

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390357

研究課題名(和文) 歯髄細胞の分化におけるシグナルネットワークの新しいパラダイムの構築と臨床への展望

研究課題名(英文) Resolution of the signaling networks involved in the pulp cell differentiation and its clinical application

研究代表者

川島 伸之 (Kawashima, Nobuyuki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60272605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄の喪失がすなわち歯の喪失にも繋がることから、歯を口腔内で長期にわたり保存するためには、歯髄をいかに保存するのか、また失われた歯髄をいかに再生するのが大きな課題である。申請者らはこれまでに、Notchシグナルが歯髄細胞分化に重要であることを明らかにしてきたが、今回の研究から、骨芽細胞分化に関与するペリオスチンは分泌タンパクであるが、歯髄細胞の象牙芽細胞への分化をNotchシグナルを介して負の方向に制御していることが明らかになった。ペリオスチン産生を制御することで、歯髄再生および分化の方向性を決定できる可能性が示唆された

研究成果の概要(英文)：Losing the tooth vitality correlates to the tooth loss, this is a challenge to QOL. Strategies to keep the integrity of the pulp tissue and regenerate the new pulp tissue are hot topics. We have reported that Notch signaling is essential for differentiation of dental pulp cells. In this project, we revealed that a secretory protein, Periostin, regulated negatively the dental pulp cell differentiation into odontoblasts via notch signaling. Controlling the synthesis and production Periostin may be essential to induce the non-mineralized pulp tissue covered by the newly formed mineralized dentin.

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：歯髄 歯髄細胞 象牙芽細胞 Notch Periostin 細胞分化 シグナルネットワーク

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えるにあたって、“健康に噛める”ことの重要性は近年ますます高まっている。補綴技術の進歩とインプラントの隆盛には目を見張るものがあるが、自分の歯で咀嚼できることが QOL の観点から最も望ましいのは明らかである。現在、歯の喪失の大きな要因となっているのは、歯周疾患、う蝕そして歯の破折である。う蝕に対して歯髄は痛みという警鐘を鳴らすとともに修復象牙質を形成して細菌侵襲にたいするバリアを築く。しかし、歯髄を失った歯(失活歯)においては、そのシステムが働かないため、う蝕はどこまでも進行し、歯の喪失をもたらす。また、失活歯の物性は劣化すると報告されており、楔効果をもたらす支台築造とあいまって、歯の破折のリスクが著しく増加する。このことは、歯髄を失うことは、歯の喪失の大きな要因であり、歯髄を保存する、あるいは歯髄を再生させる治療こそ将来につながる治療システムといえよう。ところで、歯髄を構成する細胞から象牙芽細胞が分化することは、防御システムとして修復象牙質が形成されることから明らかであるが、その分化メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。象牙芽細胞は象牙芽細胞突起を有する極性を持った細胞であり、dentin sialo-phospho protein, Nestinなどを分化マーカーとして発現しているが、これらの遺伝子は分化の指標であり分化を決定する因子ではない。すなわち歯髄細胞分化を規定する因子においてはいまだ明らかではないのが現状である。

2. 研究の目的

申請者らは、これまでに Notch シグナルが骨芽細胞分化を Negative に制御していることを報告した。さらに Notch シグナルを抑制することで骨芽細胞分化が促進することも確認した。また歯髄組織において、歯髄細胞の象牙芽細胞分化が誘導されるにつれ Notch シグナルが現弱することを報告した(4)。歯の発生においても Notch シグナルの関与は報告されており、Notch のリガンドである Jagged のノックアウトマウスにおいては歯胚発生、特に象牙芽細胞の配列に異常があると報告されている。これらの報告は、歯髄細胞の分化において Notch シグナルが重要な働きを担っているという申請者の仮説を裏付けるものである。今回、歯髄細胞の分化メカニズムにおける Notch シグナルを中心としたシグナルネットワークの新しい全体像：パラダイムの構築を目指し、さらにその中のシグナルを変動させることで細胞の分化、すなわち歯髄および象牙芽細胞の分化を誘導するシステムを確立し、その臨床応用を図るのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

マウスペリオスチン cDNA が挿入された pCAGI-puro 哺乳類発現用ベクターを MDP 細胞にトランスフェクションした後、puromycin (2.5 µg/mL) 存在下でペリオスチン安定発現細胞株を得た。ペリオスチン mRNA サイレncing は、ペリオスチン特異的 short interfering RNA (siRNA) を用いた。石灰化を誘導する目的で 0.2 mM アスコルビン酸と 5 mM グリセロリン酸を培地に添加し、石灰化結節はアリザリンレッド S 溶液にて検出した。象牙芽細胞分化を bone morphogenetic protein-2 (100 ng/mL) にて誘導した。ALP 活性は、naphthol AS-MX phosphate を基質とし、fast red violet B salt を発色剤として検出した。RNA 抽出には QuickGene-Mini80 を用い、トータル RNA (300 ng) より逆転写酵素および oligo(dT) にて cDNA を作製し、得られた cDNA と特異的プライマーセットおよび SYBR Green 含有 Taq ポリメラーゼにて定量 PCR を行った。各組織および細胞は RIPA 緩衝液にて溶解、ポリアクリルアミドゲルにて泳動後 PVDF 膜に転写し、ペリオスチンタンパクのバンドを抗 Osf-2 抗体 (1:5000) にて検出した。

動物実験は東京医科歯科大学実験動物委員会の承認を得た上で行われた(#0120156A)。6 週齢のオス ICR マウス (n=20) を塩酸ケタミン (100 mg/kg) およびキシラジン (10 mg/kg) にて全身麻酔し、露髄しないように注意しながら小窩洞 (直径 0.5 mm) を左上顎第一臼歯咬合面に #1/4 ラウンドバーを用いて作製した。窩洞形成 0 (非窩洞形成コントロール)、1、7 日後、上顎臼歯を摘出し、4%パラフォルムアルデヒド/リン酸緩衝生理食塩液にて固定後、15%EDTA 溶液で脱灰し、OCT コンパウンドにて包埋した。その後、厚さ 7 µm の凍結切片上にて、一次抗体として抗 Osf-2 抗体 (1:1000) を用い、ABC 法によりペリオスチン発現を検出した。統計学的解析には Bonferroni の多重比較を用い、有意水準 5% にて検定を行った。

4. 研究成果

ペリオスチン安定発現細胞株において、ペリオスチン mRNA のみならず、Notch シグナル下流の転写調節因子である Hey1 および Hes1 の mRNA の発現の増加が認められた。一方、象牙芽細胞関連遺伝子である Alp、dentin matrix protein (Dmp)、dentin sialophosphoprotein (Dspp) の mRNA 発現の減少が認められた。アリザリン染色の結果より、石灰化結節形成はペリオスチン安定発現細胞株において抑制される傾向を認めた (図 1)。

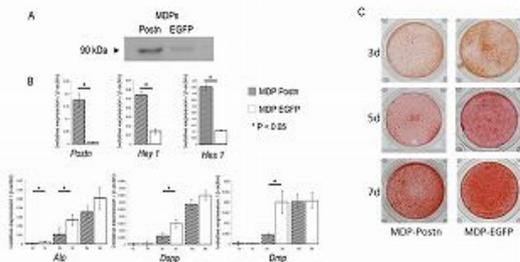


図1 株化歯髄細胞MDPにPeriostinを強制発現する (A)とNotchシグナル関連遺伝子発現は亢進し、象牙芽細胞分化マーカー関連遺伝子発現は抑制された (B)。石灰化結節形成も抑制された (C)。

ペリオスチン mRNA 発現を特異的な siRNA により抑制した結果、Hey1 および Hes1 の mRNA の発現はコントロールと比較して減少した。逆に Alp、Dmp、Dspp の mRNA 発現は増強されるとともに、Alp 活性の増加が認められた(図2)。

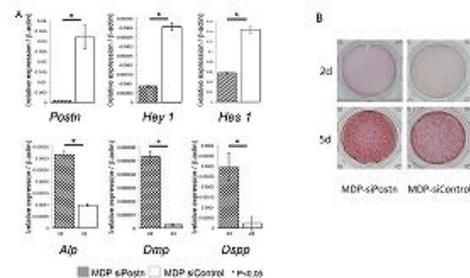


図2 MDPにおいてペリオスチン発現を抑制することで、Notchシグナル関連遺伝子発現は抑制され、象牙芽細胞分化マーカー関連遺伝子発現は促進した (A)。ALP活性もペリオスチン発現の抑制により上昇した。

窩洞形成1日後において、マウス臼歯歯髄組織全体において強いペリオスチンタンパク発現を免疫組織化学的に認めた。特に髄床底に近い歯冠歯髄中心部において強い発現を認めた。ペリオスチン発現は、細胞内よりもむしろ細胞間に強く発現していた。象牙芽細胞におけるペリオスチン発現は陰性であったのに対し、歯根膜においては強いペリオスチン発現を認めた。7日目の歯髄組織におけるペリオスチン発現は、正常歯髄のそれとほぼ同様であった。Western Blotting においても、窩洞形成に伴うペリオスチンタンパク発現の増加が確認された(図3)。

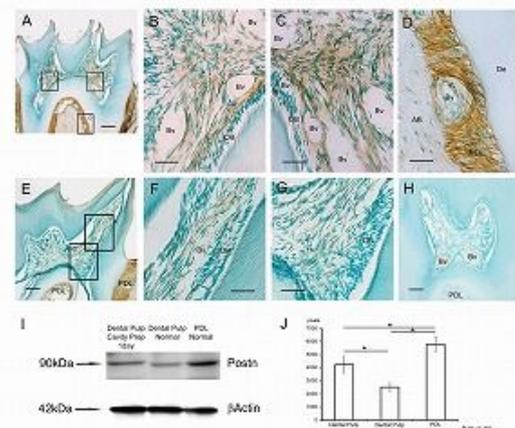


図3 マウス臼歯歯髄におけるペリオスチン発現は窩洞形成により一時的に亢進された (A, B, C, I, J)。A-H: 免疫組織染色 I-J: Western Blotting

MDP 細胞へのペリオスチン遺伝子の強制発現により、Alp, Dmp, Dspp といった象牙芽細胞マーカーの発現および石灰化結節形成が抑制された。逆にペリオスチン遺伝子発現の抑制は、象牙芽細胞マーカーの発現を促進し、Alp 活性を増強した。これらの結果から、ペリオスチンが象牙芽細胞分化および石灰化において負の制御因子として機能している可能性が示唆された。ペリオスチンは骨芽細胞の分化において重要な因子であるといわれているが、骨芽細胞の中でも特に未熟な細胞においてペリオスチン発現が高く、成熟した骨芽細胞におけるペリオスチン発現は低下している。すなわち、骨芽細胞の分化および成熟に対するペリオスチンの作用は抑制的と推察されるが、同様に象牙芽細胞の分化および成熟においてペリオスチンは抑制的に機能していると考えられる。

ペリオスチンは Notch シグナルを増強することが知られているが、今回ペリオスチン遺伝子発現を増強あるいは抑制したところ、Notch 下流の転写調節因子 Hey1 および Hes1 の発現も増加あるいは減少した。Notch シグナルは骨芽細胞を抑制することが報告されており、ペリオスチンによる象牙芽細胞分化および石灰化の負の制御に、Notch シグナルが関与している可能性が推察された。なおペリオスチン欠損マウスにおいては、動脈弁の石灰化が誘導されることが報告されているが、このマウスの動脈弁においては Notch シグナル発現が減弱しており、そのため石灰化が誘導されたと推察される。

ペリオスチン発現は歯髄全体にわたって観察され、主に細胞外に局在する傾向を認めた。これはペリオスチンが細胞から産生され、細胞外基質に蓄積されることを示唆する。ペリオスチン発現は窩洞形成により増強されたが、これは窩洞形成に伴うメカニカルストレスが関与している可能性が推察される。咬合に伴うメカニカルストレスにより、歯根膜におけるペリオスチン発現は増加すると報告されている。

歯髄細胞は高い ALP 活性を有し、石灰化能を有することから、歯髄内において石灰化は容易に生じると推察される。そのため、歯髄組織には石灰化を制御するシステムが備わっており、その制御機構の一端をペリオスチンが担っている可能性が本研究より推察された。

以上よりペリオスチンは象牙芽細胞の分化および石灰化における負の制御因子であり、ペリオスチンの作用に Notch シグナルが関与している可能性が示唆された。

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16件)全て査読有

<論文>

Zhou M, Kawashima N, Suzuki N, Yamamoto M, Ohnishi O, Katsube K, Tanabe H, Kudo A, Saito M, Suda H, Periostin is a negative regulator of mineralization in the dental pulp tissue, *Odontology*, 2014 in press.

doi: 10.1007/s10266-014-0152-7

M Yamamoto, N Kawashima, N Takashino, Y Koizumi, K Takimoto, N Suzuki, M Saito, and H Suda, Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation of dental pulp cells, *Arch Oral Biol*, 59, 310-317, 2014.

doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.12.006.

K Takimoto, N Kawashima, N Suzuki, Y Koizumi, M Yamamoto, M Nakashima, H Suda, Down-regulation of Inflammatory Mediator Synthesis and Infiltration of Inflammatory Cells by MMP-3 in Experimentally-induced Rat Pulpitis, *J Endod* 2014 in press.

doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2014.04.001>

Y Koizumi, N Kawashima, M Yamamoto, K Takimoto, M Zhou, N Suzuki, M Saito, H Harada, H Suda, Wnt11 expression in rat dental pulp and promotional effects of Wnt signaling on odontoblast differentiation, *Congenital Anomalies* 53, 101-108, 2013.

doi: 10.1111/cga.12011.

Otabe K, Muneta T, Kawashima N, Suda H, Tsuji K, Sekiya I, Comparison of gingiva, dental pulp, and periodontal ligament cells from the standpoint of mesenchymal stem cell properties, *Cell Medicine (Cell Transplantation Part B)*, Vol. 4, pp. 13-21, 2012.

doi:
<http://dx.doi.org/10.3727/215517912X639324>

Yoshida T, Kumashiro Y, Iwata T, Ishihara J, Umemoto T, Shiratsuchi Y, Kawashima N, Sugiyama T, Yamato N and Okano T, Requirement of

Integrin $\alpha 3$ for Iron Transportation during Enamel Formation, *J Dent Res*, 91(12):1154-9, 2012.

doi: 10.1177/0022034512462722

HG Wang, N Kawashima, T Iwata, J Xu, S Takahashi, T Sugiyama, H Suda, MEPE Activated by Furin Promotes Pulpal Cell Adhesion, *J Dent Res* 90(4):529-534, 2011.

doi: 10.1177/0022034510391057.

S Wang, N Kawashima, K Sakamoto, K Katsube, A Umezawa, H Suda, Osteogenic differentiation of mouse mesenchymal progenitor cell, Kusa-A1 is promoted by mammalian transcriptional repressor Rbpj, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 400, 39-45, 2010.

doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.133.

HG Wang, N Kawashima, T Iwata, J Xu, S Takahashi, T Sugiyama, H Suda, Differentiation of Odontoblasts Is Negatively Regulated by MEPE via Its C-Terminal Fragment, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 398, 406-12, 2010.

doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.085.

Sun H, Kawashima N, Xu J, Takahashi S, Suda H, Expression of Notch-Signalling-related Genes in Normal and Differentiating Rat Dental Pulp Cells, *Aust Endod J* 36, 54-8, 2010.

doi: 10.1111/j.1747-4477.2009.00188.x.

<総説>

Kawashima N, Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration?, *Arch Oral Biol*. 57, 1439-58, 2012.

doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.08.010.

[学会発表](計44件)

Kawashima N, Regenerative endodontics-induction of bone and dental pulp tissue from dental pulp, 平成25年度(2013)「歯・骨関連疾患のグローバル研究センター」国際総合プレゼンテーション, 東京医科歯科大学, 平成26年1月20日

Kawashima N, Koizumi Y, Yamamoto M, et.al., Promoting effects of Wnt signaling on odontoblast differentiation, *Asian Pacific*

Endodontic Conference, Seoul, Korea, March 23-24, 2013.

Yamamoto M, Kawashima N, Suda H, 3-D Spheroid Culture Method Promotes Odonto-/Osteoblastic Differentiation of Dental Pulp Cells, The 9th World Endodontic Conference, Tokyo, May 23-26, 2013.

川島伸之, 歯髄幹細胞を用いた再生医療の現状 <招待講演> 第 138 回日本歯科保存学会 2013 年春季学術大会、福岡市福岡国際会議場、2013 年 6 月 27-28 日

山本弥生子、川島伸之、鈴木規元、小泉悠、瀧本晃陽、須田英明、斉藤正寛、スフェロイド培養による歯髄細胞の特性変化の検討、第 138 回日本歯科保存学会 2013 年春季学術大会、福岡市福岡国際会議場、2013 年 6 月 27-28 日

川島伸之、山本弥生子、瀧本晃陽、小泉悠、鈴木規元、須田英明、ヒト歯髄幹細胞の三次元培養による象牙芽細胞・骨芽細胞マーカーの変動、第 138 回日本歯科保存学会 2013 年春季学術大会、福岡市福岡国際会議場、2013 年 6 月 27-28 日

Kawashima N, Mengyu Z, Yamamoto M, Koizumi Y, Takimoto K, Onishi K, Suzuki N, Katsube K, Saito M, Harada H, Suda H, Periostin: a negative regulator of mineralization in the dental pulp tissue, 16th ESE (European Society of Endodontology) Biennial Congress, Lisbon, Portugal, 12-14 September 2013.

Yamamoto M, Kawashima N, Koizumi Y, Takimoto K, Onishi K, Suzuki N, Katsube K, Saito M, Harada H, Suda H, Spheroid culture induces odonto-/osteoblastic differentiation of dental pulp cells through integrin signaling, 16th ESE, Lisbon, Portugal, 12-14 September 2013.

川島伸之、歯髄幹細胞による歯髄・骨再生の現状と課題 <招待講演>、第 11 回口腔医科学フロンティア学術集会、宮崎・青島パームビーチホテル、平成 25 年 3 月 2 日

Kawashima N, Yamamoto M, Takashino N, Takimoto K, Koizumi Y, Suzuki N, Suda H, Stem Cell Marker Expression in the 3-D Spheroid Cultured Human Dental Pulp Stem Cells, The 140th Scientific meeting of

KACD, The K Hotel & Resort, Gyeongju, Nov 23rd (Sat) & 24th (Sun) 2013.

N Kawashima, J Xu, N Suzuki, M Zhou, K Takimoto, Y Koizumi, M Yamamoto, H Suda, Involvement of a Myogenic Transcriptional Factor in Odontoblast Differentiation, AAE 2012 Annual Session, Boston, MA, April 20, 2012.

Yamamoto M, Kawashima N, Koizumi Y, Takimoto K, Saito M, Harada H and Suda H, Effects of 3-D Spheroid Culture on Dental Pulp Cells, IADR 90th General Session, Iguacu Falls, Brazil, June 20, 2012.

Kawashima N, Yamamoto M, Takimoto K, Mengyu Z, Koizumi Y, Suzuki N, Suda H, Induction of Mineralization by Spheroid Cultured-Dental Pulp Stem Cells, 第 137 回日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会 (イングリッシュセッション) 広島国際会議場、広島、2012 年 11 月 22 日

N Kawashima, J Xu, N Suzuki, M Zhou, K Takimoto, Y Koizumi, M Yamamoto, S Takahashi, T Sugiyama, H Suda, Mineralization of Odontoblastic-Lineage Cells Was Accelerated by Enhanced Expression of Mef2c, 15th ESE, Cavalieri Hotel, Rome, 15 - 17 September, 2011.

Kawashima N, Suzuki N, Suda H <Invited Lecture> Mechanisms of Bone Destruction in the Periapical Lesions and Its Regulation, The 16th Scientific Meeting of Asian Pacific Endodontic Confederation, Jahad Daneshgahi Complex, Shiraz, Iran, April 21-23, 2011.

山本弥生子、川島伸之、須田英明、単層培養法と三次元培養法における歯髄細胞の象牙芽細胞分化について、第 135 回日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会、大阪国際交流センター、大阪、平成 23 年 10 月 20 日

N Kawashima, J Xu, N Suzuki, M Zhou, K Takimoto, Y Koizumi, M Yamamoto, A Salima, S Takahashi, H Suda, Expression of Mef2c in Murine Odontoblasts, 8th World Endodontic Congress, to be held 6 - 9 October 2010,

in Athens, Greece.

Y Koizumi, N Kawashima, K Takimoto, S Takahashi, J Xu, N Suzuki, M Zhou, M Yamamoto, A Salima, T Sugiyama, H Suda, Wnt Signaling in Odontoblast Differentiation Induced by BMP, 8th World Endodontic Congress, to be held 6 ? 9 October 2010, in Athens, Greece

N Kawashima, J Xu, T Iwata, S Takahashi, Y Koizumi, K Takimoto, Z Mengyu, C Ohi, N Suzuki, T Sugiyama, H Suda, Promotive effects of Sp7 on Dspp expression, 89th IADR General Session & Exhibition in Barcelona, Spain, July 14-17, 2010.

川島伸之、許セイ、岩田隆紀、周夢宇、瀧本晃陽、小泉悠、大井智恵、高橋里美、鈴木規元、須田英明、象牙芽細胞分化における Sp7 による dentin sialophosphoprotein 発現誘導、日本再生医療学会 広島国際会議場 平成 22 年 3 月 18 日

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

川島 伸之 (KAWASHIMA Nobuyuki)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号：60272605

(2)研究分担者

勝部 憲一 (KATSUBE Ken-ichi)
東京医科歯科大学・大学院・医歯学総合研究科・講師
研究者番号：20233760

坂本 啓 (SAKAMOTO Kei)

東京医科歯科大学・大学院・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：00302886

(3)連携研究者

()

研究者番号：