

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20791504

研究課題名（和文） ヒト歯胚組織幹細胞におけるオステオカルシン発現と血管内皮増殖因子誘導機構の解析

研究課題名（英文） Investigation of the mechanism of osteocalcin expression and VEGF induction in human dental pulp cells.

研究代表者

畠山 大二郎 (HATAKEYAMA DAIJIRO)

岐阜大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60377653

研究成果の概要（和文）：

ヒト歯胚組織幹細胞より分化誘導された骨芽細胞用細胞において、Bone morphogenetic protein (BMP) -2および、BMP-4は、ともにオステオカルシンの発現と血管内皮増殖因子の誘導を用量依存性に促進した。また、その発現は、p38 mitogen activated protein (MAP) キナーゼと、p44/p42 MAP キナーゼの両者を介して、誘導されることが示唆された。さらに、ヒト歯胚組織幹細胞において、血管内皮増殖因子はもともと高発現していたが、オステオカルシン発現はほとんど認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

Bone morphogenetic protein -2, -4 induces osteocalcin expression and vascular endothelial growth factor accumulation via p38 and p44/p42 mitogen activated protein kinases in human osteoblastic cells induced by human dental pulp stem cells. Moreover, it is suggested that the expression levels of vascular endothelial growth factor are very high in original human dental pulp stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：

歯髓組織幹細胞

オステオカルシン

血管内皮増殖因子

1. 研究開始当初の背景

骨代謝は、これまで骨芽細胞と破骨細胞の 2 種類の機能細胞が主として解析されてきたが、血管内皮細胞が果たす役割も重要視されるようになってきている。我々はこれまでに、血管内皮細胞により産生される血管作動物質であるエンドセリンが、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、Mitogen-activated protein (MAP) キナーゼの活性化を介して、血管内皮細胞の増殖・分化に影響をおよぼす血管内皮増殖因子 (VEGF) を産生することを明らかとした (Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001 281 E1260-1266)。さらに、MC3T3-E1 細胞における、VEGF の産生が、骨芽細胞の増殖・分化と密接に関連する Transforming growth factor(TGF)- β や Bone-morphogenetic protein(BMP)によっても MAP キナーゼの活性化を介して引き起こされることが確認され (Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003 284 E1202-1209、Arch Biochem Biophys. 2003 415 6-13)、骨代謝、とりわけ骨形成において VEGF は、重要な役割を担っていると考えられる。また、この MAP キナーゼは、骨芽細胞の分化マーカーであるオステオカルシンの誘導においても関与していることも明らかとしており (J Cell Biochem. 2002;85(3):621-628., J Cell Biochem. 2002;85(3):621-628.)、さらにスフィンゴミエリンが MAP キナーゼの上流において作用し、オステオカルシン発現を増加することを明らかとした。

これらの情報伝達経路の解明は骨芽細胞の骨代謝における役割を明らかにするために必須であると考えられる。しかしながら、骨芽細胞におけるこうした研究については、依然として不明なところが多く、その全容を解明するには至っていない。さらに、これまで培養細胞を用いた多くの機能的解析は、ヒト正常細胞を用いたものではなく、こうした細胞での解析は進んでいない。

一方、再生医学は近年目覚ましく発展しており、とりわけ既に形成されている組織中に存在して限定的な増殖能と分化能を

持つ「組織幹細胞」の再生医療への応用が期待されている。この組織幹細胞を得る方法として、主として、腸骨・顎骨などからの骨髓細胞の採取により行なわれているが、近年この完成前の智歯に「組織幹細胞」が含まれることが報告され (文献 1 - 3)、我々は、歯として完成する前に摘出した智歯 (「歯胚」) に着目し、「歯胚」から、効率的に組織幹細胞を採取・培養し、細胞株として保存を行なっている。

この歯胚由来間葉系組織幹細胞は、これまでの我々の研究において、骨髓より得られた組織幹細胞と比較して、その増殖能において明らかに高い増殖活性を示すこと、骨芽細胞誘導培地で培養することにより、硬組織形成能を有する細胞 (骨芽細胞、象牙芽細胞) に容易に分化誘導できることが明らかとなっている。このような組織幹細胞の分化における研究は広く行なわれているが、ヒト歯胚由来組織幹細胞から分化誘導した骨芽細胞における骨代謝にかかわる細胞内情報伝達経路などの解析はなされておらず、現在のところ、全く判っていない。

2. 研究の目的

TGF- β や BMP は、共に骨基質中に多く含まれるサイトカインであるが、これまでの研究で、MC3T3-E1 細胞において、この両者は、MAP キナーゼの活性化を介して、VEGF を産生していることが明らかになっている。さらに骨芽細胞の成熟度をあらかず分化マーカーの一つであるオステオカルシンの発現においても、この MAP キナーゼの活性化を介することが明らかとされている。一方、ヒト「歯胚」より我々が樹立した組織幹細胞株は、これまでの研究において、とりわけ硬組織形成能を有する細胞 (骨芽細胞、象牙芽細胞) に容易に分化誘導できる特徴を持つことが明らかとなっている。

そこで今回、ヒト歯胚由来組織幹細胞より分化誘導した骨芽細胞を用いて、BMP によるオステオカルシンの発現と細胞内情報伝達経路の解析、BMP による VEGF

の誘導と細胞内情報伝達経路の解析をおこない、ヒト骨芽細胞の骨代謝における役割を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

これまで樹立されてきた、ヒト歯胚由来の細胞株を用いて、採取された歯胚の時期ごとに、ヒト歯胚由来組織幹細胞より分化誘導した骨芽細胞の BMP によるオステオカルシン発現の情報伝達経路の解析の検討を行った。すなわち、ヒト歯胚由来組織幹細胞を骨芽細胞（象牙芽細胞）への分化・誘導を行い、その細胞を用いて、BMP2,4 で処理し、成熟骨芽細胞の分化マーカーであるオステオカルシンの発現における関与と、MAP キナーゼを中心としたその情報伝達経路を特異的阻害剤（PD98059、SB203580）で処理し、マウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞で得られている結果と比較検討した。オステオカルシンの誘導は、EIA 法にて測定した。MAP キナーゼの活性は、Western Blotting 法にて解析した。また、ヒト歯胚由来の細胞株を用いて、採取された歯胚の時期ごとに、ヒト歯胚由来組織幹細胞から分化誘導した骨芽細胞の BMP による VEGF 発現の情報伝達経路の解析の検討を行った。すなわち、ヒト歯胚由来組織幹細胞を骨芽細胞（象牙芽細胞）へ分化・誘導を行い、その細胞を用いて、BMP (BMP2,4) で処理し、VEGF 発現における情報伝達経路をこれまでマウス骨芽細胞様細胞で得られた結果と比較検討する。VEGF の産生は、ELISA 法を用いて解析・測定した。また、シグナル伝達経路の解析はプロテインキナーゼ阻害剤にて処理し、Western Blotting 法にて行なった。得られた結果は、MC3T3-E1 細胞で明らかとしてきた結果と比較検討した。

4. 研究成果

ヒト「歯胚」より我々が樹立した組織幹細胞株は、これまでの研究において、とりわけ硬組織形成能を有する細胞（骨芽細胞、象牙

芽細胞）に容易に分化誘導できる特徴を持つことが明らかとしてきた。また、硬組織のみならず、脂肪細胞への分化誘導も試み、その分化が確認された。さらに、ヒト歯胚由来組織幹細胞より骨芽細胞用培地にて分化誘導したヒト歯胚組織幹細胞において、アルカリフォスファターゼ活性が高度でありオステオカルシンの発現もそれに引き続いて引き起こされることを確認した。ヒト骨膜組織のプライマリーカルチャーより分化した骨芽細胞様細胞と比較して、ヒト歯胚組織幹細胞より誘導した骨芽細胞様細胞はアルカリフォスファターゼ活性が非常に高いことも確認された。また、このヒト歯胚組織幹細胞における血管内皮増殖因子の発現がもともと非常に高レベルに発現・分泌しており、骨芽細胞様細胞への分化誘導によって、血管内皮増殖因子の発現・分泌量が変化することを確認している。さらに、ヒト歯胚組織幹細胞から分化誘導した骨芽細胞様細胞におけるオステオカルシンの発現における細胞内情報伝達経路と、このヒト歯胚組織幹細胞から分化誘導した骨芽細胞様細胞における、血管内皮増殖因子の発現・誘導に関する、細胞内情報伝達経路の解析については、これまでのマウス骨芽細胞様細胞における情報伝達経路と同様に、MAP キナーゼの関与が示唆されており、BMP-4 および BMP-2 の刺激によって、p38MAP キナーゼおよび p44/p42 MAP キナーゼのリン酸化を引き起こすことが示された。

さらに、ヒト歯髓由来組織幹細胞より分化誘導をおこなわず未分化性を維持した状態の細胞においては、もともと血管内皮増殖因子は高度に発現・誘導されていることを確認しているが、BMP2 および BMP4 で処理して VEGF 誘導の解析を行なった。その結果、骨芽細胞に分化誘導した細胞においては、血管内皮増殖因子の誘導が BMP の用量依存性に増加するのに対して、未分化性を維持した状態の細胞（ヒト歯髓幹細胞）においては、BMP が用量依存性に、血管内皮増殖因子の誘導を抑制した。

以上のことより、BMP は、幹細胞においては、血管内皮増殖因子の誘導を抑制し（増殖抑制）、オステオカルシンの発現を促進（分化を誘導）す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は下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畠山 大二郎 (HATAKEYAMA DAIJIRO)

岐阜大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 60377653

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: