿素合成量もコントロールに比べ有意に増加した。この際更に、0.1ng/mL H₂S 下で分化させたところ、上記のいずれも発現が増加し、硫化水素は肝臓分化を促進する事が証明された。HGF、FGF、EGF、βME、Nicotinamid 存在下で膵臓様細胞に分化させる際、硫化水素に曝露させたところ膵臓様分化抑制された。

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 10 件)

1. Kobayashi C, Yaegaki K, Calenic B, Ishkitiev N, Imai T, Ii H, Aoyama I, Kobayashi H, Izumi Y, Haapasalo M, Hydrogen sulfide causes apoptosis in human pulp stem cells, *J Endod* 37:479-84, 2011
2. Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Nakahara T, Mitev V, Haapasalo M, Deciduous and Permanent Dental Pulp Mesenchymal Cells Acquire Hepatic Morphological and Functional Features in vitro, *J Endod*, 36:469-474, 2010
3. Calenic C, Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Kumazawa Y, Nasu M, Hirata T, Magnetic separation and characterization of keratinocyte stem cells from human gingiva. *J Periodont Res* 45: 703-708, 2010
4. Ito S, Shimura S, Tanaka T, Yaegaki K, Myrsinoic Acid B Inhibits the Production of Hydrogen Sulfide by Periodontal Pathogens, *J. Breath Res.* 4:026005 2010
5. Hirata TM, Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Ishikawa H, Nakahara T, Mitev V, Tanaka T, Haapasalo M, Expression of multiple stem-cell markers in dental-pulp cells cultured in serum-free media *J Endod* 36:1139-1144, 2010
6. Calenic C, Yaegaki K, Kozhuharova A, Imai T. Oral Malodorous Compound Causes Oxidative Stress and p53-Mediated Programmed Cell Death in Keratinocyte Stem Cells, *J Periodont* 81,1317-1323, 2010
7. Ii H, Imai T, Yaegaki K, Irie K, Ekuni D, Morita M, Oral Malodorous Compound Induces Osteoclast Differentiation without RANKL, *J Periodont* 81:1691-1697, 2010
8. Calenic B, Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Costache M, Tovar M, Tovar S, Parlatescu I, Characterization of oral keratinocyte stem cells and prospects of its differentiation to oral epithelial equivalents. *Rom J Morphol Embryol* 51:641-645, 2010
9. Calenic B, Yaegaki K, Murata T, Imai T, Aoyama I, Sato T, Ii H. Oral malodorous compound triggers mitochondrial-dependent apoptosis and causes genomic DNA damage in human gingival epithelial cells. *J Periodont Res.* 45: 31-37, 2010.
10. Fujimura M, Calenic B, Yaegaki K, Murata T, Ii H, Imai T, Sato T, Izumi Y : Oral mal odorous compound activates mitochondrial pathway inducing apoptosis in human gingival fibroblasts,

Clinical Oral Investigations, 14:367-373, 2010.

[学会発表] (計 12 件)

1. Yaegaki K., Ishkitiev N, Hirata T.M., Calenic B, Ishikawa H, Nakahara T., Mitev V, Tanaka T, Haapasalo M. Developing Serum-free Media for Mesenchymal Dental Pulp Stem Cells. Journal of Dental Research 88, Special Issue B, 2010.
2. Ishkitiev N, Yaegaki K., Traykova A, Nakahara T., Mitev V, Ishikawa H. Hepatic Differentiation of Dental Pulp Cells with Serum Free Medium. Journal of Dental Research 88, Special Issue B, 2010.
3. Calenic B, Yaegaki K. Magnetic Separation and Characterization of Keratinocyte Stem-cells from Human Gingiva. Journal of Dental Research 88, Special Issue B, 2010.
4. Calenic B, Okamura K, Yaegaki K., Tovar S, Apoptosis markers in oral lichen planus The 58 General Session of Japanese Association for Dental Research (IADR Japanese Branch), Kokura, Japan, November 27-28, 2010
5. Kobayashi C, Yaegaki K., Calenic B, Ishkitiev N, Imai T, Kobayashi H, Izumi Y, Haapasalo M, Hydrogen sulfide causes apoptosis in human pulp stem cells, IADR - Pulp Biology and Regeneration Group: Tissue and Regeneration, Geneva, July 18 - 20th, 2010.
6. Yaegaki K., Ishkitiev N, Kozhuharova A, Calenic B, Imai T, Mitev V, Dental pulp tissue may involve multipotent stem cells, IADR - Pulp Biology and Regeneration Group: Tissue and Regeneration, Geneva, July 18 - 20th, 2010.
7. Ishkitiev N, Calenic B, Yaegaki K. Oral malodorous compound activates apoptosis in human keratinocyte stem cells via mitochondrial pathway, Breath2009, The 8th congress of of International Society for Breath Odor Research, Dortmund, Germany, April 24-30, 2009,
8. Calenic B., Ishkitiev N., Yaegaki K., Volatile sulfur compound triggers mitochondrial-depended apoptosis in gingival cells, Breath2009, The 8th congress of of International Society for Breath Odor Research, Dortmund, Germany, April 24-30, 2009.
9. Bogdan C, Aoyama I, Fujimura M, Yaegaki K. Oral malodorous compound activates mitochondrial- depended apoptosis in gingival cells. Journal of Dental Research 87, Special Issue B, 2009
10. Ishkitiev N, Nakahara T., Mitev V, Yaegaki K. Hepatic lineage differentiation of milk and third molar

pulp cells Journal of Dental Research 87, Special Issue B, 2009.

11. Calenic B, Yaegaki K., Murata T, Fujimura M, Hydrogen Sulfide Induces Apoptosis in Human Gingival Epithelial Cell Line. Journal of Dental Research 87, Special Issue B, 2008.
12. Ishkitiev N, Nakahara T., Calenic B., Mitev V., Yaegaki K., Stem Cell-like Characteristics of Dental Pulp and Bone Marrow Cells, Journal of Dental Research 87, Special Issue C, 2008.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 幹細胞培養用も無血清培地
発明者 : 八重垣 健、イシキチェフ ニコライ、石川 博、ヒラタ タイス ミユキ、カレニック ボグダン
権利者 : 日本歯科大学
種類 : 特許
番号 : 特願 2010-046730
出願年月日 : 平成 22 年 3 月 3 日
国内外の別 : 国内

○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 なし

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
八重垣 健 (YAEGAKI KEN)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号 : 40166468
- (2) 研究分担者
中原 貴 (NAKAHARA TAKA)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号 : 10366768
- (3) 連携研究者 なし
()
研究者番号 :
- (4) 研究協力者
Calenic B.、Ishkitiev N.、伊井久貴、青山いずみ

日本歯科大学大学院・生命歯学研究科・
学生