

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462878

研究課題名(和文) ヒト歯髄細胞を用いた自己免疫性唾液腺炎の発症機構の解析と治療法の検討

研究課題名(英文) Pathological analysis of autoimmune sialadenitis using human dental pulp

研究代表者

村松 敬 (Muramatsu, Takashi)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00276982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では著しい唾液分泌障害気候解明のプロトタイプとして自己免疫性唾液腺炎であるシェーグレン症候群患者から得られた歯髄細胞と健常者から得られた歯髄細胞を唾液腺細胞に分化転換させ、比較することで本疾患の成立機序の解明と治療法の確立を目指すことを目的とする。歯髄細胞から唾液腺細胞への分化を試みるため共培養を行ったところ、アクアポリン5(AQP-5)の発現は見られたものの、ムスカリン受容体、アミラーゼの発現は見られず、明らかな分化とは断定できなかったことにより、唾液腺細胞への分化は認められないと判断した。

研究成果の概要(英文)：To investigate mechanism of autoimmune sialoadenitis, transdifferentiation from pulp cells to salivary gland cell was tested using normal and Sjogren syndrome human dental pulp tissues. Co-culture of normal pulp cells and salivary gland cell was carried out and expression of salivary gland cell was investigated using RT-PCR. Dental pulp cell expressed aquaporin-5 (AQP-5) after co-culture of salivary gland cells. However, other markers such as amylase were not detected. The result suggests that transdifferentiation from dental pulp to salivary gland cells is difficult using co-culture technique.

研究分野：歯科保存学

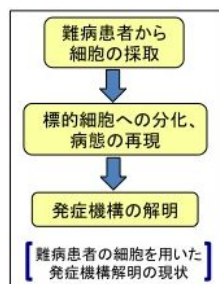
キーワード：唾液腺 シェーグレン症候群 歯髄細胞 分化転換

## 1. 研究開始当初の背景

日本では現在、130種類の難病が指定されており、発症機構の解明、治療法の確立が期待されている。発症機構の解明にあたっては、病変部からの細胞採取が必要となるが、型糖尿病やパーキンソン病などでは、病変が深部臓器や中枢神経に位置しているため、細胞が採取できず、発症の解析が困難であった。近年、難病患者由来の細胞、組織幹細胞やiPS細胞は疾患特異的な性質(疾患原因因子)を有することが明らかとなり、疾患の標的細胞に分化させることで難病発症機構の再現・解析が可能となってきた(右図)(Cell 2009 134:877-86; Nature Med 2010 16:1400-6; Nature 2011 478:391-4)。口腔領域の難病として口腔乾燥症を主徴とするシェーグレン症候群があるが、当研究グループでは、これまでシェーグレン症候群の病因、病態の解析ならびに幹細胞を用いた唾液腺の再生に従事してきた(Science 1997 276:604-7; J Immunol 1999 162:2488-94; J Immunol 2002 169:1050-7; Mol Cell Bio 2006 26:2924-35, J Immunol 2012 188:4654-62; Stem Cells 2012 30:1925-37)。他の難病と同様にシェーグレン症候群患者の幹細胞においても、患者に由来する組織幹細胞は疾患特異的な性質を有することが示唆される。

一方、歯髄は象牙質に囲まれた組織で、齶蝕や切削等の侵襲がなければ細胞分裂を起こすことが少ないため、歯髄には多くの組織幹細胞が存在すると考えられている。研究代表者の村松は従来から歯髄研究に携わり、歯髄細胞が低酸素、熱刺激などの環境に暴露した際のダメージ回避機構を検討し、歯髄細胞は刺激が加わった際に高い増殖能、高い分化能や石灰化能を示すことでダメージを回避し(Eur J Oral Sci 2003 111:332-8; J Dent Res 2006 85:432-5; J Endod 2010 36:668-74, J Dent Res 2010 89:679-83; Cell Calcium 2012 52:124-36)、これらの変化が高齢者の歯髄や老化した歯髄細胞では減少することから、歯髄にみられる高い増殖能や分化能は歯髄幹細胞に起因すると考察してきた(Int Endod J 2004 37:814-8; Int Endod J 2005 38:817-21; J Endod 2008 34:818-21)。

組織幹細胞のうち最も多く研究されているのは骨髄間葉系幹細胞であるが、侵襲が少なく採取できる歯髄から幹細胞の分離と解析が Gronthos ら(PNAS 2000)や Miura ら(PNAS 2003)によって行われ、歯髄幹細胞が骨髄間葉系幹細胞と同様の表面抗原、多分化能を有することが明らかとなり、再生医療研究に用いられるようになった(Gandia *et al.* Stem Cells 2008; Sakai *et al.* J Clin Invest 2012)。また唾液腺の再生において、歯髄幹細胞と同様の性質をもつ骨髄間葉系幹細胞と唾液腺細胞とを共培養することで、骨髄間葉



系幹細胞を唾液腺細胞に分化転換させることが可能という報告がみられてきた(Lin *et al.* J Dent Res 2011; Maria & Tran Stem Cell Dev 2011)。

これらの研究背景から研究代表者らは、シェーグレン症候群患者から分離した歯髄幹細胞を用い、唾液腺細胞に分化転換させることによりシェーグレン症候群の発症機構の解明、さらには治療法の開発が可能であると着想した。具体的には、健常者の歯髄とシェーグレン症候群患者の歯髄からそれぞれ分離した歯髄幹細胞を唾液腺細胞に分化転換させた後に、シェーグレン症候群で特異的に増加あるいは減少する疾患特異的な因子を解明し、さらにシェーグレン症候群特異的な歯髄幹細胞から分化転換された唾液腺細胞は自己抗原を有しているか否かをシェーグレン症候群患者の自己反応性リンパ球と共培養させることで検討できると考え、これにより、シェーグレン症候群の原因解明ならびに治療法の開発が可能になると着想し、本研究の立案に至った。

## 2. 研究の目的

唾液分泌障害は口腔粘膜疾患や多発性の齶蝕や歯周炎だけでなく口臭、さらには嚥下障害や誤嚥性肺炎、萎縮性胃炎を引き起こすことが多く、全身状態やQOLに大きく影響する。このため疾患発症機構の解明や治療法の開発は急務である。本研究では著しい唾液分泌障害機構解明のプロトタイプとして、自己免疫性唾液腺炎であるシェーグレン症候群患者から得られた歯髄細胞と健常者から得られた歯髄細胞を唾液腺細胞に分化転換(transdifferentiation)させ、これらの細胞を比較することで、本疾患の発症機構の解明、さらには治療法の開発を検討することを目的としている。

## 3. 研究の方法

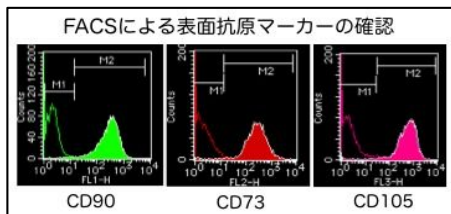
### 1) 歯髄細胞:

歯髄細胞は当研究グループで所有する健常者からの抜去歯(乳歯あるいは第三大臼歯)とシェーグレン症候群患者の抜去歯(千葉県こども病院より供与)からの歯髄細胞を用いる。

### 2) 歯髄から幹細胞の分離

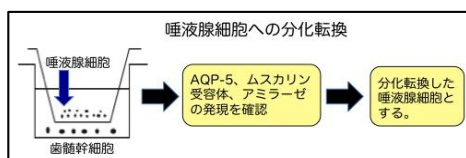
幹細胞の分離はGronthosら(2000)の方法に準じて行う。抜去歯から無菌的に歯髄を摘出し、酵素処理後、6-wellのdishに播種する。2週後に細胞が50個以上の細胞集団を形成したものを選ぶ。このうちFACS解析にて表面抗原マーカー

CD73, CD90, CD105 が95%以上陽性（右図）で、CD11b, CD19, CD34, CD45, HLA-DRに2%以下で陽性を示す細胞を歯髄幹細胞とする。



### 3) 唾液腺細胞への分化転換との確認

歯髄幹細胞から唾液腺に分化転換させるためには、まず研究分担者の美鳥が研究しているマウス胎児顎下腺由来間葉系細胞をフィーダーとし、その上に歯髄幹細胞を播種することで唾液腺細胞への方向付を行う。その後、Maria & Tran の方法(2011)にしたがい、歯髄幹細胞とヒト耳下腺あるいは顎下腺細胞を Transwell を用いて3-7日間、共培養した後、歯髄幹細胞からRNAを抽出し、RT-PCR法にて唾液腺細胞のマーカであるアクアポリン5 (AQP-5)、ムスカリン受容体、アミラーゼの発現を検索する(右図)。唾液腺マーカーの発現が確認されたものを分化転換した唾液腺細胞として使用する



### 4. 研究成果

歯髄細胞から唾液腺細胞への分化を試みるため両者をトランスウェルを用いて共培養を行ったところ、歯髄細胞にアクアポリン5 (AQP-5)の発現が見られた。一方、他のマーカーであるムスカリン受容体、アミラーゼの発現は見られなかった。このことから明らかな分化とは断定できなかったことにより、唾液腺細胞への分化は今回用いた方法では認められないと判断し、さらなる検索が必要と判定した。

### 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13件)すべて査読あり

Ide F, Muramatsu T, Ito Y, Kikuchi K, Miyazaki Y, Saito I, Kusama K.

An expanded and revised early history of adenomatoid odontogenic tumor  
Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology 115(5): 646-651, 2013

Yamamura Y, Yamada H, Sakurai T, Ide F, Inoue H, Muramatsu T, Mishima K, Hamada Y, Saito I.

Treatment of salivary gland hypofunction by transplantation of dental pulp cell.

Archives of Oral Biology 58(8):935-942, 2013

Ide F, Ito Y, Matsuoka K, Muramatsu T, Saito I.

Re-excision perineural invasion in oral squamous cell carcinoma.

Oral Diseases 20(2):219-20, 2014

Sobhan U, Sato M, Shinomiya T, Okubo M, Tsumura M, Muramatsu T, Kawaguchi M, Tazaki M, Shibukawa Y.

Immunolocalization and distribution of functional temperature-sensitive TRP channels in the salivary gland.

Cell & Tissue Research 354(2):507-19, 2013

Muramatsu T, Hashimoto S, Shibukawa Y, Yuasa K, Furusawa M Shimono M

Immunoelectron microscopic observation of connexin43 in rat odontoblasts.

Microscopy Research and Technique 76(10):988-991, 2013

Muramatsu T, Yuasa K, Ebihara K, Shibukawa Y, Ohta K, Furusawa M, Shimono M.

Glucose-free conditions induce the expression of AMPK in dental pulp cells.  
Archives of Oral Biology 58(11):1603-1608, 2013.

Ishii A, Muramatsu T, Higa K, Shinozaki N, Jung HS, Lee JM, Shibahara T  
Alterations in p75<sup>NGFR</sup> expression in the buccal mucosa epithelium with re-epithelialization.

Acta Histochemica et Cytochemica 47(4):145-153, 2014.

Takaichi S, Muramatsu T, Jung HS, Lee JM, Katakura A, Shinozaki N, Yamane GY  
Re-epithelialization process in oral mucosa after chemical injury.

Acta Histochemica et Cytochemica 47(5): 195-201, 2014

Ochiai-Shino H, Kato H, Sawada T, Onodera S, Saito A, Takato T, Shibahara T, **Muramatsu T**, Azuma T.

A novel strategy for enrichment and isolation of osteoprogenitor cells from induced pluripotent stem cells based on surface marker combination.

PLOS ONE 9(6):e99534, 2014.

Yamamura K, Miura T, Tanabe K, Yi H, **Muramatsu T**, Furusawa M, Yoshinari M.

Influence of various superhydrophilic treatments of titanium on the initial attachment, proliferation, and differentiation of osteoblast-like cells.

Dental Materials Journal 34(1): 120-127, 2015.

Aida N, Ushikubo T, Kobayashi F, Sako R, Suehara M, Furusawa M, **Muramatsu T**.

Actin stabilization induces apoptosis in cultured porcine epithelial cell rests of Malassez.

International Endodontic Journal (in press) DOI: 10.1111/iej.12494

Yoshizawa Y, Ochiai-Shino H, Tsukinowa T, Onodera S, **Muramatsu T**, Furusawa M, Azuma T.

The comparison between single vs repeated administration of Wnt3A of HPDL cells.

Journal of Hard Tissue Biology 24(4):331-340, 2015.

Tsukinowa T, Onodera S, Yoshizawa Y, Saito A, **Muramatsu T**, Furusawa M, Azuma T.

Synergistic and mutual antagonistic regulations of Wnt inhibitors play an important role in osteoblast differentiation of human periodontal ligament cells.

Journal of Hard Tissue Biology 24(4):311-318, 2015.

〔学会発表〕(計4件)

井上裕子、美島健二、清水孝彦、**村松 敬**、伊藤由美、梁 洪淵、井出文雄、**齋藤一郎**

カロリー制限による唾液分泌能改善効果の分子機構の解明

第102回日本病理学会総会

平成25年6月6-8日 札幌市

高橋絢子、井上裕子、梁洪淵、伊藤由美、**村松 敬**、**齋藤一郎**

ケルセチンによる唾液分泌機能亢進の検討

第13回 日本抗加齢医学会

平成25年6月28-30日 横浜市

梁 洪淵、井上裕子、亀山真由美、新美 愛、高橋綾子、伊藤由美、**村松 敬**、玉置 洋、**齋藤一郎**

ドライマウス(口腔乾燥症)に対するイソフラボンの唾液分泌促進効果の検討

第13回 日本抗加齢医学会平成25年6月28-30日 横浜市

井上裕子、美島健二、清水孝彦、**村松 敬**、伊藤由美、梁 洪淵、井出文雄、川島素子、坪田一男、**齋藤一郎**

カロリー制限による唾液分泌能改善効果の分子機構の解明

第13回 日本抗加齢医学会

平成25年6月28-30日 横浜市

6. 研究組織

(1)研究代表者

村松 敬 (Takashi Muramatsu)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 00276982

(2)研究分担者

梁 洪淵 (Koufuchi Ryo)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号: 10298268

美島 健二 (Kenji Mishima)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号: 50275343

井上 裕子 (Hiroko Inoue)

日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 50367306

齋藤 一郎 (Ichiro Sato)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号: 60147634