

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659373

研究課題名（和文） 歯再生へ向けた低分子化合物を用いた歯髄幹細胞の樹立

研究課題名（英文） Establishment of the dental pulp stem cell using a low molecular weight compound for tooth regeneration

研究代表者

岩本 勉 (TSUTOMU IWAMOTO)

東北大学・病院・講師

研究者番号：90346916

研究成果の概要（和文）：我々はマウス歯乳頭細胞から樹立した歯原性間葉細胞株に、GSK3 β 特異的阻害剤を処理することによって、歯髄幹細胞と類似した特徴的な細胞形態に変化し、さらには、胚性幹細胞の重要な転写因子のひとつである Nanog 遺伝子の発現を引き起こすことを明らかとした。また、これらの細胞を骨誘導培地にて、培養することによって、骨芽細胞特異的な分化マーカーの発現が上昇し、さらにアルカリフォスファターゼ活性が有意に増加することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：We found that BIO, a glycogen synthase kinase-3 (GSK3) inhibitor, induced changes in cell morphology, and promoted the expression of Nanog mRNA, considered the key gene to pluripotency, in mouse dental papilla derived mesenchymal (mDP) cells. When the BIO treated mDP cells were cultured in osteogenic differentiation medium, the expression of osteoblast maker genes and alkaline phosphatase activity were progressively increased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯髄幹細胞、GSK3 β 特異的阻害剤

1. 研究開始当初の背景

再生医療に関連した新しい細胞の同定や技術開発がなされてきており、実際歯の再生

も実現性を増してきている。しかしながら、これらの新技術を臨床の現場に応用して行く為には、倫理的な問題や様々な薬事関連の手続きが必要となり、その結果、再生医療の

ための画期的な分子を同定したとしても、それが実用化される為には少なくとも概算として5-10年以上の時間を要する事が想定される。

我々が予備実験で用いてきた GSK3 β 阻害剤は、作用機序や効能は未知であるが、アメリカ FDA のケミカルバイオロジーのスクリーニング検査でその安全性が確認されている天然コンパウンドの一つである。GSK3 β は多くの細胞内シグナルの調節に関与しているが、代表的なものには Wnt シグナリングがある。Wnt シグナリングは歯の発生において重要な因子であり、我々は歯の発生過程における Wnt シグナリングを解析していく上で、GSK3 β 阻害剤処理によって、iPS 細胞までとはいかないまでも、パーシャルリプログラミングが起きることを偶然にも発見した。すなわち、歯に分化した細胞から、脱分化を導き出し、前駆細胞に誘導した可能性が考えられた。このことは、GSK3 β 阻害剤が再生医療への実用的応用の可能性が示唆されるものと考えられる。

また、GSK3 β 阻害剤同様に、ケミカルバイオロジーのスクリーニング検査でその安全性が FDA 等において確認されている天然コンパウンドが多数存在しており、その効果や機能に関して明らかにされていないものが多く存在する。これらケミカルコンパウンドから、再生医療に応用できる可能性がある薬剤を同定できれば、薬事等の手続きも簡略化され、実際の臨床に短時間で応用できる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

医療検査技術の発達により、迅速かつ的確な病態の把握が可能になり、さらには治療技術や治療法の進歩が加わり、最新医療技術は飛躍的に進歩している。これらの進歩には、常に基礎医学研究が基盤となっており、新たな治療法の開発とその安全性の裏付けには、確実な基礎データの蓄積が必須である。また、基礎研究を速やかに臨床応用に繋げていくために、どのような方向性で研究を行い、研究目的を達成するかという戦略は、国際的な競争が活発になってきた近年、重要な因子の一つとなってきた。同時に、最近iPS細胞が発明され、細胞ベースの再生医療が注目を集め、脊髄損傷後の神経再生や糖尿病、肝硬変、アルツハイマー病などの疾患治療のみならず、毛根や網膜、歯の再生などの応用が期待されている。しかしながら、iPS細胞には癌遺伝子が導入されている点でその安全性に疑問があ

り、骨髄や臍帯血を用いた方法でも、幹細胞の獲得効率や簡便性という観点からも問題は多い。我々は、すでに薬剤としての安全性が認可されているGSK3 β 阻害剤あるいはその他の種々の人工低分子化合物を用いて、比較的侵襲の少ない抜歯後の乳歯歯髄細胞に添加することにより、幹細胞を効率的に回収、増殖させる調整法の開発に挑戦する。

本研究ではこれまでの予備実験によって GSK3 β 阻害剤 (BIO) が歯髄由来細胞のリプログラミングを誘導した可能性が示唆されたことから、それらの細胞が実際に多分化能を有しているか否かを、遺伝子発現および骨芽細胞、神経細胞、脂肪細胞、象牙芽細胞などへの誘導実験を行い検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 細胞の形態変化に及ぼす影響の解析

歯髄細胞中に 0.2-1.0%の胚性幹細胞が存在し、これがいわゆる歯髄幹細胞と言われる細胞であるが、マウス歯乳頭細胞から樹立した歯原性間葉細胞株 mDP 細胞に、ヘキスト色素を細胞に取り込ませ、色素の排出量が高い細胞をソーティングすることによって回収できる多分化能を有した SP (Side Population) 細胞とその解析から、幹細胞に特有の細胞形態が存在する事を明らかにしてきた。すなわち、歯髄細胞より精製した歯髄 SP 細胞は歯髄細胞と比較して、小型で紡錘形の細胞であることが特徴づけられた。そこで、低分子化合物存在下で培養し、その形態学的変化による薬剤スクリーニングを行う。

(2) 未分化マーカー遺伝子の発現解析

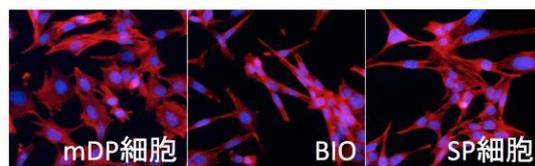
GSK3 β 特異的阻害剤で処理された mDP 細胞において、未分化マーカー遺伝子である Nanog、Oct3/4、Rex-1 の発現を RT-PCR 法、免疫染色法、Western blotting 法にて確認、検討し、指摘条件を検討する。

(3) mDP 細胞における増殖能の検討

GSK3 β 特異的阻害剤処理された細胞における細胞増殖の影響を検討する。

4. 研究成果

マウス歯乳頭細胞から樹立した歯原性間



葉細胞株 mDP 細胞に、GSK3 β 特異的阻害剤

(BIO) で処理することによって、細胞の形態が著しく変化し、この形態変化は、多分化能を有した歯髄由来 SP 細胞と類似していることがわかった (図)。

多細胞生物は様々な細胞の集合体によって個体が作られているが、その始まりは同じ細胞体の集合であり、その後、それぞれに分化していく段階で特徴的な形態変化が起きる。形態だけの变化で細胞を識別することは困難であるが、類似した形態は同じ細胞集団において共通する特徴を呈する。歯髄は様々な多種の細胞が混在しているが、その中に歯髄幹細胞と呼ばれる幹細胞が存在している。また、他の細胞より、歯髄細胞から iPS 細胞を作成誘導した場合の効率がよいことも報告されており、歯髄中の細胞識別には大きな意味があり、この結果は今後有効な手段のひとつになり得ることが示唆された。

次に、未分化マーカーとして知られる Nanog 遺伝子は、ホメオボックス転写因子のひとつで、この遺伝子をノックアウトすると ES 細胞は多能性を失うことが知られ、分化多能性を維持する上で必須な転写因子である。我々は GSK3 β 阻害剤で処理した mDP 細胞から mRNA を回収し、発現している遺伝子をスクリーニングしたところ、Nanog 遺伝子が発現誘導されることを明らかにした。本来は終末分化した細胞にはこの遺伝子の発現はみられないが、この結果は GSK3 β 阻害剤で処理することによって、多能性を有する細胞へと初期化され得る可能性を示唆する結果であった。

次に、GSK3 β 阻害剤を処理された細胞における細胞増殖能について、検討したところ、その細胞増殖活性が著しく低下することが明らかとなった。さらに、GSK3 β 阻害剤を処理された細胞を骨誘導培地にて、培養を行ったところ、骨芽細胞特異的な分化マーカーの発現が上昇し、さらにはアルカリフォスファターゼの活性が有意に増加することが明らかとなってきた。引き続き神経細胞、脂肪細胞への分化誘導の検討を行っている。

我々は歯を対象として、再生医療への試みを行っているが、歯の発生は毛や乳腺、肺、腎臓といった組織ともその初期発生が共通しており、歯の発生のメカニズムの解明ならびに再生医療への応用基礎的研究は、歯科領域に留まらず、多くの分野で貢献が出来るものと考えられる。また、歯髄から効率よく多分化能を有した幹細胞の調達が可能となった場合には、患者の負担は激減する。すなわち、我々が着目した方法としての薬物治療を応用したものは、細胞移植や組織調達において必要不可欠な外科的侵襲を軽減することが

できるメリットがある。また、現実的には growth factor のような直接的に作用する分子を投与することが効果を発揮しやすいと考えるが、医療倫理や投与ルートが制限されるなどの理由から実際は薬として使用するのは難しいとされている。そこで、低分子化合物を用いることによって、それらの問題を解決する事が可能となる。現在までに多くの低分子化合物が FDA の安全認証を受けているにも関わらず、その効果や機能が明らかとされていないことから、これらに着目し、有効な分子を同定したい。また、我々が目指す究極の歯科再生医療は歯の再生であり、そこに挑戦を続けていきたい。

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 8 件)

- ① Iwamoto T, Ishikawa M, Ono M, Nakamura T, Fukumoto S, Yamada Y., Biological roles of gap junction proteins in cartilage and bone development., J Oral Biosci, 55(1):29-33, 2013. doi: 10.1016/j.job.2012.12.001 (査読有)
- ② Yamada A, Iwamoto T, Fukumoto E, Arakaki M, Miyamoto R, Sugawara Y, Komatsu H, Nakamura T, Fukumoto S., Epithelial-mesenchymal interaction reduces inhibitory effects of fluoride on proliferation and enamel matrix expression in dental epithelial cells. PEDIATRIC DENTAL JOURNAL, 22(1):1-9, 2012 doi: <http://dx.doi.org/10.11411/pdj.22.55> (査読有)
- ③ Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y, Fukumoto S. Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation., J Biol Chem. 2012 287(13):10590-601. doi: 10.1074/jbc.M111.285874. (査読有)
- ④ Kamasaki Y, Nakamura T, Yoshizaki K, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Maruya Y, Iwabuchi K, Furukawa K, Fujiwara T, Fukumoto S., Glycosphingolipids regulate ameloblastin expression in dental epithelial cells. J. Dent. Res., 2012, 91(1):78-83. doi: 10.1177/0022034511424408. (査読有)

- ⑤ Ishikawa M, Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Fukumoto S, Yamada Y. Pannexin 3 functions as an ER Ca²⁺ channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *J Cell Biol.* 27;193(7):1257-74. 2011 doi: 10.1083/jcb.201101050. (査読有)
- ⑥ Iwamoto T, Yamada A, Arakaki M, Sugawara Y, Ono M, Futaki M, Yoshizaki K, Fukumoto E, Nakamura T, Fukumoto S, Expressions and Functions of Neurotrophic Factors in Tooth Development., *J Oral Biosci.* 53(1):113-21, 2011. <http://dx.doi.org/10.2330/joralbiosci.53.13> (査読有)
- ⑦ Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Ishikawa M, de Vega S, Fukumoto S, Yamada Y., Pannexin 3 regulates intracellular ATP/cAMP levels and promotes chondrocyte differentiation., *J Biol Chem*, 2010; 285(24):18948-58. doi: 10.1074/jbc.M110.127027. (査読有)
- ⑧ Nun W, Iwamoto T, Sugawara Y, Futaki M, Yoshizaki K, Yamamoto S, Yamada A, Nakamura T, Nonaka K, and Fukumoto S., PDGFs regulate tooth germ proliferation and ameloblast differentiation., *Archives of Oral Biology*, 2010, 55(6):426-34. doi: 10.1016/j.archoralbio. (査読有)
- [学会発表] (計 10 件)
- ① 及川友子、只木麻友、成瀬正啓、新垣真紀子、岩本 勉、山田亜矢、中村卓史、福本 敏、歯科再生医療実現化を目指した新しい分子機能予測法開発、第31回日本小児歯科学会中四国地方会大会及び総会、サンポートホール高松、2012. 11. 04
- ② 岩本 勉、象牙芽細胞分化制御機構の同定とその応用、第 49 回日本小児歯科学会大会、いわて県民情報交流センター・アイーナ、2011. 11. 29
- ③ Tsutomu Iwamoto, Yu Sugawara, Mariko Ono, Aya Yamada, Takashi Nakamura, Satoshi Fukumoto, Pannexin 3 plays a critical role for odontoblast differentiation, *American Society For Bone And Mineral Research (ASBMR) 2011 Annual Meeting*, San Diego Convention Center, USA, 2011.9. 18
- ④ 岩本 勉、象牙芽細胞分化における細胞外マトリックス(ECM)の役割、第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会、長良川国際会議場、2011. 10. 1
- ⑤ 岩本 勉、福本 敏、歯および軟骨細胞における Pannexin 3 の役割、第 9 回口腔医科学フロンティア学術集会、九州大学歯学部本館 1 階、2011. 3. 5
- ⑥ 福本 敏、山田亜矢、岩本 勉、中村卓史、GSK-3 β 抑制剤を用いた歯髄細胞の未分化誘導法の確立、第 3 回口腔先端応用医科学研究会、東京医科歯科大学歯学部 4 階特別講堂・演習室、2011. 1. 22
- ⑦ Tsutomu Iwamoto, Mariko Ono, Makiko Arakaki, Takashi Nakamura, Aya Yamada, Satoshi Fukumoto, New gap junctional protein pannexin 3 regulates tooth, cartilage and bone development., *Harvard-Forsyth-Tohoku Research Workshop*, Belfer Case Study Room, CGIS South, Harvard University, 2011. 1. 7
- ⑧ 二木 正晴、岩本 勉、新垣 真紀子、山田 亜矢、小野 真理子、中村 卓史、福本 敏、Pannexin 3 coordinates odontoblasts proliferation and differentiation by cell-matrix interaction., 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会合同大会、神戸ポートアイランド、2010. 12. 10
- ⑨ 岩本 勉、中村卓史、吉崎恵悟、山田亜矢、福本 敏、象牙芽細胞分化におけるギャップ結合分子の発現および機能解析、第 52 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、タワーホール船堀、2010. 9. 22.
- ⑩ 小野真理子、岩本 勉、吉崎恵悟、中村卓史、山田亜矢、宮本綾子、福本 敏、神経栄養因子による歯原性上皮細胞の増殖、分化制御機構の解明、第 52 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、タワーホール船堀、2010. 9. 21.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 勉 (TSUTOMU IWAMOTO)
 東北大学・病院・講師
 研究者番号：20791583

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者