

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09947

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導メカニズムの歯科臨床応用

研究課題名(英文) Dental clinical application for induction of odontoblastic differentiation mechanism in Dental Pulp Stem Cells

研究代表者

梅村 直己 (Umemura, Naoki)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：80609107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究課題である歯髄幹細胞を象牙芽細胞様へと分化させる化合物として、我々はビタミンKの基本骨格であるナフトキノン誘導体に着目した。ナフトキノン誘導体を中心にスクリーニングをした結果、shikoninに歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導する機能を保持することを明らかにした。さらにshikoninによる歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導メカニズムを検証した。その結果、CD44の存在化でAkt-mTORの細胞内シグナル伝達を介して分化誘導していることを解明した。この研究成果は科学雑誌connective tissue researchにおいて公表している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古くから歯の中に含まれる未分化な細胞群が存在していることが知られていたが、近年の研究で、それらは「歯髄幹細胞」であり、多分化能を保持していることが知られるようになり、骨の再生や神経の再生治療への応用が試みられている。その一方で、歯の再生に向けて歯髄幹細胞の応用研究は少ない。そこで、本研究課題において、歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導するメカニズムを探究し、ビタミンKの基本骨格であるナフトキノン誘導体が歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導することを明らかにし、そのメカニズムも明らかにした。この発見により、歯科臨床応用への期待が高まった。

研究成果の概要(英文)：We focused on naphthoquinone derivatives, which are the basic skeleton of vitamin K, as a compound that differentiates dental pulp stem cells into odontoblast-like cells. As a result of screening mainly naphthoquinone derivatives, it was clarified that shikonin retains the function of inducing the differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. Furthermore, we verified the mechanism by which shikonin induces the differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. As a result, we clarified that the presence of CD44 induces differentiation through intracellular signal transduction of Akt-mTOR. The results of this research have been published in the scientific journal connective tissue research.

研究分野：歯科

キーワード：歯髄幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト歯髄からコラゲナーゼ処理し分離した歯髄幹細胞と造血幹細胞を比較した場合、歯髄幹細胞は細胞増殖能が速く、幹細胞として多分化能も造血幹細胞と同程度有すると報告されている。これ以降、さまざまな研究者により歯髄幹細胞の可能性が報告されており、*in vitro* において歯髄幹細胞から歯性分化誘導 (odontogenic differentiation) できるとの報告や、ヒト歯髄幹細胞 (hDPSC) が肝細胞への分化能を有すること、さらには培養条件によって膵臓のβ細胞への分化誘導などの報告がある。また、*in vivo* において、歯髄幹細胞 (DPSC) の移植で角膜上皮の再生可能との報告や、心筋の欠損したラットに hDPSC の移植による心筋の再生、や hDPSC によるラットの脊髄損傷再生、およびラット筋ジストロフィーモデルでの筋肉の再生報告、頭蓋顔面骨 (craniofacial bone) においてはコラーゲンゲルを足場にしたラット歯髄幹細胞で修復できるなど、さまざまな可能性を有することが報告されている。

一方、歯髄幹細胞のマーカーの一つである CD44 陽性細胞は歯髄組織内において、歯冠部よりの象牙芽細胞の一部と根末完成歯の根尖部に存在し石灰化に関与しているとの報告がある。また、先行研究において、歯髄幹細胞は CD44 を高発現し、CD44 のリガンドであるヒアルロン酸により骨分化に関連する bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), BMP-4 の mRNA に変化を示さない一方、象牙芽細胞のマーカーである象牙質シアロリンタンパク質 (dentin sialophosphoprotein: 以下、DSPP) と dentin matrix protein-1 (DMP-1) が mRNA だけでなく、タンパク質レベルで発現が上昇した。これらのことから、歯髄幹細胞を含む歯髄細胞は CD44 を介して象牙芽細胞へ分化することにより、石灰化に関与していることが予測できると考えられた。

しかしながら、ヒアルロン酸による CD44 を介した歯髄幹細胞の細胞内シグナルは MAPK, Akt などさまざまなシグナルを活性化するものの、歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化とそれらの活性化されたシグナルとの因果関係は明らかにされていない。また、ヒアルロン酸以外に歯髄幹細胞や象牙芽細胞様分化に効率的に誘導する試薬などの因子の報告は少なく、歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化誘導に CD44 が普遍的に関与しているのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

歯髄幹細胞を効率的に象牙芽細胞へ分化誘導する化合物の探究とそのメカニズムの解明を試みる。そして、その歯髄幹細胞を象牙芽細胞様分化誘導する新たな化合物の細胞内シグナルがヒアルロン酸と同じく CD44 を介したシグナルが重要であるのかどうかの検証を行った。

3. 研究の方法

ヒト歯髄幹細胞を用いて、化合物としてビタミン K の基本骨格であるナフトキノ誘導体の化合物から象牙芽細胞への分化誘導能の検証を行った。象牙芽細胞への分化マーカーとして DSPP をウエスタンブロッティング法を用いた。細胞増殖の測定は MTT assay をシグナル伝達経路のタンパク質や活性化は上スタンブロッティング法を用いた。

4. 研究成果

新たに歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導する可能性のあるものを探索するきっかけとしてビタミン K 群を中心としたナフトキノ誘導体関連の化合物について検証した結果、Shikonin にその能力があることが示唆された。Shikonin は生薬の紫根に含まれる天然赤色色素成分である。紫根 (Lithospermum erythrorhizon) は草原に自生する多年草で根は太く、紫色である。生薬として根を使用し、Shikonin の主成分 (0.5~1.5% 含有) となっている。2 世紀の古代中国の薬物書「神農本草経」には薬草の言明が収載されてお

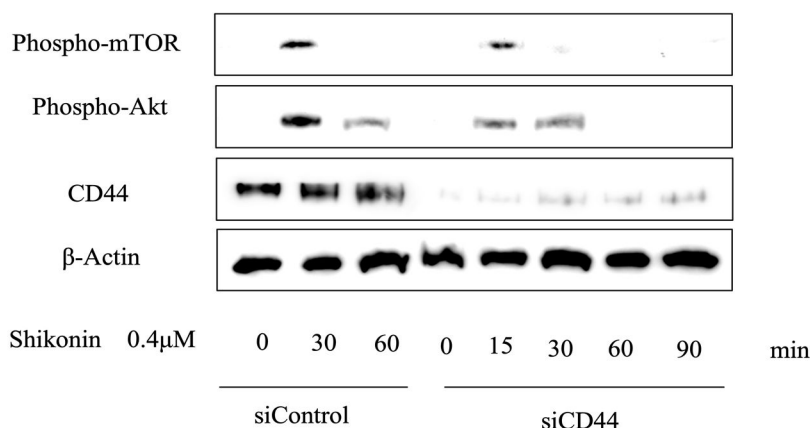


図 1 CD44 抑制下における shikonin による Akt と mTOR 活性

り,古くからその薬効は様々な疾患(咽頭炎,火傷,切傷,麻疹,皮膚の化膿性炎など)の治療に使用されてきた.漢方薬として清熱涼血・解毒・透疹の効能があり,紫斑,黄疸,吐血,鼻血,血尿,腫れ物などの治療に用いられる.また Shikonin には様々ながん細胞の増殖を抑制し,アポトーシスを誘導するとの報告や,血管新生を抑制するとの報告がある.しかしながら,Shikonin の基本的な分子メカニズムは不明である.本研究から Shikonin は歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化誘導に働くことが示唆されたことより,さらにそのシグナル伝達の詳細を検証し,CD44 と Akt-mTOR の細胞内シグナルを介することが明らかとなった.また,CD44 を抑制すると Akt-mTOR のシグナルに変化がないにもかかわらず象牙芽細胞分化誘導が抑制されたことから,Akt-mTOR よりも CD44 が Shikonin による歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化誘導により重要であることが示された.すなわち,Shikonin は CD44 存在下で Akt -mTOR シグナルを介して象牙芽細胞分化誘導すると考えられた.この研究成果は科学雑誌 *Connective tissue research* (2021 Nov;62(6):689-697.

doi: 10.1080/03008207.2020.1865937. Epub 2021 Jan 12.) に公表した.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Naoki Umemura, Masahiro Sugimoto, Yusuke Kitoh, Masanao Saio, Hiroshi Sakagami	4. 巻 Nor 69(11)
2. 論文標題 Metabolomic profiling of tumor-infiltrating macrophages during tumor growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer immunology, immunotherapy	6. 最初と最後の頁 2357-2369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02622-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kunihiro Kajiura, Naoki Umemura, Emika Ohkoshi, Takahisa Ohta, Nobuo Kondoh, Satoshi Kawano	4. 巻 Jan 12
2. 論文標題 Shikonin induces odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via AKT-mTOR-signaling in the presence of CD44	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Connective Tissue Research	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/03008207.2020.1865937.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Koichi, Umemura Naoki, Adachi Makoto, Motoki Masahiro, Ohkoshi Emika	4. 巻 24
2. 論文標題 ABCG2, CD44 and SOX9 are increased with the acquisition of drug resistance and involved in cancer stem cell activities in head and neck squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2022.11658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kunihiro Kajiura, Naoki Umemura, Kyohei Ueno, Harumi Kawaki, Eiji Takayama, Satoshi Kawano, Nobuo Kondoh
2. 発表標題 Shikonin induces odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via AKT-mTOR-signaling in the presence of CD44
3. 学会等名 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大越 絵実加 (Ohkoshi Emika) (10287667)	青森大学・薬学部・教授 (31101)	
研究分担者	近藤 信夫 (Kondoh Nobuo) (40202072)	朝日大学・歯学部・教授 (33703)	
研究分担者	高山 英次 (Takayama Eiji) (70533446)	朝日大学・歯学部・准教授 (33703)	
研究分担者	河野 哲 (Kawano Satoshi) (80340074)	朝日大学・歯学部・教授 (33703)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------