

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792176

研究課題名(和文) 成体由来細胞を用いてのエナメル芽細胞樹立と歯胚再生法の確立

研究課題名(英文) The generation of ameloblasts from adult tissue-delivered cells and the method of the tooth germ regeneration

研究代表者

鈴木 茂樹 (Suzuki, Shigeki)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：30549762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本来の目的は上皮-間葉相互作用を促す因子を同定することを目的としていたが、十分増殖するような上皮細胞の樹立が困難であった。歯牙硬組織に存在するタンパク質がエナメル芽細胞・象牙芽細胞の分化に関与している可能性が示唆されていることから、本年度は象牙質に高発現する細胞外基質の組み換えタンパク質が間葉系幹細胞の接着・分化等に与える影響を検討した。DMP-1上で間葉系幹細胞は良好な接着及び硬組織形成細胞への分化を認めたと、intactなDPP上では接着を認めなかったことから、歯芽の発生段階で発現する細胞外基質の活性は、異なるプロテアーゼの影響下で制御されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The original main purpose of this research project was the identification of the factors that induce epithelial-mesenchymal interaction during tooth development. However, it was difficult to isolate and cultivate oral epithelial cells. Since it has been suggested that the enamel and dentin extracellular matrix (ECM) proteins would be able to regulate ameloblasts and odontoblasts differentiation in vitro, we generated the recombinant proteins of tooth ECM proteins and analyzed their effects for mesenchymal stem cells (MSCs) adhesion and differentiation. DMP-1 was able to induce MSCs adhesion and differentiation into osteogenic lineage cells while intact DPP was unable to. Thus, the functions of these proteins may be modulated by proteolytic cleavages by unknown extracellular proteases.

研究分野：医歯薬学・歯学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：象牙芽細胞 DMP-1 DSPP

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療が多分野で開発、臨床応用が試みられている現代において、歯科分野に置いては Guided Tissue Regeneration (GTR) やエムドゲインによる歯周組織再生が行われている。一方、歯芽再生は、その実現が期待されているものの、未だ実現への道筋は立っていない。これまでの研究から、マウス歯胚から上皮と間葉系の細胞を分離して回収し、それらを生体外で再構築することで、歯芽用組織が形成されることは以前から知られてきた (Nature Review, 2004;5:499-508)。最近、上皮側にのみ GFP を導入したマウスで同様の方法が試みられ、萌出に時間はかかるものの、抜歯窩に歯根膜組織を伴った歯芽を再生できることも報告された (Nature Method, 2007;13:880-885)。このように、歯芽再生の技術的方法論は確立されてきている。しかし、これまで用いられた細胞は胎児歯胚由来であり、生体由来細胞を用いての歯の再生は実現していない。そこで、胎児歯胚由来と同様な歯の再生を誘導できる細胞を、成人の生体内から得ることができれば、歯の再生は著しく現実的期待を持てるものとなる。

申請者はこれまでに象牙芽細胞やエナメル芽細胞の分化や、象牙質、エナメル質の組織形成について解析してきた。特に、エナメル質においては、アメロジェニンとアメロプラスチンの遺伝子欠損マウスを用いてきた。これら分子は細胞外基質としてのみだけでなく、エナメル芽細胞の分化成熟を積極的にコントロールしている。また、象牙質においては、特異的に発現する象牙質シアロリン酸化タンパク (DSPP) の開裂産物である象牙質シアロタンパク (DSP) と象牙質フォスフォタンパク (DPP) の機能解析を行ってきた。DSPP は SIBLING (Small Integrin-Binding ligand N-linked Glycoprotein) ファミリーに属し、他の骨シアロタンパク (BSP)、象牙質マトリクスタンパク-1 (DMP-1)、オステオポンチン (OPN)、Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) は細胞外基質としての機能だけではなく、その RGD 配列を介してインテグリンに接着すること、また DMP-1 は骨芽細胞に置いては転写因子として機能することから、積極的に細胞刺激を行う分子であることが明らかとなっている。これらエナメル質、象牙質細胞外基質が歯胚の発生初期に、上皮と間葉の相互作用に重要な役

割を果たしているのではと考えるに至った。

### 2. 研究の目的

歯胚の発生、成熟には内エナメル上皮の前エナメル芽細胞への分化が必須で、この時期の細胞は未分化かつ増殖能が高いと考えられる。上皮間葉形質転換 (EMT) は癌細胞の浸潤に頻繁に見られる現象で、上皮細胞が細胞間接着を一時的に弱め、間葉系細胞様に可逆的あるいは不可逆的に形質転換した後に、他部位に浸潤する現象である。近年、この EMT を起こしている細胞は幹細胞様の性質を獲得していることが明らかとなった (Cell, 2008;13:704-715)。また以前から EMT 誘導因子として知られている転写因子の Snail と Twist、または TGFbeta シグナルは上皮細胞に未分化性を付与できる因子であることも明らかとなった。そこで、口腔粘膜由来上皮細胞に Snail や Twist を発現させることにより、継代可能な未分化上皮細胞を樹立し、その上で内エナメル上皮に特異的に発現する因子を導入することで、元来は生体の終末分化した細胞から、前エナメル芽細胞が樹立できるのではと考えるに至った。

更に間葉系幹細胞との接着共培養系において歯胚誘導能を解析すると共に、上述した象牙質やエナメル質の細胞外基質を加えることで、間葉系幹細胞の象牙芽細胞への分化を積極的に誘導できるのではと着想するに至った。

### 3. 研究の方法

#### 1. マウス実験プロトコールの申請

本実験計画では、胎生 16.5 日のマウス下顎第一臼歯歯胚の凍結切片 (マイクロダイセクション用) 及び、生後 1,3 カ月マウス口腔粘膜からの上皮細胞単離を予定している。

#### 2. 口腔粘膜由来の上皮細胞の回収、セルラインの樹立

本研究では、口腔粘膜を細胞のソースとする。口腔粘膜は易採取性で採取後の治癒能

力が高いため、将来的な人への応用を考慮すると非常に優れている。マウス口腔内から 3mm 角の口腔粘膜上皮を採取し、コラゲナーゼ等処理した後、上皮細胞群の単離を行う。

### 3. 組み換え DSPP, DMP-1 タンパク質の作製

哺乳類細胞組み換えタンパク質作製系である、293EBNA 細胞及びタンパク質発現用 pCEPPur ベクターを用いて組み換えタンパク質の作製を行った。

### 4. 候補タンパク質並びに DSPP, DMP-1 を主とする象牙質タンパクの細胞分化への影響の検討

上皮細胞、間葉系幹細胞を DMP-1 や DSPP 上で培養しその分化・接着・遊走に対する効果を検討した。

#### 4. 研究成果

マウス口腔粘膜上皮をコラゲナーゼ処理後に培養皿に播種し Out growth してきた細胞は敷石状で上皮細胞様形態を示した。しかしながら継代を行うとその増殖活性が著しく減少したことから、初代培養細胞に直接 Snail, Twist の遺伝子導入を行った。上皮系マーカーの発現抑制を認めたものの、細胞形態に特徴的な変化は認められず、間葉系マーカーおよび未分化マーカーの発現誘導は起きなかった。

次に、歯牙細胞外基質由来タンパク質の組み換えタンパクを精製するため、遺伝子導入された 293 EBNA 細胞の培養上清を回収し、陰イオン交換クロマトグラフィーによる分画及び Ni-NTA agarose によるアフィニティークロマトグラフィーで精製を行ったところ、全長 DPP 組み換えタンパク質 rDPP (pCEP-Full 由来) は約 64 kDa に Stains-all 染色でシングルバンドを示した。精製された組み換えタンパク質は、抗 DPP 抗体を用いたウエスタンブロット解析にて Stains-all 染色で検出したバ

ンドと同位置の分子量を示したことから、本実験で得られた各種組み換えタンパク質は実験に供するのに十分な純度であることが明らかとなった。ELISA 法による無血清培養上清中の組み換えタンパク質の濃度を測定した結果から、rDPP-Full は培養上清中 0.125  $\mu\text{g/ml}$  であるのに対し、rDMP-1 は 1.408  $\mu\text{g/ml}$  であることが推算され、rDPP の上清中への分泌は非常に少なかった。

20 または 100 nM の rDMP-1 及び vitronectin をコートしたプレート上では MG63 細胞の有意な接着を認めた。一方、DPP-Full に対しては MG63 細胞の明らかな接着を認めなかった。次にインテグリン依存的細胞接着能を促進する二価陽イオンの効果を検討したが、rDPP-Full への MG63 細胞の接着は  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  及び  $\text{MgCl}_2$  を添加しても現出しなかった。そこで、DPP は分解されることによってその細胞接着能を示すようになるのではと考えた。まず、DPP の生理的な分解産物を模倣するために、NaOH で各種組み換え DPP タンパク質の加水分解を行い、その分解産物の細胞接着能を検討した。分解された rDPP-Full をコートしたプレートでは MG63 細胞の接着促進が見られた。また、興味深いことに、断片化された RGD 配列非活性型の rDPP-RGE は細胞接着能を示さなかった。すなわち、分解された rDPP-Full が接着能を示し、分解された rDPP-RGE は示さなかったことから、DPP は成体内で分解されることで RGD 配列依存的に細胞接着を発現することが示唆された。

DPP はその過剰発現によりマウス骨芽細胞分化を促進すること、組み換え DPP タンパク質は、マウス及びヒト骨芽細胞株の無血清培養上清中で分解・切断されること、DPP の RGD motif はその近傍アミノ酸が切

断されることにより、細胞刺激因子としての活性を獲得することを明らかとなった。つまり、DPP は intact な状態では細胞刺激活性が低く、RGD 近傍でのプロテアーゼによる切断を受けて活性化され、インテグリンシグナル依存的に細胞接着及び分化などを誘導していると考えられる。また、DPP のみでなく、硬組織に発現する細胞外基質である OPN では、RGD motif の 5 塩基及び 7 塩基 C 末端側に、それぞれ MMP-3 及び トロンピンに認識・開裂される箇所があり、開裂により RGD motif が露出することで細胞膜上のインテグリン受容体と会合できるようになり、その機能が惹起されるというメカニズムが提唱されている (J Immunol 1999; 162:1024-1031, J Biol Chem 2001; 276: 28261-28267, 日本サルコイドーシス会誌 2005 ; 25 : 3-9)。このような背景から、DPP の RGD motif 近傍を特異的に認識するプロテアーゼが存在し、このプロテアーゼは DPP のみならず、様々な細胞外基質中の RGD motif の活性を増強し、細胞刺激因子としての機能を惹起していると示唆される。これら歯牙細胞外基質由来の組み換えタンパクによる効率的な細胞分化誘導を行うには、生体内での分解やその責任プロテアーゼの同定が有用であると考えられる。

#### 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. Hashikata, A., Yamashita, A., Suzuki, S., Nagayasu, S., Shinjo, T., Taniguchi, A., Fukushima, M., Nakai, Y., Nin, K., Watanabe, N., Asano, T., Abiko, Y., Kushiya, A., Nagasaka, S., and \*Nishimura, F. The Inflammation-lipocalin2 axis may contribute to the development of chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. (2014) 29(3):611-618. 査読有

2. Suzuki, S., and \*Kulkarni, A. B. Lessons Learned from Mouse Models of DSPP, DSP, and DPP. Bentham Science Publishers. (2012) (10):221-230.

3. \*Suzuki, S., Haruyama, N., Nishimura, F., and Kulkarni, A. B. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. Arch Oral Biol. (2012) 57(9):1165-1175. 査読有

4. Nagayasu, S., Suzuki, S., Yamashita, A., Taniguchi, A., Fukushima, M., Nakai, Y., Nin, K., Watanabe, N., Nagasaka, S., Yabe, D., and \*Nishimura, F. Smoking and adipose tissue inflammation suppress leptin expression in Japanese obese males: potential mechanism of resistance to weight loss among Japanese obese smokers. Tob. Induc. Dis. (2012) 10.1186/1617-9625-10-3. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

鈴木茂樹

第 138 回日本歯科保存学会 シンポジウム I「若手研究者が描く Pulp Wound Healing & Regeneration」講演タイトル：内在性 Wnt による歯髄創傷治癒促進効果と Dentin Phosphoprotein による硬組織形成作用の検討 平成 25 年 6 月 27 日 福岡国際会議場

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

鈴木 茂樹 (SUZUKI SHIGEKI)

広島大学・大学院医歯薬学保健学研究院・助教

研究者番号：30549762

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：