

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：20791406

研究課題名 (和文) マウス ES 細胞を用いた象牙質再生の基礎的検討

研究課題名 (英文) A Study of Dentin Regeneration via Mouse Embryonic Stem Cells

研究代表者

尾関 伸明 (OZEKI NOBUAKI)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：70469005

研究成果の概要 (和文) : マウス ES 細胞 (mouse embryonic stem cells) を用いた象牙質再生を目的に、象牙芽細胞分化誘導メカニズムについて基礎的検討を行った。その結果、RA (レチノイン酸) と BMP (bone morphogenetic protein) -4 の添加による象牙芽細胞分化誘導により、長楕円型への明瞭な形態学的変化と象牙質分化マーカー (DSPP と DSP) が観察された。さらに、細胞表面タンパク integrin  $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$  と  $\alpha V\beta 1$  の発現が観察され、ラミニン-1 とコラーゲンタイプ I といった歯髄創傷治癒過程に関与する細胞外マトリックスに対して強い接着能と運動能を有する象牙芽細胞様細胞に分化することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : We have examined the mechanism of mouse embryonic stem cells differentiation to odontoblasts for the purpose of dentin regeneration. Morphological analysis indicated that retinoic acid (RA) and bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) induced differentiation to the odontogenic pathway. Differentiated cells showed DSPP and DSP; both markers of odontoblast differentiation. Moreover, we found significant integrin  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  and  $\alpha V\beta 1$  expression with increased adhesion and motility on laminin-1 and collagen type-I substrates. These interactions with the extracellular matrix (ECM) are indicative of dental pulp wound healing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：歯内療法学

## 1. 研究開始当初の背景

歯科領域において、う蝕などにより失われた象牙質や歯髄の再生を治療目的とする再生療法が注目されている。先行する医学領域に

おいては、角膜、軟骨、人工関節、血管や心筋の再生に関する臨床研究が盛んに行われている。

ES細胞 (embryonic stem cells, 胚性幹細胞)

は、身体をつくるあらゆる細胞に分化することができる細胞株と言われる。しかし、ヒト ES細胞を臨床分野で用いるためには、倫理上の問題や未分化能を維持するためのフィーダー細胞の混入を防ぐなどの問題により、日本における臨床での使用は事実上困難なものとなっている。その一方で、培養法などが確立されているマウス ES細胞を用いた歯周組織の再生の研究は、国内外で始まりつつある。

興味あることに、歯髄組織はう蝕や修復処置などの物理的あるいは化学的な刺激により象牙質を再生することができる潜在能力を有していることが明らかとなり、歯髄前駆体細胞あるいは歯髄幹細胞などが象牙質の再生に関与することが示唆されている。

## 2. 研究の目的

ヒト ES 細胞を用いた細胞導入治療法が、従来のう蝕治療法や覆髄法に代わる有効な手段となる可能性があると考え、マウス ES 細胞を用いた象牙質再生のメカニズムについて詳細な基礎的検討を行う。本研究の具体的到達目標は、(1)マウス ES 細胞を用いて神経堤細胞を分化誘導し、未だ再生のメカニズムが解明されていない象牙質再生を目標に、象牙芽細胞への分化メカニズムについて検討を行う。(2)マウスを用いた *in vivo* の実験系において象牙質再生を観察することである。以上 2 項目に関して詳細な基礎的検討を行い、将来的には新規な治療戦略、特に非侵襲的な治療法の構築を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経堤細胞分化誘導と評価

マウス ES 細胞を通常法に従い培養した後、*hanging drop* 法を施し、RA ( $10^{-7}$ M) 存在下で 3 日間、ペトリディッシュ上で浮遊培養させ、その後、コラーゲン上に細胞を播種し、7 日間培養を行い、神経堤細胞分化マーカーの FoxD3 と Sox10 の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて観察する。

### (2) 象牙芽細胞分化誘導とその評価

① (1)で分化誘導した神経堤細胞の TGF- $\beta$ 、BMP-2、Dental Matrix non-collagen proteins (DMNCPs)の添加群と BMP-4 の添加群の、1、3、5、7、10、14 日での形態学的変化を光学顕微鏡下で観察を行う。

②象牙芽細胞分化マーカー (DSPP:象牙質シアロリタンパク質) の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて観察する。

③象牙芽細胞分化マーカー (DSP:象牙質シアロタンパク質)のタンパク質発現を免疫染色法を用いて観察する。

(3)象牙芽細胞分化誘導における細胞表面タンパク *integrin* の発現変化をフローサイトメ

ーター用いて観察し、その発現変化が遺伝子制御されているものであるか、プロモーター assay を用いて証明を行う。

(4)歯髄創傷治癒に関与する細胞外マトリックス (ラミニン-1 とコラーゲンタイプ I) に対する細胞接着能と運動能の解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 神経堤細胞への分化誘導とその評価

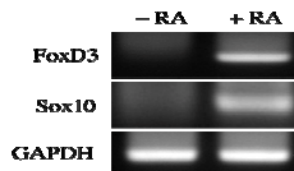


図1 神経堤細胞分化マーカーの mRNA 発現

RA 添加によりマウス ES 細胞に神経堤細胞分化マーカー (FoxD3, Sox10) の mRNA 発現が認められた。

### (2) 象牙芽細胞分化誘導とその評価

#### ① 形態学的変化について

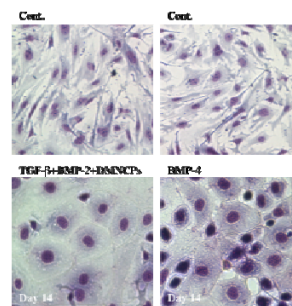


図2 象牙芽細胞分化誘導における形態学的変化

分化誘導した神経堤細胞への TGF- $\beta$ 、BMP-2、Dental Matrix non-collagen proteins (DMNCPs)の添加群と BMP-4 の添加群の両群において、10 日目から長楕円型への明瞭な形態学的変化が観察された。

#### ② 象牙芽細胞分化マーカー DSPP 遺伝子の発現について

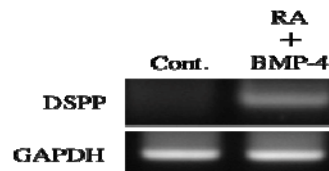


図3 象牙芽細胞分化マーカーの mRNA 発現

RA により誘導された神経堤細胞に BMP-4 を添加すると象牙芽細胞分化マーカー DSPP 遺伝子の発現が観察された。

③象牙芽細胞分化マーカーDSP タンパクの発現について

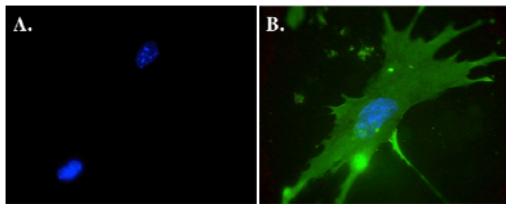


図4 象牙芽細胞分化マーカーのタンパク質発現

RAにより誘導された神経堤細胞にBMP-4を添加すると象牙芽細胞分化マーカーDSPタンパクの発現が観察された(A: cont., B: RA+BMP-4)

(3)①象牙芽細胞分化誘導における細胞表面タンパク integrin の発現変化について

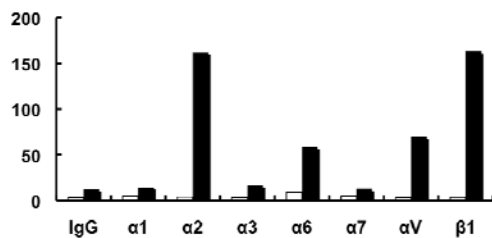


図5 FACSによる細胞表面 integrin の発現解析 (縦軸: Mean Fluorescence, gray bar: cont., black bar: RA+BMP-4)

RAとBMP-4による象牙芽細胞分化誘導により integrin  $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$ と $\alpha V\beta 1$ の発現が観察された。

②Integrin 発現の制御機構について

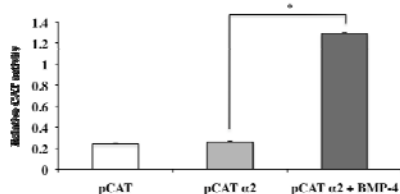


図6 プロモーターアッセイによる integrin 制御解析

Integrin  $\alpha 2$  プロモーターを使用したアッセイにより、RAとBMP-4による象牙芽細胞分化誘導における integrin の発現が遺伝子転写レベルで制御されていることが明らかとなった。

(4)細胞外マトリックス (ラミニン-1、コラーゲンタイプ I) に対する細胞接着能と運動能について

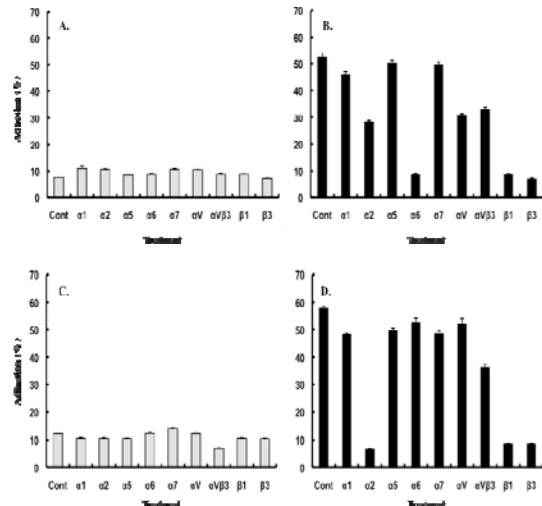


図7 細胞接着能 (A~D) の解析

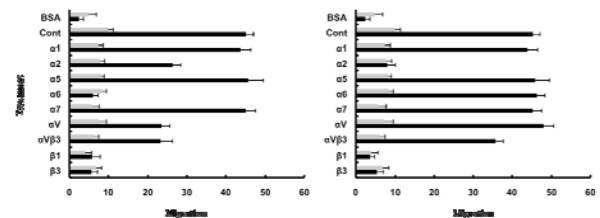


図8 細胞運動能の解析

RAとBMP-4による象牙芽細胞分化誘導により、歯髄創傷治癒に関与するラミニン-1 (A: cont., B: RA+BMP-4)とコラーゲンタイプ I (C: cont., D: RA+BMP-4) に対して強い接着能 (図7)と運動能 (図8左: ラミニン-1, 右: コラーゲンタイプ I, gray bar: cont., black bar: RA+BMP-4)を有することが明らかとなった。

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0件)  
なし

〔学会発表〕 (計1件)

①尾関伸明、マウスES細胞の象牙質分化能、第128回日本歯科保存学会春季学術大会、2008年6月5日、新潟・朱鷺メッセ

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)  
○取得状況 (計0件)

[その他]  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾関 伸明 (OZEKI NOBUAKI)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：70469005

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし