

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20791347  
 研究課題名 (和文) 歯髄 SP 細胞を用いた象牙芽細胞分化機構の解析  
 研究課題名 (英文) An analysis of odontoblast differentiation mechanisms by using dental pulp SP cells

## 研究代表者

細矢 明宏 (HOSOYA AKIHIRO)  
 松本歯科大学・歯学部・講師  
 研究者番号：70350824

## 研究成果の概要 (和文)：

象牙芽細胞分化には多くの転写調節因子が関与しているが、象牙芽細胞特異的な分化因子は未だ不明である。本研究では、SUMO タンパク質および Osterix が幼弱象牙芽細胞で局在を示すが、成熟象牙芽細胞では発現が減弱することを明らかにした。従って、前象牙芽細胞から象牙芽細胞への分化には SUMO タンパク質および Osterix 発現が必要であるが、これらの発現は象牙芽細胞の成熟化に伴い減少することが象牙質形成において重要であると示唆された。

## 研究成果の概要 (英文)：

Although a number of studies suggest that many transcription factors participate in odontoblast differentiation, specific factors of odontoblast differentiation are still unknown. In the present study, immunohistochemical localizations for SUMO proteins and Osterix were visible in the immature odontoblasts; however these immunoreactivities were reduced in the mature odontoblasts. These results demonstrate that reduction of expressions for SUMO proteins and Osterix in the mature odontoblasts might be necessary for dentin formation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯髄, 象牙芽細胞, 分化

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎え、口腔疾患の予防と QOL の向上を目指した歯科医療が望まれており、歯科医療に対するニーズも高度化、多様

化している。このような状況下において歯の咬合機能を長期的にわたって維持させることが益々重要であると考えられ、象牙質・歯髄複合体の保存、保護の重要性が再認識されて

いる。一方、歯髄は外部からの侵襲に対して修復象牙質や被蓋硬組織の形成等を行う能力を有することが、多数の形態的研究により明らかにされている。しかしながら、修復過程における歯髄細胞から象牙芽細胞への分化機構は不明な点が多く、これらを解明することは歯髄組織の自己再生能を活性化させる生物学的治療法の開発に繋がるものと思われる。

象牙芽細胞の分化は、上皮-間葉相互作用が重要な働きを担っていると考えられているが、近年の歯髄幹細胞を用いた皮下移植実験により、歯髄細胞は単独でも象牙芽細胞に分化可能であることが示された (Gronthos S et al., PNAS, 13625-30, 2000 ; Miura M et al., PNAS, 5807-12, 2003)。しかしながら幹細胞を単離しないヘテロな歯髄細胞群の皮下移植では骨組織を形成することから (Hosoya et al., J Dent Res, 469-474, 2007), 歯髄細胞を象牙芽細胞へ分化させるためには、骨芽細胞分化とは異なる特別な転写調節因子の発現が必要であると考えられる。

歯の形態形成は、BMPs および TGF- $\beta$ s などの成長因子、Msx をはじめとする転写調節因子、その他 Shh, Wnt などの関与が重要であると考えられている。しかし、象牙芽細胞の分化に関与する遺伝子については、どの因子が重要であるのかはいまだ不明である。そこで本申請研究は、象牙芽細胞の分化因子を明らかにし、歯髄の有する自己修復・再生能力を賦活化する治療法の臨床応用により、歯を長期にわたり保存することを目指し、計画された。

## 2. 研究の目的

歯髄組織幹細胞をハイドロキシアパタイトと混和後、皮下へ移植するとほぼ半分の割合で象牙質または骨を形成することが報告されている。しかしながら、この幹細胞の分化過程において、何が象牙芽細胞あるいは骨芽細胞への分化を規定するのかはわかっていない。そこで、本申請研究では、象牙芽細胞の分化因子を探求する目的で、(1)歯髄 SP 細胞の皮下移植後に形成される象牙質および骨組織から RNA 抽出を行い、micro array による発現遺伝子の比較を行う。この実験は、同一の細胞群から分化した象牙芽細胞と骨芽細胞を比較するため非常に精度の高い発現遺伝子の比較を行うことができ、象牙芽細胞分化因子のスクリーニングに適していると考えられる。次に、(2)得られた候補遺伝子に対する in situ hybridization プローブまたは特異抗体を作成し、歯胚発生過程における象牙芽細胞での遺伝子発現を検討することにより、候補遺伝子の絞り込みを行う。(3)また、窩洞形成後の歯髄修復過程での発現を検討することにより、象牙芽細胞再生過

程での発現を検討する。さらにこれらの解析結果を基として、(4)象牙芽細胞特異的なトランスジェニックマウスを作成し、候補遺伝子の象牙芽細胞分化における機能を検索する。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯髄 SP 細胞の皮下移植実験による micro array 解析

実験材料には 6 週齢雄性 C57BL/6J マウスの下顎切歯歯髄を用いた。固有歯髄を歯から剥脱し、10%FCS 添加 Dispase II (Roche) にて 2 時間 (37°C) 処理後 Cell Strainer に通し、歯髄細胞を分離した。Hoechst33342 染色は、得られた細胞を Hoechst33342 添加 DMEM(2%FCS, 10mM HEPES; pH 7.5) 中で 90 分間培養した。その後、20  $\mu$ g/ml Propidium Iodide (PI) 添加 PBS にて細胞を懸濁し、SP 細胞分画にゲートをかけてソーティングした。

①  $10^7$  個の歯髄 SP 細胞を 100 mg hydroxyapatite/tricalcium phosphate ceramic powder (Zimmer) と 90 分 (37°C) rotator にて混和し、同型マウス頭部皮下へ移植した。

②移植 2, 6 週後に移植体を取り出し、TRIzol (Invitrogen) を用い RNA 抽出を行った。

③抽出した RNA の一部から cDNA を作成し、dentin sialophosphoprotein (dspp) の PCR 解析により象牙質あるいは骨パターンかを判別した。

④象牙質および骨パターンの総 RNA 量 50  $\mu$ g を抽出し、両者の micro array 解析を行った。検討は転写調節因子に注目し、差の大きい SUMO タンパク質および Osterix を候補遺伝子とした。

### (2) 歯胚発生過程における SUMO タンパク質および Osterix の発現検討

①micro array 解析で検討した候補遺伝子の in situ hybridization プローブもしくは特異抗体を作製した。

②胎生 15 日 (蕾状期), 胎生 17 日 (帽状期), 生後 1 日 (鐘状期), 生後 14 日 (歯根形成期) 齢ルイスラット下顎臼歯および生後 7 日齢下顎切歯の切片を作成し, in situ hybridization または免疫組織化学染色を行った。

### (3) 象牙芽細胞再生過程における SUMO タンパク質および Osterix の発現検討

①4 週齢雄性ルイスラットの上顎第一臼歯近心面に丸形カーバイドバーにて象牙質窩洞を形成し, 1, 3, 5, 7, 28 日後に 4%パラホルムアルデヒドによる固定を行った。

②脱灰後, パラフィン切片を作成し, SUMO タンパク質および Osterix の免疫組織化学染色

を行った。

#### (4) 象牙芽細胞特異的 Osterix トランスジェニックマウスの作成

①ラット DSP プロモーターの下流に SV40 modified intron, ヒト Osterix, GFP, polyA を挿入したコンストラクトを作成した。ラット DSP プロモーターは三重大学・山崎英俊教授 (Biochem Biophys Res Commun. 260:433-40, 1999) から供与されたもの, Osterix および GFP cDNA は ORIGENE 社 TrueORF cDNA Clones を用いた。

②作成したコンストラクトからベクター部分を除去し, 注入用 DNA を 50ng/ $\mu$ l に調整した。注入用 DNA を BDF1 マウス由来前核期胚に顕微注射し, 状態の良好な胚を仮親マウス (ICR) に移植した。

③得られた産仔の尾からゲノム DNA を抽出し, PCR 反応から遺伝子導入を確認後, 象牙質および象牙芽細胞の表現系を観察する。

### 4. 研究成果

#### (1) 歯髄 SP 細胞の皮下移植実験による micro array 解析

dspp 発現が高い群では移植後早期に Osterix および Ubiquitin-related like Modifier (SUMO) タンパク質 (SUMO1-3, UBC9) の発現がみられるが, 硬組織形成に伴い発現が減少した。一方, dspp 発現が低い群では, 硬組織形成細胞の成熟化に伴う発現減少はみられなかった。

#### (2) 正常歯胚発生過程における SUMO タンパク質および Osterix の発現検討

当初, in situ hybridization による遺伝子発現の検討を予定していたが, 作成したプローブが組織切片において hybridize しなかったため, 特異抗体を用いた免疫組織化学染色により評価した。一次抗体には, マウスモノクローナル抗ヒト SUMO1 抗体 (Santa Cruz, USA), SUMO2,3 抗体 (Santa Cruz) および UBC9 (Abcam) およびウサギポリクローナル抗マウス Osterix 抗体 (Abcam., Cambridge, UK) を, 二次抗体にはヒストファイン シンプルステイン ラット MAX-PO (MULTI; NICHIREI Co., Tokyo, Japan) を用いた。

##### ① 蕾状期歯胚 (胎生 15 日)

SUMO1, SUMO2-3, UBC9, Osterix は, 歯槽骨表面の骨芽細胞において局在を示すが, 歯胚においては局在は認められなかった。

##### ② 帽状期歯胚 (胎生 17 日)

SUMO タンパク質は内エナメル上皮および星状網細胞で陽性反応を示した。また, 一部の歯乳頭細胞にも陽性反応が認められた。Osterix は歯胚を構成する細胞では陰性であった。

##### ③ 鐘状期歯胚 (生後 1 日)

咬頭部において象牙質基質の形成が始まると, 基質を形成する象牙芽細胞で SUMO タンパク質の強い免疫反応が認められ, 一方, エナメル器の細胞では反応が減弱した。歯乳頭および歯小囊細胞は, ほとんど反応を示さなかった。

Osterix は, 咬頭部の象牙芽細胞で局在を示すが, 他の歯胚を構成する細胞では局在が認められなかった。

##### ④ 歯根形成期歯胚 (生後 14 日)

象牙芽細胞の成熟化に伴い, SUMO タンパク質は歯冠部および歯根部の象牙芽細胞で反応が減弱あるいは消失した。根尖部の幼弱象牙芽細胞は強い免疫局在を示したが, 前象牙芽細胞は陰性であった。ヘルトヴィッヒ上皮鞘の細胞は強陽性反応を示したが, エナメル芽細胞は弱陽性であった (図 1)。

Osterix 局在は, SUMO タンパク質とほぼ同様の局在を示したが, ヘルトヴィッヒ上皮鞘やエナメル芽細胞などの上皮細胞では陰性であった。

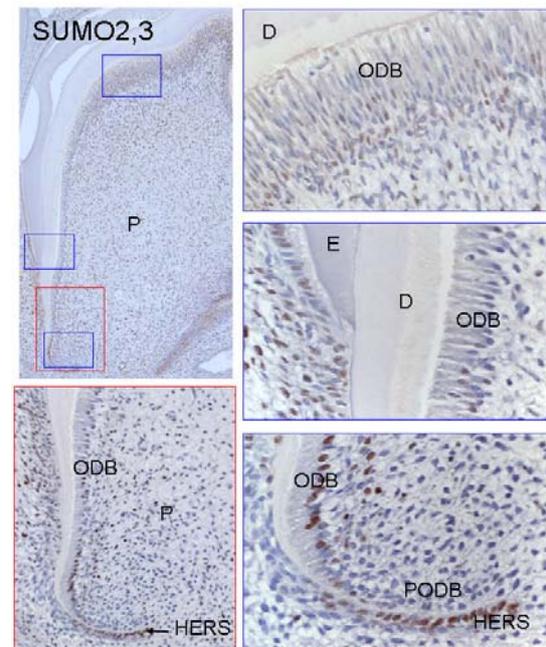


図 1 歯根形成期歯胚における SUMO2,3 局在

D, 象牙質; E, エナメル質; HERS, ヘルトヴィッヒ上皮鞘; ODB, 象牙芽細胞; P, 歯髄

##### ⑤ 切歯 (生後 7 日齢)

SUMO タンパク質はサービカルループ内エナメル状側の星状網細胞で弱陽性反応を示すが, 周囲の歯乳頭細胞は陰性であった。象牙芽細胞系列の細胞は, 前象牙芽細胞は陰性であるが, 象牙質形成が始まると陽性を示した。また, この象牙芽細胞は成熟化に伴い, 免疫反応性が減弱した。歯髄組織は, subodontoblastic layer の細胞で局在が認められた (図 2\*)。エナメル芽細胞も基質分泌

初期において陽性反応を示したが、前方部へ行くにつれ反応性が低下した。

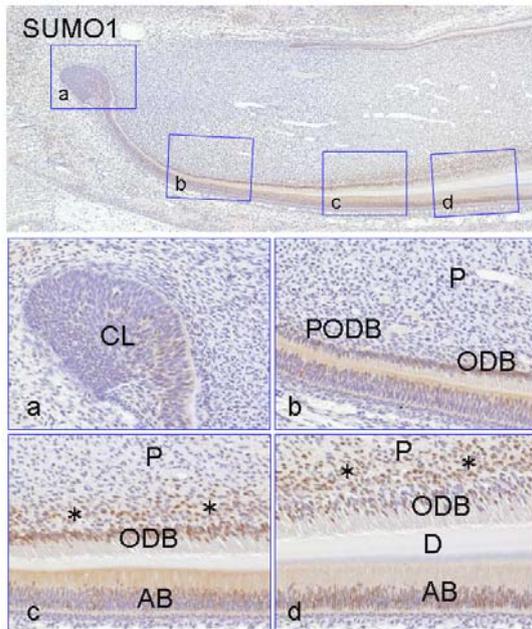


図2 切歯における SUMO1 局在

AB, エナメル芽細胞; CL, サービカルループ; D, 象牙質; ODB, 象牙芽細胞; P, 歯髄; PO DB, 前象牙芽細胞

以上より、SUMO タンパク質および Osterix は、分化初期の象牙芽細胞において強い発現がみられるが、象牙芽細胞の成熟化に伴い、発現が減少もしくは消失することが明らかとなった。

なお、*dspp* プロモーターの転写を調節すると予想される *Msx-1* (ウサギポリクロナル抗ヒト抗体, Lifespan Biosciences, USA), *SP1* (ウサギポリクロナル抗ヒト抗体, Spring Biosciences, CA, USA), *SRF* (ウサギポリクロナル抗ヒト抗体, Santa Cruz, USA), *c-Fos* (ウサギポリクロナル抗ヒト抗体, Santa Cruz), *c-jun* (ウサギポリクロナル抗ヒト抗体, Antagene Inc., USA), *TCF-1* (ヤギポリクロナル抗ヒト抗体, Santa Cruz, USA) の免疫局在も検討したが、歯胚発生過程において特異的な局在は認められなかった。

### (3) 象牙芽細胞再生過程における SUMO 化修飾タンパク質および Osterix の発現検討

次に窩洞形成後の象牙芽細胞再生過程における SUMO タンパク質および Osterix の局在を検討した。窩洞形成後 1 日では、象牙芽細胞層を含む一部の歯髄組織に変性がみられたが、歯髄組織全体の壊死には至らなかった。3 日後、窩洞直下の象牙質表面に細胞が集積し、これらの細胞は SUMO タンパク質ならびに Osterix の陽性反応を示した。また、この象牙質近傍の一部の細胞も局在を示した。7 日後になると修復象牙質が形成され、

その表面には大型で円柱状の再生象牙芽細胞が配列した。SUMO タンパク質ならびに Osterix はともに再生象牙芽細胞で局在が認められた (図 3)。28 日後、修復象牙質は厚みを増し、再生象牙芽細胞は立方形を呈した。再生象牙芽細胞における SUMO タンパク質ならびに Osterix の発現はほとんど消失した。

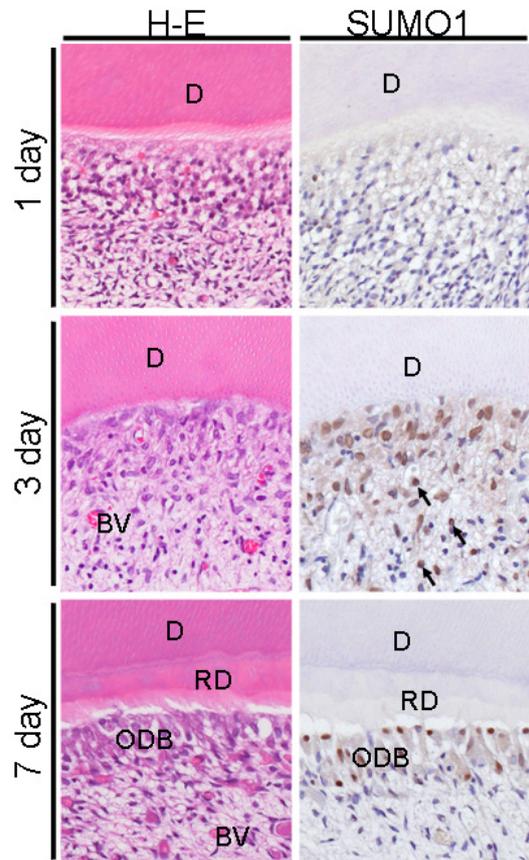


図3 窩洞形成後の象牙芽細胞再生過程における SUMO1 局在

BV, 血管; D, 象牙質; ODB, 再生象牙芽細胞; RD, 修復象牙質

以上の結果より、SUMO タンパク質および Osterix は、歯の発生および再生過程において形成初期の象牙芽細胞で共局在することが明らかとなった。また、これらのタンパク質が消失することが、象牙質基質形成に重要であると示唆された。今後、さらに SUMO タンパク質と Osterix の相互作用を検討する必要があると思われる。

### (4) 象牙芽細胞特異的 Osterix トランスジェニックマウスの作成

象牙芽細胞分化における Osterix の役割を明らかにする目的で、象牙質シアロタンパクプロモーターの下流に Osterix 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成した。実験に先立ち、組み換え遺伝子実験の審議と承認を「松本歯科大学動物実験委員会」およ

び「松本歯科大学遺伝子組み換え生物等安全管理委員会」により行った。現在、25系統のトランスジェニックマウスを得たことを確認している。これらの系統からホモのトランスジェニックマウスを作成し、象牙芽細胞分化におけるOsterixの機能を検討する予定である。

#### 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8件)

① Akihiro Hosoya, Tadashi Ninomiya, Toru Hiraga, Kunihiko Yoshiba, Nagako Yoshiba, Etsuo Kasahara, Hidehiro Ozawa, Hiroaki Nakamura (2010). Potential of periodontal ligament cells to regenerate alveolar bone. J Oral Biosci 52(2):72-80. 査読有

② Akihiro Hosoya, Jong-Min Lee, Ji-Youn Kim, Han-Sung Jung, Sung-Won Cho (2009). Expression of p63 during early craniofacial development of the mouse embryo. Dev Reprod 13(2):89-95. 査読有

③ 細矢明宏 (2009). 歯髄を用いた再生療法の試み. 歯界展望 113(6):1174-1175. 査読無

④ 細矢明宏 (2009). 歯根膜幹細胞を用いた歯周組織再生. The BONE 23(1):108-109. 査読無

⑤ Akihiro Hosoya, Jong-Min Lee, Sung-Won Cho, Ji-Youn Kim, Naoshi Shinozaki, Takahiko Shibahara, Masaki Shimono, Han-Sung Jung (2008). Morphological evidence of basal keratinocyte migration during the re-epithelialization process. Histochem Cell Biol 130(6):1165-1175. 査読有

⑥ Akihiro Hosoya, Tadashi Ninomiya, Toru Hiraga, Chen Zhao, Kunihiko Yoshiba, Nagako Yoshiba, Takahiro Okabe, Shigeyuki Wakitani, Hirohito Yamada, Etsuo Kasahara, Hidehiro Ozawa, Hiroaki Nakamura (2008). Alveolar bone regeneration of subcutaneously transplanted rat molar. Bone 42(2):350-357. 査読有

⑦ Akihiro Hosoya, Ji-Youn Kim, Sung-Won Cho, Han-Sung Jung (2008). BMP4 signaling regulates formation of Hertwig's epithelial root sheath during tooth root development. Cell Tissue Res

333(3):503-509. 査読有

⑧ 細矢明宏、二宮 禎、平賀 徹、Zhao Chen、吉羽邦彦、吉羽永子、高橋将文、岡部高弘、脇谷滋之、山田博仁、笠原悦男、小澤英浩、中村浩彰(2008). 歯根膜組織の歯槽骨再生能. The BONE 22(1):3-7. 査読無

[学会発表] (計2件)

① 細矢明宏 「歯根膜組織の歯槽骨再生能」第51回歯科基礎医学会学術大会 平成21年9月11日 新潟(J Oral Biosci (Supplement) 51:56, 2009)

② 細矢明宏、Zhao Chen、吉羽邦彦、吉羽永子、山田博仁、笠原悦夫、小澤英浩、中村浩彰 「再植歯の歯髓腔内における骨様組織形成」第128回日本歯科保存学会・春季学会 平成20年6月5日 新潟(日歯保誌51(春期特別号):88, 2008)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

細矢 明宏 (HOSOYA AKIHIRO)  
松本歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 70350824

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: