

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791387

研究課題名（和文） ヒト歯根膜組織再生に関連した遺伝子の同定

研究課題名（英文） Identification of genes related to the regeneration of human periodontalligament tissue

研究代表者

藤井 慎介（SHINSUKE FUJII）

九州大学病院・歯内治療科・助教

研究者番号：60452786

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト歯根膜組織再生に関連する遺伝子の同定を目的とした。当研究室にて樹立した未分化な細胞の特徴を有している2種の歯根膜組織細胞株（1-11細胞株および1-17細胞株）の間において、発現量が異なる遺伝子の検出を行った。その結果、発現量の異なる2420個の遺伝子が検出された。検出した遺伝子の1つである Transforming growth factor-1 (TGF-1) を1-11細胞株と共に培養した。細胞株の細胞増殖が抑制され、歯根膜組織構成線維である type I collagen、fibrillin-1 および分化マーカーである alpha smooth muscle actin の発現量が上昇した。

研究成果の概要（英文）：In this study, the purpose is to identify the genes that is related to the regeneration of human periodontal ligament tissue. In my laboratory, two undifferentiated PDL stem cell lines had been established, and had been named as cell line 1-11 or cell line 1-17. I identified 2420 genes of which expression level was different between these two cell lines. Of them, Transforming growth factor-1 (TGF-1) was cultured with line 1-11. TGF-1 suppressed the proliferation of line 1-11 and promoted the gene expression of type I collagen, fibrillin-1 and alpha smooth muscle actin in line 1-11.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1800000	540000	2340000
2009年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3200000	960000	4160000

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：ヒト・歯根膜・再生

## 1. 研究開始当初の背景

組織再生において、組織幹細胞、足場、そして増殖因子の3要素が必須である。これら

の中で、歯根膜組織幹細胞に関して、単一の幹細胞株を用いた研究は報告されておらず、詳細な歯根膜組織再生機構について明らか

になされていない。

## 2. 研究の目的

(1) 歯根膜組織再生研究に不可欠な歯根膜組織幹細胞を用いて、その細胞が分化および増殖するメカニズムの解明に必須の遺伝子を明らかにすることを目的とした。

(2) (1)において検出した遺伝子が歯根膜細胞の増殖および分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 当研究室にて樹立した2種の歯根膜組織幹細胞株(1-11細胞株および1-17細胞株)間において、発現量が異なる遺伝子の検出を行った。本研究では、細胞膜抗原(CD)タンパクとTransforming growth factor-1(TGF-1)について検討した。

CDタンパクの両細胞株における発現量について検討した。また、細胞株の中からこれらのCDタンパクを発現する細胞の分取を行った。

Transforming growth factor-1(TGF-1)が歯根膜細胞の増殖および分化に与える影響について検討した。

## 4. 研究成果

(1) マイクロアレイ法を用いて1-11細胞株および1-17細胞株間において発現量の異なる遺伝子を網羅的に検出した。この結果、両細胞株間において2420個の遺伝子が有為に発現量に差を認められた。

(2) 検出した遺伝子の中から細胞膜抗原について検討した。

1-11細胞株におけるCD24、CD37、CD66dおよびCD130の遺伝子発現量は、1-17細胞株のそれらの発現量より高いことが明らかになった。しかしながら、細胞組織化学的手法を用いてそれらのタンパク質の発現量を両細胞株間において比較したところ、発現量に差が認められなかった。

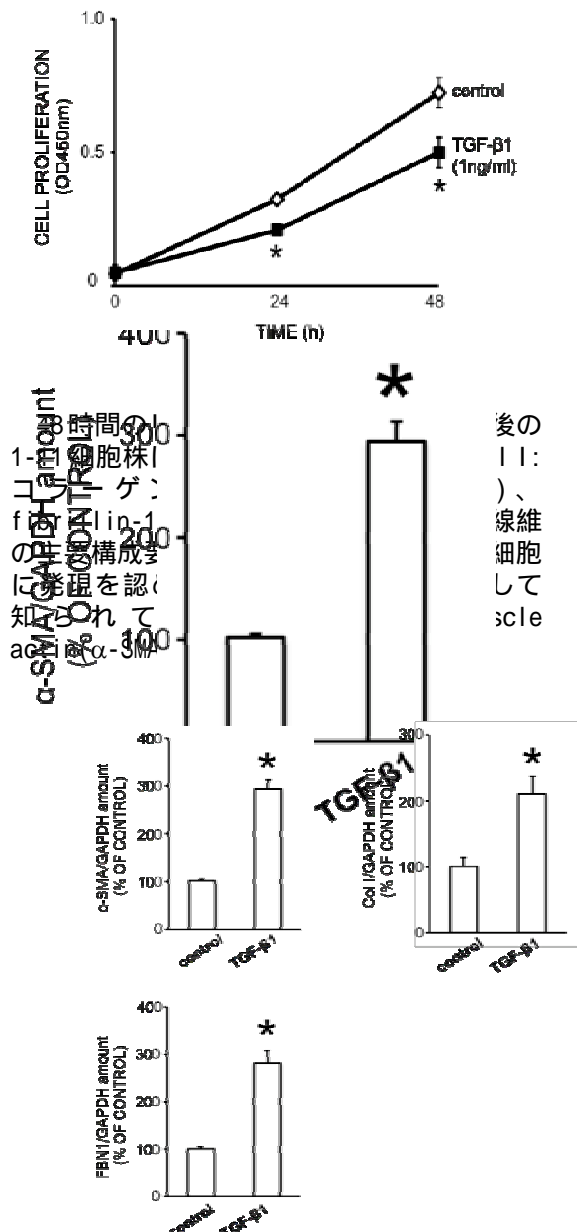
1-11細胞株の中からMagnetic-activated cell sorting (MACS)法を用いて検討したCDタンパクを発現している細胞の分取を試みたが、分取困難であった。

これらの結果から、検出した遺伝子群の中から細胞膜抗原を指標として、歯根膜組織幹細胞を分離および単離することは困難であることが明らかとなった。このため、遺伝子群の中からCDタンパク以外の遺伝子につい

て歯根膜細胞の再生に与える影響を検討することを計画した。

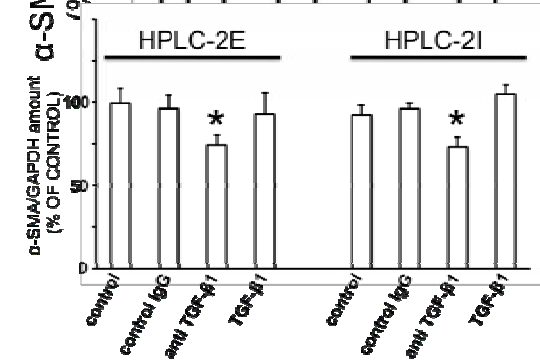
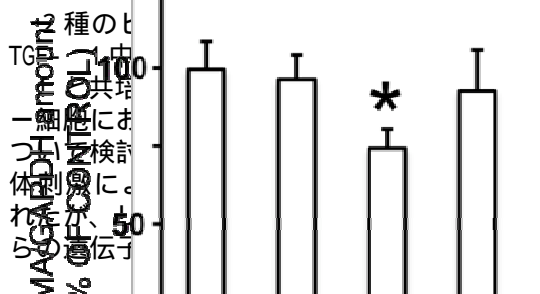
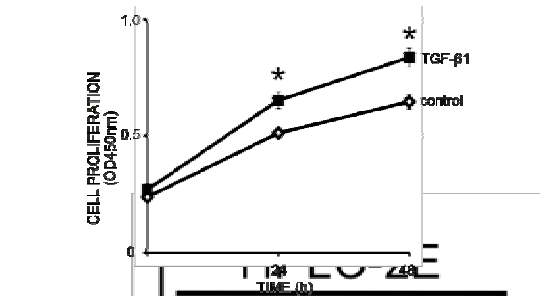
(3) 検出した遺伝子の中から選出したTGF-1が歯根膜細胞(1-11細胞株およびヒトブライマリー歯根膜細胞)に与える影響について検討した。

1-11細胞株にリコンビナントTGF-1刺激を行ったところ、刺激24および48時間後に細胞株の増殖が有為に抑制された。



これらの結果からTGF-1は歯根膜組織幹細胞の増殖を抑制し、歯根膜組織の機能維持に重要である線維合成能を有する細胞への分化を促すことが示唆された。

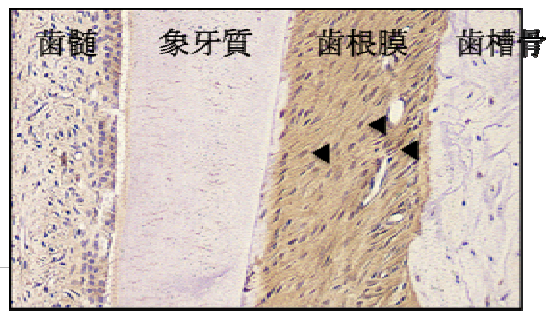
ヒトプライマリー細胞にリコンビナント TGF- $\beta$ 1 を添加すると細胞増殖が 24 および 48 時間後に有為に上昇した。



これらの結果から、分化した歯根膜細胞において、内因性 TGF- $\beta$ 1 により分化および線維合成が維持されていること、および外因性 TGF- $\beta$ 1 により分化および線維合成能に影響を与えないこと、が示唆された。

正常ラット歯周組織における TGF- $\beta$ 1 の発現について免疫組織化学的に検討した。その

結果、歯根膜組織において細胞および基質に強い TGF- $\beta$ 1 陽性反応が認められた。



HPLC-2I 陽性細胞

の結果より、正常歯根膜組織において TGF- $\beta$ 1 が高度に発現されており、その発現は分化した歯根膜細胞の細胞増殖および分化の維持をすること、また歯根膜幹細胞の増殖抑制およびその分化を促進することが示唆された。すなわち、TGF- $\beta$ 1 が歯根膜組織の恒常性の維持に重要な役割を果たしており、また、歯根膜組織再生において有用な因子であることが示唆された。

#### 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下線)

〔雑誌論文〕計 1 件)

Yasuda Y, Matsumoto Y, Fujii S, Maeda H, Akamine A, Torabinejad M and Saito T. Effect of MTAD on the differentiation of osteoblast-like cells. Journal of Endodontics. 査読有、36 巻、2010 年、260-263

〔学会発表〕(計 7 件)

Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Monnouchi S, Hori K and Akamine A. Expression and effects of TGF- $\beta$ 1 in periodontal ligament tissue. 87<sup>th</sup> General session & exhibition of the IADR/AADR/CADR. 2009 年 4 月 1 日 マイアミ 米国

Maeda H, Tomokiyo A, Fujii S, Monnouchi S, Wada N, Hori K and Akamine A. MTA stimulates BMP2 expression in human PDL cells. 87<sup>th</sup> General session & exhibition of the IADR/AADR/CADR. 2009 年 4 月 1 日 マイアミ 米国

友清淳、前田英史、藤井慎介、和田尚久、門野内聡、堀清美、内博史、古江増隆、赤峰昭文 AhR シグナルがヒト歯根膜細胞のコラーゲン代謝に及ぼす影響 全国油症会議 2009 年 6 月 8 日 福岡

藤井慎介、前田英史、友清淳、橋口勇、門野内聡、堀清美、和田尚久、赤峰昭文 TGF-

1 がヒト歯根膜細胞および前駆細胞の増殖  
および分化に及ぼす影響 第130回日本歯科  
保存学会 2009年6月11日 札幌

門野内聡、前田英史、藤井慎介、友清淳、  
堀清美、赤峰昭文 伸展力が負荷されたヒト  
歯根膜細胞のシグナル伝達には Angiotensin  
が関与している 第130回日本歯科保存学  
会 2009年6月11日 札幌

友清淳、前田英史、藤井慎介、和田尚久、  
門野内聡、堀清美、郡勝明、山本直秀、赤峰  
昭文 AhR シグナルがヒト歯根膜細胞のコラ  
ーゲン代謝に及ぼす影響 第131回日本歯科  
保存学会 2009年10月29日 仙台

Monnouchi S, Maeda H, Fujii S, Tomokiyo  
A, Hori K and Akamine A. Angiotensin is  
involved in the loading signal in  
stretched human PDL cells. 3<sup>rd</sup> Hiroshima  
Conference on Education and Science in  
Dentistry. 2009年11月8日 広島

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

研究代表者

藤井 慎介 (FUJII SHINSUKE)

研究者番号：60452786