

## 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 6月 6日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791936

研究課題名（和文）歯根膜由来ヘマンジオブラスト様細胞を用いた次世代歯周組織再生技術の開発

研究課題名（英文）Research for the regeneration of periodontal tissue using periodontal ligament-derived hemangioblasts-like cells

研究代表者

高橋 典子（Takahashi Noriko）

岩手医科大学・歯学部・研究員

研究者番号：60405777

研究成果の概要（和文）：本研究では造血幹細胞誘導遺伝子として CDX2 に着目した。CDX2 のアデノウイルスベクターを感染させた PDL は造血性幹細胞様細胞への分化が観察された。また、マウス骨髄より造血性幹細胞の分離を試みた結果、Sca-1、CD34、CD45 陽性の造血幹細胞を得た。本研究で得られた造血幹細胞は IV 型コラーゲンには接着するものの I 型コラーゲンには非接着であった。さらに間葉系幹細胞をフィーダーとすることによって旺盛に増殖した。本研究で得られた細胞を利用することによって血管新生誘導のさらなる解明が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the CDX2 gene such as a key gene that induces into hematopoietic stem cells. PDL cells over-expressing CDX2 gene were observed to differentiate into hematopoietic stem-like cells. In addition, we attempted to isolate of hematopoietic stem cells from mouse bone marrow. As a result, the hematopoietic stem cells of Sca-1, CD34, CD45-positive were obtained. These hematopoietic stem cells adhere to type IV collagen, but it does not adhere to type I collagen. Furthermore, hematopoietic stem cells proliferated vigorously by a feeder of mesenchymal stem cells. Elucidation of the induction of angiogenesis is expected by using these cells.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011 年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012 年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯学

### 1. 研究開始当初の背景

歯根膜中には間葉系幹細胞（MSC）が存在し、この細胞が線維芽細胞、骨芽細胞（OB）ならびにセメント芽細胞に分化し、硬組織および線維性軟組織を形成することが報告されている（Seo et al., Lancet, 2004）。し

かしながら、この細胞が歯根膜中の血管構成細胞や血球細胞に分化しうるかどうかについては全く明らかにされていない。

我々は、歯根膜由来 MSC が血管構成細胞に分化するとともに、血管組織構築能力を示すかどうか調査した。その結果、歯根膜由来線

維芽細胞様細胞（以下、PDL 細胞）が血管内皮細胞マーカーを発現することを発見し報告した (Ibi et al., Arch. Oral Biol., 2007)。さらに我々は、この細胞が bone morphogenetic protein (BMP) の刺激で OB に分化誘導される一方で、fibroblast growth factor (FGF) 刺激により、血管内皮細胞 (EC) 様分化誘導されて血管様構造物を構築することを発見し、報告した (Shirai et al., J. Periodontal Res., 2009)。また、この PDL 細胞による血管構造物は血管内皮マーカー Tie2 陽性であることが判明した (Okubo et al., J. Vasc. Res., in press)。以上の結果から、PDL 細胞は、硬組織形成能力に加え、血管形成能力を有することが明らかとなった。

一般的に造血幹細胞と血管芽細胞 (EC の前駆細胞) はヘマンジオブラストと呼ばれる共通前駆細胞から分化すると考えられている。このことは、EC に分化しうる細胞は造血幹細胞にも分化しうる可能性があることを示唆するものである。我々は既に、PDL 細胞が EC 様細胞分化を示すことを明らかにしているが、この事実から、PDL 細胞が造血幹細胞様分化能力を示す可能性は十分に示唆されている。実際に、PDL 細胞における造血幹細胞マーカー c-kit の発現を、FGF 刺激下で確認している。加えて、興味深いことに、3次元培養下で形成される PDL 細胞塊から伸長する血管構造物の基部に、周囲の組織と結合しない血球様細胞が出現することを確かめた。以上の結果より、PDL 細胞が c-kit/SCF (幹細胞増殖因子) 系シグナルの刺激で造血幹細胞様に分化する可能性が非常に高い。

血管新生を誘導するのは、血球細胞が局所において EC 走化性因子 (Ang-1, VEGF 等) を分泌するからと考えられている。PDL 細胞由来ヘマンジオブラスト様細胞を EC と造血性幹細胞それぞれに自在に分化誘導できれば、これらの細胞間相互作用による効率の良い血管新生誘導が可能になる。また、最近になって骨髄中の OB はニッチ細胞として造血性幹細胞の増殖・分化を促進していると考えられている。一方で、造血性幹細胞による OB の増殖・分化促進効果の存在についても期待されるべきところであるが、その詳細は明らかとされていない。この造血性幹細胞による OB への作用についても、さらなる研究が待ち望まれている。

これまでに我々は、PDL 細胞が OB に分化するだけでなく、EC にも分化することを世界に先駆けて報告した。しかし、PDL 細胞が造血性幹細胞様に分化することを示した例は全くない。本研究により、PDL 細胞を EC や造血性幹細胞に自在に誘導する技術が確立され

るとともに、これらの細胞の相互作用による局所の血管新生誘導技術の基盤が確立されることが期待される。このようにして分化誘導された PDL 由来造血性細胞が OB の増殖・分化を促進し、血管新生との相乗作用により局所の骨形成を誘導するという全く新たな歯周組織再生技術を確立することが可能になる。OB が造血幹細胞ニッチとして働くことは知られているが、局所に分化誘導した造血性幹細胞を利用して骨芽細胞の増殖・分化をポジティブに制御するという着想は極めて独創性に富んだものである。また、将来的には、PDL 細胞が造血幹細胞の供給源として、白血病などの血液疾患治療に貢献する可能性を含んでいることから、本研究の社会貢献度は極めて高いといえる。

## 2. 研究の目的

我々が見出した PDL 由来ヘマンジオブラスト様細胞 (PDL 細胞) を血管構成細胞 (血管内皮細胞や血管平滑筋細胞、造血性幹細胞) に自在に分化誘導し、これらの細胞の共同作業で初めて可能となる局所の効率的な血管新生の誘導技術の基盤を開発する。また、本研究により PDL 細胞から分化誘導された造血性幹細胞は、周囲の OB の増殖・分化を促進させることが期待される細胞であり、この OB 増殖・分化誘導効果と先の血管新生誘導効果を相乗的に応用した全く新たな着想に基づく次世代の歯周組織再生技術を開発する。

本研究では、PDL 細胞が EC に分化するだけでなく、ヘマンジオブラスト様に造血性幹細胞への分化能力を有することを明らかにする。さらには、c-kit/SCF 系で誘導された造血性幹細胞から各血球性細胞に分化することを確認し、この細胞の造血性幹細胞としての能力を検証する。さらに、この PDL 細胞が EC あるいは血球性細胞に分化する際に、これらの分化の方向付けをするキー遺伝子を同定し、PDL 細胞からの EC あるいは造血性幹細胞への分化を自在に操作する技術を確立する。その結果、これらの細胞の相互作用による血管新生誘導により、局所の組織再生に必要な血液循環を改善する医療技術が確立する。加えて、本技術で分化誘導された PDL 細胞が、周囲の OB の増殖・分化をポジティブに制御して骨形成誘導に働くことを明らかにする。以上の研究により、PDL 由来ヘマンジオブラストを利用した全く新たな歯周組織再生療法開発のための研究基盤を築きたい。

### 3. 研究の方法

#### (1) 造血幹細胞分化誘導促進遺伝子の同定：

cDNAマイクロアレイをはじめとした様々な解析によって明らかになった造血性幹細胞としての能力の発現を誘導するモデル遺伝子の検索を実施した。得られた結果と、PDL細胞の造血性幹細胞能力の検索結果とを併せて、造血性幹細胞分化誘導モデル遺伝子の絞込みを行った。明らかになった造血性幹細胞としての能力の発現を誘導するモデル遺伝子としてCDX2に着目した。

#### (2) FGF-1 による PDL 細胞の分化誘導：

酸性線維芽細胞増殖因子(FGF-1)誘導性の細胞内シグナルが、PDL細胞の増殖と血管構成細胞分化に与える影響を調査し、どのような細胞内シグナルが血管新生に重要であるかを検討した。まず、細胞増殖に与える FGF-1 の効果をアラマーブルー法にて調査した。次に、リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法にてシグナル伝達因子の活性化を調べ、FGF-1 誘導性のシグナル伝達経路を調査した。さらにシグナル経路の特異的阻害剤を用いて FGF-1 誘導性のシグナル活性化を抑制し、細胞増殖と分化に与える影響を調べた。

細胞の分化は、リアルタイム RT-PCR 法により血管内皮細胞マーカー(Tie-2, vWF)と平滑筋細胞マーカー( $\alpha$ -SMA, hl-calponin, myocardin)の mRNA 発現を調査し、さらに免疫蛍光染色法にてマーカータンパク質の発現を調査した。

#### (3) TGF- $\beta$ による PDL 細胞の分化誘導：

血管内皮-間葉転換誘導作用を持つとされる transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が、PDL 細胞の増殖や EC および平滑筋細胞 smooth muscle cell (SMC) 分化に及ぼす影響について調査した。さらに、TGF- $\beta$  誘導性の Smad2/3 シグナルならびに p38-mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) シグナルが、この細胞の増殖・分化にどのように影響するかについて調査を進めた。細胞増殖活性の測定は AlamarBlue 代謝測定法により行い、EC ならびに SMC 分化の程度は定量的 RT-PCR 法と免疫蛍光細胞染色法とを用いた血管内皮細胞マーカー(Tie-2, VE-cadherin)と平滑筋細胞マーカー(alpha-smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA), hl-calponin, ならびに SM22 $\alpha$ )の発現解析により調査した。

TGF- $\beta$  シグナル経路の解析は、シグナル分

化のリン酸化部位認識抗体を用いたウエスタンブロット法と各種シグナル経路特異的阻害剤を用いて行った。また、特に Smad2/3 経路の阻害は抑制性 Smad である Smad7 の過剰発現系により行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 造血幹細胞分化誘導促進遺伝子の同定：

造血幹細胞誘導遺伝子として CDX2 に着目した。CDX2 遺伝子はショウジョウバエにおけるホメオボックス遺伝子 Caudal に相当する遺伝子であり、腸管上皮細胞の増殖や分化に関与している転写因子をコードしている。本研究では CDX2 を強発現するようなアデノウイルスベクターを作製し、PDL 細胞へ感染、CDX2 を過剰発現させてそのリアクションを解析した。

その結果、CDX2 を過剰発現させることによって造血性幹細胞様細胞への分化が観察された。また、PDL 細胞がラット由来であることから、遺伝的バックグラウンドが詳細に解析されているマウスから造血性幹細胞の分離を試みた。すなわちマウス脛骨を摘出し、骨髄よりフラッシュアウトされる細胞を培養して、造血幹細胞マーカーである Sca-1、CD34、CD45 陽性の細胞を得た。本研究で得られたマウス骨髄由来造血性幹細胞様細胞は IV 型コラーゲンには接着するものの I 型コラーゲンには非接着であった。さらに間葉系幹細胞をフィーダーとすることによって旺盛に増殖した。

本研究で得られた知見や細胞を利用することによって、造血性幹細胞の分化や血管新生誘導効果のさらなる解明が期待される。

#### (2) FGF による PDL 細胞の分化誘導：

FGF-1 は FGF レセプターとそれにつづく MAP キナーゼすなわち MEK-ERK1/2 シグナルの活性化を介して PDL 細胞の増殖を促進することが示された。FGF-1 誘導性の MEK-ERK1/2 シグナルを抑制すると、SCDC2 細胞の平滑筋細胞様分化が誘導され、MEK-ERK1/2 シグナルが SCDC2 細胞の平滑筋細胞分化を抑制していることが示唆された。また、MEK-ERK1/2 シグナルを抑制することにより平滑筋細胞分化が誘導された後も、血管内皮細胞マーカーの発現が維持されることが判明した。このことから、SCDC2 細胞の完全な平滑筋細胞分化には FGF-1 誘導性の MEK-ERK1/2 シグナルを抑制する以外に、別のシグナルが必要である可能性が示唆された。以上のことから、歯周靱帯に

存在する血管内皮前駆細胞様線維芽細胞では、FGF-1 誘導性の MEK-ERK1/2 シグナルの活性化の程度により、細胞の増殖と平滑筋細胞初期分化の切り替えが抑制されていると考えられた。

本研究は、FGF-1 誘導性の ERK1/2 シグナル伝達が歯周靭帯由来血管内皮前駆細胞様線維芽細胞の増殖と平滑筋細胞分化をどのようにしてコントロールしているかを示した初めての報告である。これは、歯周靭帯のみならず、靭帯や腱といった血管を欠く組織での修復・再生のための再生医療を、組織周囲における血管構築の視点から考える上で重要な基礎的知見を提供するものであり、靭帯由来血管内皮前駆細胞様線維芽細胞の増殖・分化の全容を分子レベルで解明することは、靭帯や腱再生のための新たな細胞を用いた治療法の確立につながるものと考えられる。

### (3) TGF- $\beta$ による PDL 細胞の分化誘導：

TGF- $\beta$  は、濃度依存的に PDL 細胞の増殖を抑制した。また、TGF- $\beta$  が濃度依存的に EC マーカー Tie-2 の発現を抑制することや、SMC マーカーの発現を誘導することが明らかになった。TGF- $\beta$  によるこれらの効果は、TGF- $\beta$  の I 型受容体キナーゼ阻害剤である SB-431542 の添加により抑制された。

TGF- $\beta$  は、PDL 細胞における Smad2 と p38 MAPK のリン酸化を誘導することが判明した。次いで、PDL 細胞に Smad7 を過剰発現させて Smad2 シグナルを阻害したところ、TGF- $\beta$  による増殖抑制効果は完全に解除された。しかし、p38 MAPK の特異的阻害剤 SB203580 では、この TGF- $\beta$  による増殖抑制効果は解除されなかった。TGF- $\beta$  による EC マーカー Tie-2 の発現抑制効果は SB203580 により解除されたが、Smad7 では解除されなかった。これとは対照的に、TGF- $\beta$  による SMC マーカーの発現誘導効果は Smad7 の過剰発現により抑制されたが、Sb203580 では解除されなかった。また、興味深いことに、この TGF- $\beta$  誘導性の SMC 分化は、その後の fibroblast growth factor (FGF) 処理により脱分化された。抑制型 Smad7 により、TGF- $\beta$  で誘導される PDL 細胞の増殖抑制効果が解除されることから、この SCDC2 細胞の増殖抑制効果は Smad2 シグナル依存的であることが示唆された。

TGF- $\beta$  誘導性の Smad シグナルにより SMC 分化が誘導される一方、TGF- $\beta$  誘導性の p38 MAPK シグナルにより EC 分化が抑制されることが明らかとなった。TGF- $\beta$  により誘導された PDL 細胞の SMC 分化は、その後の FGF 添加により脱分化されることから、この細胞の TGF- $\beta$  による SMC 分化は完全分化ではなく、

初期分化である可能性が示唆された。これらの結果により、歯周靭帯由来血管内皮前駆細胞様細胞においては、TGF- $\beta$  シグナル経路依存的にその増殖や血管内皮細胞分化あるいは平滑筋細胞分化が調節されると考えられた。

本研究は、歯周靭帯由来血管内皮前駆細胞様細胞の増殖と分化を TGF- $\beta$  誘導性 Smad および non-Smad シグナルの相互作用により制御していることを初めて報告した論文であり、本研究成果は、歯周靭帯周囲組織の再生に必要な局所の血液循環を改善する Cell Therapy 確立のために役立つ重要な研究基盤となると考えられる。

### 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 4 件)

- (1) Saito D., Kyakumoto S., Chosa N., Ibi M., Takahashi N., Okubo N., Sawada S., Ishisaki A., Kamo M. "Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces epithelial-mesenchymal transition and integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-mediated cell migration of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells through Slug". *Journal of Biochemistry*, 153:303-315, 2013. 査読有り doi: 10.1093/jb/mvs144
- (2) Takahashi M., Okubo N., Chosa N., Takahashi N., Ibi M., Kamo M., Mizuki H., Ishisaki A., Kyakumoto S. "Fibroblast growth factor-1-induced ERK1/2 signaling reciprocally regulates proliferation and smooth muscle cell differentiation of ligament-derived endothelial progenitor cell-like cells". *International Journal of Molecular Medicine*, 29:357-364, 2012. 査読有り doi: 10.3892/ijmm.2011.847
- (3) Takahashi N., Chosa N., Hasegawa T., Nishihira S., Okubo N., Takahashi M., Sugiyama Y., Tanaka M., Ishisaki A. "Dental pulp cells derived from permanent teeth express higher levels of R-cadherin than do deciduous teeth: Implications of the correlation between R-cadherin expression and restriction of multipotency in mesenchymal stem cells". *Archives of Oral Biology*, 57:44-51, 2012. 査読有り doi:

10.1016/j.archoralbio.2011.07.013

- (4) Nishihira S., Okubo N., Takahashi N., Ishisaki A., Sugiyama Y., Chosa N. "High-cell density-induced VCAM1 expression inhibits the migratory ability of mesenchymal stem cells". Cell Biology International, 35:475-481, 2011. 査読有り  
doi :10.1042/CBI20100372

[学会発表] (計 15 件)

- (1) 帖佐直幸 西平宗功 大久保直登 高橋典子 客本斉子 加茂政晴 石崎 明  
「システインリッチペプチド SCRG1 は間葉系幹細胞の移動能を促進する」第 52 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会 2010 年 9 月 20 日-22 日 (於 東京)
- (2) 西平宗功 大久保直登 高橋典子 長谷川智一 帖佐直幸 杉山芳樹 石崎明「PDGF 受容体を介した VCAM1 の発現は間葉系幹細胞の遊走を制御する」第 52 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会 2010 年 9 月 20 日-22 日 (於 東京)
- (3) 吉田茉莉子 大久保直登 帖佐直幸 客本斉子 高橋典子 衣斐美歩 長谷川智一 加茂政晴 石崎明「歯周靭帯由来細胞の血管構成細胞分化における TGF- $\beta$  の関与について」第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 21 日-24 日 (於 京都)
- (4) 高橋美香子 大久保直登 帖佐直幸 高橋典子 衣斐美歩 長谷川智一 加茂政晴 水城春美 石崎明 客本斉子「繊維芽細胞増殖因子で誘導される ERK1/2 シグナルは靭帯由来血管内皮前駆細胞の増殖と平滑筋分化を相反的に制御する」第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 21 日-24 日 (於 京都)
- (5) 吉田茉莉子 大久保直登 帖佐直幸 客本斉子 高橋典子 衣斐美歩 長谷川智一 加茂政晴 石崎明「歯周靭帯由来細胞の血管構成細胞分化における TGF- $\beta$  の関与について」第 53 回 歯科基礎医学会学術大会・総会 2011 年 9 月 30 日-10 月 2 日 (於 岐阜)
- (6) 高橋美香子 大久保直登 帖佐直幸 高橋典子 長谷川智一 客本斉子 加茂政晴 水城春美 石崎明「歯周靭帯由来線維細胞の増殖と平滑筋分化は FGF で誘導される ERK シグナルにより制御される」第 53 回 歯科基礎医学会学術大会・総会 2011 年 9 月 30 日-10 月 2 日 (於 岐阜)

- (7) 齋藤大嗣 加茂政晴 帖佐直幸 客本斉子 高橋典子 大久保直登 衣斐美歩 水城春美 石崎明「ヒト口腔扁平上皮癌細胞における TGF- $\beta$  による上皮間葉転換について」第 48 回日本口腔組織培養学会学術大会 2011 年 11 月 19 日 (於 浦安)
- (8) 齋藤大嗣 加茂政晴 帖佐直幸 客本斉子 高橋典子 大久保直登 衣斐美歩 水城春美 石崎明「ヒト口腔扁平上皮癌細胞における TGF- $\beta$  シグナル伝達を介した細胞運動メカニズムの解析」第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日-16 日 (於 横浜)
- (9) Naoto Okubo, Mariko Yoshida, Naoyuki Chosa, Seiko Kyakumoto, Noriko Takahashi, Miho Ibi, Tomokazu Hasegawa, Masaharu Kamo, Akira Ishisaki「TGF- $\beta$ -induced smooth muscle cell differentiation of ligament-derived endothelial progenitor-like cells」第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日-16 日 (於 横浜)
- (10) 齋藤大嗣 帖佐直幸 客本斉子 高橋典子 大久保直登 衣斐美歩 水城春美 石崎明 加茂政晴「TGF- $\beta$  を介したヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-4 における上皮間葉転換について」日本分子生物学会第 12 回春季シンポジウム 2012 年 4 月 25 日-26 日 (於 山梨)
- (11) 客本斉子 吉田茉莉子 大久保直登 帖佐直幸 長谷川智一 高橋典子 衣斐美歩 加茂政晴 石崎明「TGF- $\beta$  による歯周靭帯由来血管内皮前駆細胞様細胞の増殖抑制と平滑筋細胞様分化のシグナル解析」第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2012 年 9 月 14 日-16 日 (於 福島)
- (12) 齋藤大嗣 帖佐直幸 客本斉子 高橋典子 大久保直登 衣斐美歩 石崎明 加茂政晴「TGF- $\beta$  により誘導された上皮間葉転換に伴うヒト口腔扁平上皮癌細胞の細胞運動の解析」第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2012 年 9 月 14 日-16 日 (於 福島)
- (13) 横田潤 帖佐直幸 大久保直登 衣斐美歩 高橋典子 客本斉子 加茂政晴 近藤尚知 石崎明「TGF- $\beta$  と IGF-1、PDGF または VEGF の同時刺激は間葉系幹細胞の骨分化を促進する」第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日-14 日 (於 福岡)
- (14) 青松恵美子 帖佐直幸 大久保直登 衣斐美歩 高橋典子 客本斉子 加茂政晴 佐藤和朗 三浦廣行 石崎明「間葉系

幹細胞由来サイトカイン様ペプチド SCRG1  
は破骨細胞分化を抑制する」第35回日本  
分子生物学会年会 2012年12月11日-14  
日(於 福岡)

- (15) 齋藤大嗣 帖佐直幸 客本斉子 高橋  
典子 大久保直登 衣斐美歩 水城春美  
石崎明 加茂政晴「ヒト口腔扁平上皮癌細胞  
における TGF- $\beta$ 1 による上皮間葉転換に  
伴う細胞遊走能の解析」第85回日本生化学  
学会大会 2012年12月14日-16日(於 福  
岡)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 典子 (Takahashi Noriko)  
岩手医科大学・歯学部・研究員  
研究者番号：60405777

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：