

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593112

研究課題名(和文) 歯髄細胞を用いた石灰化メカニズムの分子生物学的解析

研究課題名(英文) Molecular analysis for the calcification mechanism using dental pulp cells

## 研究代表者

中村 美どり(Nakamura, Midori)

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：90278177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：1. ヒト歯髄細胞およびヒト骨髄間質細胞のin vivoにおける硬組織形成能と破骨細胞誘導能を検討するため、免疫不全マウスに、ヒト歯髄細胞またはヒト骨髄間質細胞を含むコラーゲンスポンジを背側筋膜下に移植した。その結果、ヒト歯髄細胞の移植片のみ硬組織様の構造物が形成された。  
2. マイクロアレイ解析にてヒト歯髄細胞とヒト骨髄間質細胞間の発現量に差のある遺伝子の探索を行った。ヒト歯髄細胞は石灰化促進因子であるBMP-2とALPの発現が高く、一方石灰化抑制因子であるENPPおよびMGPの発現は低いことから硬組織形成に非常に有利な形質を有していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cultured mouse and human dental pulp (DP) cells exhibited strong alkaline phosphatase (ALP) activity compared with mouse osteoblasts and human mesenchymal stromal cells (MSC). To explore candidate genes to explain the character of DP cells, we conducted a GeneChip microarray analysis to detect differences in expression between DP cells and osteoblasts or MSC. The mRNA level of tissue non-specific ALP and BMP-2 in mouse and human DP cells was strikingly higher than that in mouse osteoblasts or human MSC. In contrast, the mRNA level of ENPP1, which hydrolyzes nucleoside triphosphate (NTP) to inorganic pyrophosphate (PPi), in mouse and human DP cells was much lower than that in mouse osteoblasts or human MSC. The mouse and human DP cells were transplanted into the muscle of immunocompromised NOD/Shi-scid IL2Rg (null) (NOG) mice and then recovered after 2 months. Soft X-ray images showed that explants of DP cells but not control explants formed a dense mineralized mass.

研究分野：口腔生化学

キーワード：歯髄細胞 骨髄細胞 骨芽細胞 石灰化 アルカリホスファターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

歯髄および歯根膜は *in vivo* において石灰化しない組織である。しかし、これらの組織から培養細胞を調製すると、骨芽細胞のような骨形成活性を獲得することが知られている。この理由としては、生体における歯髄・歯根膜には石灰化阻害因子が存在する可能性も提唱されている。

現在まで多くの研究者が歯髄細胞や歯根膜細胞に関する細胞生物学的研究を遂行してきた。我々もマウス切歯から採取した歯髄組織から歯髄細胞の調製を行い、その特異的形質発現の解析を行ってきた。その結果、歯髄細胞は骨芽細胞と比較して、著しく高いアルカリホスファターゼ活性を有し、骨誘導因子 (BMP) の非存在下で石灰化可能であることを見出した。

また、我々はマウス由来の歯髄細胞、骨芽細胞および骨髄間質細胞から RNA を調製し、マイクロアレイ解析を行うことにより、骨形成促進および阻害因子候補をスクリーニングしてきた。その実験結果から、歯髄細胞の有する高い石灰化能力は、カルシウムチャネル (Anxa8) やリン酸トランスポーター (Slc20a2) の高発現、一方、MGP やピロリン酸合成酵素 (ENPP1) の低発現などに起因する可能性が示された。

アルカリホスファターゼ、リン酸トランスポーター (Slc20a2)、カルシウムチャネル (Anxa8) の機能発現は、局所におけるカルシウムとリン酸の集積を惹起し、ヒドロキシアパタイト結晶を形成させると推測される。また、この場においては、骨芽細胞や象牙芽細胞の細胞膜断片から形成される「基質小胞」が重要な役割を担っていることが知られている。

今回我々が計画した研究においては、本来は石灰化しない組織を構成する歯髄細胞が *in vitro* で獲得する高い石灰化活性の制御機構を研究する。この研究で得られた実験結果は、未だ全容が明らかになっていない石灰化の分子機構の解明に寄与できると考えている。

さらに、これらの基礎的研究成果を基にして、歯槽骨吸収の予防及び残存する歯槽骨を増生に關する薬剤の開発を目指す。歯髄細胞移植を用いた歯槽骨 (顎骨) 増生方法の確立は、現在行われている iPS 研究やヒト骨髄細胞由来の間質細胞移植などの研究と並行して進行させることにより、口蓋裂における骨欠損や歯周病をはじめとする歯槽骨吸収患者に対する新しい治療法の開発にも直結すると信じている。

## 2. 研究の目的

骨組織では、一生涯にわたり吸収と形成による改造現象 (リモデリング) が行われている。一方、形成後の歯質に関しては、生理的代謝の一環として吸収されることはない。しかし、我々はマウス歯髄細胞を細胞培養系に

移すと、骨芽細胞と比較して著しく強い石灰化能を獲得することを見出した。本研究においては、未だ不明である骨や象牙質をはじめとする硬組織の石灰化に関する分子機構を明らかにすることを目的とする。そして、ヒト歯髄細胞の培養系を確立することにより、骨組織のみならず神経や筋肉組織などの再生医療への応用を目指したトランスレーショナルな研究の発展を目指したい。

## 3. 研究の方法

本研究においては、本来石灰化しない組織を構成する歯髄細胞が *in vitro* で獲得する高い石灰化能に関するメカニズムを分子生物学的 (マイクロアレイ解析) に解明する。この解析結果から得られた石灰化を調節する分子の生体内における機能について、*in vivo* 実験において組織化学的に証明する。さらに、これらの基礎的研究成果を基にして、歯槽骨吸収モデルマウスを用いて、歯周病の予防および残存する歯槽骨の増生に關する薬剤の開発を目指す。

また、ヒトの乳歯や抜去歯由来の歯髄組織から調製した細胞群を簡単に培養するシステムを構築して、再生研究の材料として歯髄細胞の活用を目指す。現在行われている各種疾患に対する患者由来の骨髄間質細胞移植を歯髄細胞移植に代替させる可能性を詳しく検討する。

### (1) 歯髄細胞を用いた石灰化メカニズムの解析

マウスの歯髄細胞と骨芽細胞を用いたマイクロアレイ解析の結果、歯髄細胞において強い活性を示すリン酸トランスポーター (Slc20a2) やカルシウムチャネル (Anxa8) 遺伝子を骨芽細胞に導入すると、高い石灰化能力を獲得するという予備的実験結果を得ている。これらの実験結果が、ヒトの細胞においても再現可能であるかどうかを詳しく検討する。

歯髄および歯根膜は *in vivo* において石灰化しない組織であることから、これらの組織には石灰化阻害因子が存在する可能性がある。そこで、ヒト由来の歯髄・歯根膜・歯槽骨から RNA を調製し、マイクロアレイ解析を行うことにより、骨形成促進および阻害因子候補をスクリーニングする。

### (2) 歯槽骨吸収モデルマウスを用いた骨量増加作用の解析

OPG 欠損マウスは全身性の骨吸収の亢進と共に骨形成の促進が共役して認められるモデルである。このマウスを用いて、我々は、新規かつ簡便な歯槽骨吸収モデルを作製することに成功した。

最近、破骨細胞が分泌するカテプシン K に対する阻害剤 (オダナカティブ) が、骨形成活性を抑制することなく、骨量を増加させることが示された。カテプシン K 阻害剤は破骨細胞の分化誘導の過程には影響を与えずに、成熟破骨細胞の骨吸収活性に対して特異的

な阻害活性を示す。そこで、OPG 欠損マウスに対するオダナカタイプ投与実験を行い、骨吸収を抑制しながら、骨代謝回転を低下させず骨形成を促進する分子機構について詳しく検討する。

(3) 歯槽骨再生を目指した歯髄細胞移植に関する臨床的研究

連携研究者である信州大学医学部・下平滋隆准教授との共同研究において、患者骨髄由来間質細胞の歯槽骨再生に関する臨床研究を遂行している。

この過程で最近、細胞移植の骨形成に対する効果の定量的解析については、MRI を用いた解析方法を世界に先駆けて確立した。すなわち、MRI を用いた T2 強調アイディアル水画像を用いた硬組織形成部位の特定方法である。この方法を用いることにより、放射線被爆が無い条件での経時的な詳しい骨形成解析を行うことが可能となった。

#### 4. 研究成果

我々は、マウス歯髄細胞は著しく高い細胞外基質石灰化能を有し、in vivo においても高い硬組織形成能を有することを見出した。本研究では、ヒト歯髄細胞 (hPC) を用いた再生医療の確立を目的とし、hPC の有する特異形質と生体移植による硬組織形成能について解析を行った。さらに、hPC とヒト骨髄間質細胞 (hMSC) をそれぞれ免疫不全マウス (RAG-1 欠損マウス) に移植し、両者の in vivo における硬組織形成能を解析した。

(1) hPC と hMSC の細胞外基質石灰化能を比較するために、hPC と hMSC を、石灰化促進物質として知られるアスコルビン酸および b-グリセロリン酸の存在下または非存在下に培養した。hPC は hMSC と比べ、どの培養条件においても高いアルカリホスファターゼ活性を示した。

(2) hPC および hMSC の in vivo における硬組織形成能と破骨細胞誘導能を検討するため、免疫不全マウスに、hPC または hMSC を含むコラーゲンスポンジを背側筋膜下に移植した。その結果、hPC の移植片のみ硬組織様の構造物が形成された。

(3) 硬組織様構造物の細胞が、ドナーである hPC からレシピエントに由来する細胞が調べられるため、免疫不全マウスに、移植片をヒト由来抗原特異的に認識する抗ヒト Vimentin 抗体を用いた免疫蛍光染色に供した。硬組織様構造物は、ヒト Vimentin 陽性細胞で構成されていた。従って、誘導された硬組織様構造物は、hPC により形成されたことが示された。

(4) マイクロアレイ解析にて hPC と hMSC 間の発現量に差のある遺伝子の探索を行った。hPC は石灰化促進因子である BMP-2 と ALP の発現が高く、一方石灰化抑制因子である ENPP および MGP の発現は低いことから硬組織形成に非常に有利な形質を有していることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Naruse K, Udagawa N, Garg A, Nakamura M and Nakano K (2014) Vertical ridge augmentation using allograft and synthetic hydroxyapatites after strategic extraction. Clin Adv Periodontics 4:81-7 (査読有)

Udagawa N, Koide M, Nakamura M and Takahashi N (2013) Minocycline to be used a potential anti-bone resorption agents due to the suppression of osteoclastic bone resorption. Journal of Oral Biosciences 55, 16-22 (査読有)

Horibe K, Nakamichi Y, Uehara S, Nakamura M, Koide M, Kobayashi Y, Takahashi N and Udagawa N (2013) Roles of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine osteoclastogenesis. Immunology 140:344-51 (査読有)

Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N and Udagawa N (2013) Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: Comparison with RANKL- over expressing transgenic male mice. Endocrinology 154:773-82 (査読有)

Furuya Y, Inagaki A, Khan M, Mori K, Penninger JM, Nakamura M, Udagawa N, Aoki K, Ohya K, Uchida K, Yasuda H (2013) Stimulation of bone formation in cortical bone of mice treated with a receptor activator of nuclear factor- B ligand (RANKL)-binding peptide that possesses osteoclastogenesis inhibitory activity. J Biol Chem 288:5562-71 (査読有)

[学会発表](計 7 件)

The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2014 Annual Meeting 2014 年 9 月 Possible role of RANKL-RANK signal in osteoblast differentiation: Nakamura M, Yamashita T, Nakamichi Y, Furuya Y, Yasuda H and Udagawa N (JBMR 29: pS163, SA0215) George R. Brown Convention center (Houston, USA)

歯科基礎医学会学術大会(第 56 回)2014 年 9 月 破骨細胞と骨芽細胞の分化を制御する RANKL 信号伝達: 中村美どり, 古屋優里子, 保田尚孝, 宇田川信之(第 56 回歯科基礎医学会学術大会抄録集: p39, SS14-4) 福岡国際会議場(福岡市博多区)

日本骨免疫会議(第 1 回)2014 年 7 月 W9 ペプチドのヒト破骨細胞分化抑制作用とヒト骨芽細胞分化促進作用: 中村美どり, 米田紘一, 徳田吉彦, 山下照仁, 中道裕子, 古屋優里子, 保田尚孝, 宇田川信之(第 1 回日本骨免疫会議抄録集: p215, OP2-3) 万国津梁館(名護市)

日本骨免疫会議(第1回)2014年7月 硬組織再生におけるヒト歯髄細胞と骨髄間葉細胞の有用性についての比較解析: 中道裕子, 徳田吉彦, 萩原貴寛, 堀部寛治, 中村美どり, 高橋直之, 宇田川信之(第1回日本骨免疫会議抄録集: p215, OP2-5) 万国津梁館(名古屋市)

日本骨代謝学会学術集会(第32回)2014年7月 RANKL-RANKシグナルの骨芽細胞分化促進作用の可能性: 中村美どり, 山下照仁, 堀部寛治, 古屋優里子, 保田尚孝, 宇田川信之(第32回日本骨代謝学会プログラム抄録集: p252, P1-04) 大阪国際会議場(大阪市北区)

日本小児歯科学会大会(第52回)2014年5月 神経成長因子 Netrin-1 の BMP と Noggin による軟骨細胞および骨芽細胞分化における役割: 中村浩志, 八上公利, 定岡直, 中村美どり, 宇田川信之, 大須賀直人(小児歯科学雑誌 52 巻 2 号抄録集: p369, P-2-50) 品川区立総合区民会館(東京都品川区)

日本小児歯科学会大会(第52回)2014年5月 骨形成ペプチド W9 の破骨細胞形成抑制とカップルした骨芽細胞分化誘導作用: 中村美どり, 中村浩志, 宇田川信之, 大須賀直人(小児歯科学雑誌 52 巻 2 号抄録集: p370, P-2-51) 品川区立総合区民会館(東京都品川区)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中村 美どり (NAKAMURA, Midori)  
松本歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 90278177

### (2)研究分担者

中村 浩志 (NAKAMURA, Hiroshi)  
松本歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 00278178

中道 裕子 (NAKAMICHI, Yuko)  
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師  
研究者番号: 20350829

宇田川 信之 (UDAGAWA, Nobuyuki)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 70245801

### (3)連携研究者

安孫子 宜光 (ABIKO, Yoshimitu)  
日本大学・歯学部・教授  
研究者番号: 70050086

田口 明 (TAGUCHI, Akira)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 70243582

下平 滋隆 (SHIMODAIRA, Shigetaka)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号: 80345751