

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592192

研究課題名（和文）歯髄細胞を用いた硬組織再生の試み

研究課題名（英文）Development of methodology for the hard tissue regeneration using dental pulp cells

研究代表者

深澤 加與子（FUKASAWA KAYOKO）

松本歯科大学・大学院歯学独立研究科・准教授

研究者番号：60064698

研究成果の概要（和文）：高密度培養歯髄細胞は、骨芽細胞に比べ、非常に高い細胞外基質石灰化能を示す。培養歯髄細胞を用いたマイクロアレイ解析、遺伝子過剰発現、およびノックダウン実験の結果、annexin A8が高石灰化能責任遺伝子であることを証明した。また、三次元高密度培養歯髄細胞をマウスへ移植すると、造血機能を伴う骨が再生した。本研究により、歯髄細胞は annexin A8 を介して、高い骨再生能力を発揮する特徴的な細胞であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We characterized dental pulp cells in comparison with osteoblasts and explored the mechanisms of calcification. We found that densely cultured dental pulp cells exhibited stronger ECM (extracellular matrix) calcification activity than osteoblasts. A microarray analysis showed the overall gene expression in dental pulp cells to be similar to that in osteoblasts, though dental pulp cells expressed higher level of annexin A8. Then, we examined the effect of overexpression and knockdown of annexin A8 on ECM calcification in osteoblasts and dental pulp cells. Overexpression of annexin A8 remarkably induced ECM calcification in osteoblasts. In contrast, knockdown of annexin A8 in dental pulp cells suppressed ECM calcification. We transplanted three-dimensional culture of dental pulp cells into immunocompromised mice and found that the grafts generated bone in which hematopoiesis was carried out. Taken together, these results suggest that transplanted dental pulp cells exert bone regenerative activity through the expression of annexin A8.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,290,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学
キーワード：歯髄細胞，再生医学，石灰化機構，硬組織再生

1. 研究開始当初の背景

歯髄組織は神経堤由来の外胚葉性間葉細胞と、中胚葉由来間葉細胞の2種類の細胞から分化する。成体における神経や象牙芽細胞、頭部の骨や筋の一部は神経堤由来である。したがって、歯髄の神経堤由来間葉細胞は神経細胞や象牙芽細胞への分化能を持つ可能性がある。一方、歯髄の中胚葉由来間葉細胞は、骨芽細胞、軟骨細胞、腱細胞などへの多分化能を有する。歯髄細胞はこのように多分化能を有する可能性があり、さらに脱落乳歯や智歯、抜去歯などから採取可能であるため、再生医学において有望な材料である。

そこで申請者らは、歯髄細胞の多分化能および歯髄組織採取の簡便性を鑑み、歯髄細胞を用いた再生医療研究に着手した。

2. 研究の目的

- (1) 培養歯髄細胞の特性の分子生物学的解析。
- (2) 確実に硬組織再生が可能である歯髄細胞の培養条件の検討。
- (3) 歯髄細胞の生体移植による再生硬組織能の性状解析。

3. 研究の方法

- (1) 歯髄細胞の特性は、骨芽細胞を対照として解析した。まず、①細胞外基質石灰化能の差異について調べた。②歯髄細胞の高石灰化能責任因子の候補を絞るため、マイクロアレイ解析を行った。③高石灰化能責任因子の候補について、骨芽細胞での過剰発現、歯髄細胞での発現抑制（ノックダウン）実験を行った。
- (2) 生体移植へ持ち込む前の、歯髄細胞の培養法について検討した。
- (3) 歯髄細胞を重度免疫不全マウスに移植

し、3週間後、および2ヶ月後に移植片を回収し、組織学的な解析を行った。

4. 研究成果

- (1) ①高密度培養の歯髄細胞は骨芽細胞に比べ、非常にアルカリフォスファターゼ活性が高く、細胞外基質の石灰化能も高かった。骨芽細胞の基質石灰化は、pan-BMP antagonistであるNogginの添加により完全に阻害されたが、歯髄細胞の石灰化はNogginにより全く影響を受けなかった。この結果より、歯髄細胞はBMP非依存的に石灰化することが示唆された。
 - ②マイクロアレイ解析の結果、歯髄細胞と骨芽細胞の総括的な遺伝子発現パターンは、酷似していた（相関係数 $r=0.95$ ）。しかし、歯髄細胞は骨芽細胞に比べ、BMP-2, 5, 7, およびカルシウムおよびリン酸の濃度調節因子（annexin A8 及び Slc20a2）の mRNA 発現が高いことがわかった。
 - ③骨芽細胞に annexin A8 及び Slc20a2 をそれぞれ過剰発現させたところ、BMP非存在下においても著しく石灰化するようになった。特に annexin A8 の過剰発現による石灰化亢進が顕著であった。一方、培養歯髄細胞において siRNA により annexin A8 及び Slc20a2 の発現をそれぞれ抑制すると、石灰化能が低下した。
- (2) *in vivo* での硬組織形成能を指標にして、歯髄細胞の培養法について検討した実施した。その結果、100%の確立で *in vivo* での硬組織形成が成立する培養条件を確立できた。具体的にはマウス歯髄細胞を一週間培養した後、継代の際、歯髄細

胞けん濁液を吸収性コラーゲンスポンジである gelfoam™ 内に浸漬し、さらに一週間培養した。gelfoam™ は隙間が多いので、この gelfoam™ 内を歯髄細胞で充填するために、gelfoam™ を、コラーゲングル(Cellmatrix Type I-A, Nitta gelatin)内に留置してさらに一週間培養した。そして gelfoam™ 周囲に細胞がアウトグロースしているのを確認後、周囲のコラーゲングルを含む形で取り出し重度免疫不全マウスへ移植した。

- (3) 移植後 3 週間後に、軟 X 線撮影より石灰化組織の誘導を認め、組織学的解析により TRAP 陽性破骨細胞の出現を認めた。移植後 3 週間後には、造血機能を持つ骨と骨様象牙質の 2 種類の組織の誘導を認めた。

以上、本研究により培養歯髄細胞は annexin A8 を介して、高い骨再生能力を発揮する特徴的な細胞であることが明らかとなった。今後、annexin A8 を分子標的として、再生硬組織の質の向上を目指していく予定である。

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 9 件)

- ① Naruse K, Fukuda M, Hasegawa H, Yagami K, Udagawa N.; Advanced alveolar bone resorption treated with implants, guided bone regeneration, and synthetic grafting: a case report. *Implant Dent* (査読有)**19**:460-467, 2010
- ② Fukasawa KM, Hirose J, Hata T, Ono Y. In rat dipeptidyl peptidase III, His⁵⁶⁸ is essential for catalysis, and Glu⁵⁰⁷ or Glu⁵¹² stabilizes the coordination bond between His⁴⁵⁵ or His⁴⁵⁰ and zinc ion. *Biochim Biophys Acta* (査読有)**1804**: 2063-2069, 2010
- ③ 中村美どり, 中道裕子, 宇田川信之; 骨吸収と骨形成の調節機構の解明を目指す日本歯科評論(査読無)**70**: 9-11, 2010
- ④ Lee JW, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Udagawa N, Takahashi N, Im NK, Seo HJ, Jeon WB, Yonezawa T, Cha BY, Woo JT.; Alisol-B, a novel phyto-steroid, suppresses the RANKL-induced osteoclast formation and prevents bone loss in mice. *Biochem Pharmacol* (査読有) **80**:352-361, 2010
- ⑤ Takahashi M, Mizoguchi T, Uehara S, Nakamichi Y, Yang S, Naramoto H, Yamashita T, Kobayashi Y, Furusawa K, Udagawa N, Uematsu T, Takahashi N.; Docetaxel inhibits bone resorption through suppression of osteoclast formation and function in different manners. *J Bone Miner Metab* (査読有)**27**:24-35, 2009
- ⑥ Uchiyama M, Nakamichi Y, Nakamura M, Kinugawa S, Yamada H, Udagawa N, Miyazawa H.; Dental pulp and periodontal ligament cells support osteoclastic differentiation. *J Dent Res* (査読有)**88**: 609-614, 2009
- ⑦ Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T, Hosoya A, Ninomiya T, Nakamura H, Yamamoto Y, Kinugawa S, Nakamura M, Nakamichi Y, Kobayashi Y, Nagasawa S, Oda K, Tanaka H, Tagaya M, Penninger JM, Ito M, Takahashi N.; Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *J Cell Biol* (査読有)**184**:541-554, 2009
- ⑧ Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N.; Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene*

Expr (査読有)19:61-72, 2009

- ⑨ 中道裕子, 小林泰浩, 宇田川信之 (2009)
RANKL/RANK/OPG システムと骨吸収性疾患. **細胞** (査読無) **41**: 312-315

[学会発表] (計 7 件)

- ① 中道裕子; 破骨細胞形成における IL-34 の役割, 第 4 回骨・軟骨フロンティア, 2010 年 11 月 20 日, ベルサーレ八重洲(東京都中央区)
- ② 宇田川信之; 骨の再生を目指した破骨細胞・歯髄細胞・骨髄細胞に関する研究, 2010 年 11 月 19 日, 岡山大学歯学部 (岡山県岡山市)
- ③ 宇田川信之; 再生医療の基礎と歯科領域の応用, 第 1 回 歯髄細胞バンク学術フォーラム, 2010 年 7 月 18 日, 大手町サンケイプラザ (東京都千代田区)
- ④ 中道裕子, 萩原貴寛, 中村美どり, 今岡 朝代, 安孫子宜光, 中村浩志, 高橋直之, 宇田川信之; 歯髄細胞の高い骨再生能力は, Annexin A8 ロングフォームを介して発揮される, 第 70 回松本歯科大学学会, 2010 年 7 月 10 日, 松本歯科大学 (長野県塩尻市)
- ⑤ 中道裕子; 破骨細胞前駆細胞の形成と供給における M-CSF と IL-34 の役割, 第 9 回松本ボーンフォーラム, 2010 年 5 月 22 日, 松本歯科大学 (長野県塩尻市)
- ⑥ 宇田川信之; 歯髄細胞を用いた骨再生医療に関する橋渡し研究, 第 26 回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い, 2010 年 1 月 9 日, 歯科医師会館 (東京都千代田区)
- ⑦ 萩原貴寛, 中道裕子, 中村美どり, 中村浩志, 高橋直之, 宇田川信之: マウス歯髄細胞を用いた硬組織再生の試み, 第 50 回歯科基礎医学会, 2008 年 9 月 24 日,

TOC 有明コンベンションホール (東京都江東区)

[その他]
ホームページ等
<http://www.mdu.ac.jp/faculty/course/seika.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深澤 加與子 (FUKASAWA KAYOKO)
松本歯科大学・大学院歯学独立研究科・准教授
研究者番号: 60064698

(2) 研究分担者

中道 裕子 (NAKAMICHI YUKO)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号: 20350829

上原 俊介 (UEHARA SHUNSUKE)

松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 90434480

中村 美どり (NAKAMURA MIDORI)

松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 90278177

宇田川 信之 (UDAGAWA NOBUYUKI)

松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70245801

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

安孫子 宣光 (ABIKO YOSHIMITSU)
日本大学・松戸歯学部・生化学・分子生物学講座・教授
研究者番号: 70050086

萩原 貴寛 (HAGIHARA TAKAHIRO)

松本歯科大学・大学院歯学独立研究科・大学院生