

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462892

研究課題名(和文) ヒト歯髄幹細胞の造骨性分化を誘導するPI 3-kinase/Aktシグナルの解析

研究課題名(英文) Analysis of PI3-kinase/Akt signaling on the osteogenesis of dental pulp stem cells in human.

研究代表者

片山 直 (KATAYAMA, Tadashi)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：10105596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄幹細胞の石灰化を誘導する物質を調べた。歯髄幹細胞が細胞接着分子の一つであるCD44を強発現していることを見出した。そこで、CD44のリガンドであるヒアルロン酸を歯髄幹細胞に作用させたところ、細胞の石灰化シグナルが顕著に誘導された。このヒアルロン酸の石灰化作用はCD44の中和抗体で確実に阻害された。ヒアルロン酸刺激による細胞内シグナルを調べたところ、MAPK、SmadやAktシグナルを活性化させたが、それらシグナルの選択的阻害剤では歯髄幹細胞の石灰化誘導は全く抑制できなかったため、MAPK、SmadやAktシグナル以外のシグナル伝達系が歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the inducing agents to calcify dental pulp stem cells. We found out that CD44, one of cell adhesion molecule was strongly expressed on dental pulp stem cells. When hyaluronic acid, a ligand of CD44 was added to dental pulp stem cells, the calcification of cells was induced markedly. Moreover, the effect of hyaluronic acid on calcification of cells was certainly inhibited by neutralizing antibody of CD44. Therefore, we investigated the intracellular signal induced by the stimulation of hyaluronic acid in dental pulp stem cells. Hyaluronic acid activated MAPK, Smad and Akt in dental pulp stem cells. However, the hyaluronic acid-induced calcification was hardly suppressed by selective inhibitors of MAPK, Smad and Akt. These results suggested that hyaluronic acid may induce odontoblast differentiation of dental pulp stem cells through other signaling different from MAPK, Smad and Akt.

研究分野：保存治療学

キーワード：歯髄幹細胞 分化誘導 硬組織再生 ヒアルロン酸 CD44 シグナル伝達系

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療の必要性が声高に叫ばれ、実現へのいくつかの可能性が示されるようになってきた。胚性幹細胞 (ES 細胞)、iPS 細胞など大きな夢と可能性を秘めた実験方法が確立されてきている。また、ヒト歯髄細胞から iPS 細胞が作成され、歯髄細胞はヒト細胞の中でも高い増殖能を保持していることから、iPS 細胞のソースとして非常に優れた素質を持つことが明らかにされている (T Takeda, Y Tezuka, M Horiuchi, K Hosono, T Kunisada, T Shibata, K Tezyka. Characterization of Dental Pulp Stem Cells of Human Tooth Germs. J Dent Res, 87(7); 676-681, 2008)。しかしながら、再生医療において、現在、最も重要なことは、幹細胞から再生を目的とする組織を構成する細胞へ、いかに確実に、かつ、効率的に分化を決定するかにある。

## 2. 研究の目的

申請者は今まで、感染などのリスクを除外するために、自己由来の生体材料を増殖因子の供給源として、多血小板血漿 (platelet-rich plasma; PRP) によるヒト歯髄細胞の硬組織形成を一連の研究テーマとしてきた。その結果、血小板と血漿成分との混合物である PRP から、血漿成分を除去し洗浄血小板 (WPLT) として作用させることにより、これらの細胞に対する安定した増殖活性と骨様の石灰化促進作用が得られることを明らかにした。さらに、WPLT により同細胞の培養系において賛成されるいくつかの因子がオートクライン的に作用することにより、歯髄細胞の分化が促進され、その反応の起点となるのが Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) であることを報告している。

そこで、ヒト歯髄細胞培養系に PGE<sub>2</sub> を添加したところ、WPLT と同様に石灰化が観察され、この反応においては、phosphoinositide 3-kinase/ Akt signal が重要な役割を担って

いることが明らかとなった。現在、再生医療を目的とした実験においては、いくつかのサイトカインを段階的に作用させることにより、目的の細胞に分化させる手法が取られている。しかしながら、その効果は、WPLT よりも劣るのが現状である。一方、PGE<sub>2</sub> 添加により、WPLT と同様の石灰化が可能であれば、簡単で安価な硬組織形成の誘導と言える。また、将来的に歯髄由来 iPS 細胞から、骨芽細胞を分化誘導する場合にも有用であると思われる、増殖能の低いヒト骨細胞を用いるよりも現実的である。そこで、我々はヒト歯髄細胞における PI 3 kinase/Akt シグナルの活性化による効率的な硬組織再生療法実現の可能性の検討を目的とした。

近年、歯髄組織には多分化能を有する歯髄幹細胞 (dental pulp stem cell; DPS) の存在が明らかとなっている (S Gronthos, J Brahim, W Li, LW Fisher, N Cherman, A Boyde, P DenBesten, P Gehron Robey, S Shi. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cell. J Dent Res, 81(8), 531-535, 2002.)。一方、申請者らは現在までの一連の研究の中で、自己由来の増殖因子を有する細胞として洗浄血小板をヒト歯髄培養細胞系に作用させることによって、同細胞の増殖と分化が同時に促進されるという興味ある知見を見出している (H Kikuchi, D Jiamin, T Suda, L Huangwen, W Weijian, K Kobayashi, T Katayama: Washed Platelets Induce Cell Proliferation via Endogenous Prostaglandin E<sub>2</sub> Production in Osteoblasts, FDI, Shenzhen, 2006)。本来、増殖と分化は相反する現象であるが、ヒト歯髄培養細胞は洗浄血小板の作用で、顕著な PGE<sub>2</sub> の産生と共に歯髄培養細胞の初期増殖と骨様石灰化の促進が観察された。この時期に一致して、分化因子である bone glaprotein (BGP) の発現促進も認められ、この発現は洗浄血小板中の TGF-β に依存していることも

確認された(菊池寛高、須田朋代、田島雅道、坂上 宏、片山 直: 洗浄血小板抽出液はヒト歯髄細胞のオステオカルシン遺伝子発現を促進する。第 49 回歯科基礎医学会学術大会, 札幌, 2007 年 8 月)。また、この時に形成される石灰化物は骨に非常に近い組成を示した。対照的に、ヒト歯髄細胞培養系における dentin sialoprotein (DSP) 発現は継代を重ねる毎に、急速に発現量が減少し、5 回の継代で完全に発現が消失した。しかも、これらの発現には PGE<sub>2</sub> 産生が関与していた。従来、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化には、BMP-2 が重要な働きを担っていることが知られているが、洗浄血小板中の TGF-β が BMP など TGF スーパーファミリーの発現を刺激し、歯髄幹細胞の骨芽細胞への分化を誘導して、骨石灰化を促進させる key factor として作用している可能性を強く示唆するものである。これらのサイトカインネットワークの引き金となる因子の 1 つが PGE<sub>2</sub> であると推察された。但し、ヒト歯髄幹細胞から骨芽細胞への効率的な分化を促進することが、硬組織再生療法の確立に役立つとの観点から、PGE<sub>2</sub> だけに固執することなく、歯髄幹細胞の石灰化誘導物質をより広く探索して、そのメカニズム解析をすることも重要であると考えている。

### 3. 研究の方法

本研究は臨床応用を目的としているため、最終的には採取した歯髄細胞(歯髄幹細胞)から骨芽細胞を効率的に誘導して、骨細胞シートとして移植することを想定しているが、まず、*in vitro* における石灰化誘導物質の探索とそのメカニズムの解析を行う。

(1) ヒト歯髄細胞、マウス骨髄細胞、マウス骨芽細胞(MC-3T3-E1)等を用いて、すでに我々が明らかにしている PGE<sub>2</sub> による歯髄細胞の石灰化陽性反応を指標と

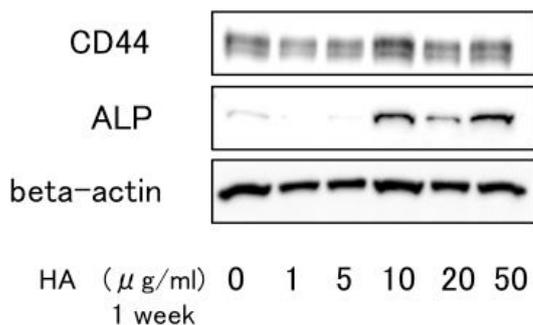
して解析する。歯髄細胞の石灰化のシグナルとして、Akt や ERK などのリン酸化反応を、各種抗体を用いて検索する。石灰化の判定にはアリザリンレッド染色、アルカリフォスファターゼ活性を用いる。

- (2) ヒト歯髄幹細胞に顕著に発現している分子の解析は、免疫蛍光染色によるイメージングとフローサイトメトリーを用いる。そして、強発現が確認された細胞接着分子に対しては、そのリガンド物質を用いて刺激を行い、石灰化誘導の可能性を調べる。
- (3) スクリーニングによって、新たに見出された石灰化誘導物質の細胞内シグナリングを解析する。
- (4) 実験方法については、ウェスタンブロット法によって関与するタンパク質を特定し、また mRNA レベルでの変化については、リアルタイム PCR 法により求めた。さらに、ヒト歯髄幹細胞の石灰化に関与する細胞内シグナリングの解析には、シグナリングの選択的阻害剤を用いた。用いる濃度に関しては、予め前もってヒト歯髄幹細胞でのリン酸化シグナルを確実に抑制できる有効濃度の検討を実施してから、石灰化に関与する細胞内シグナリングの解析に用いた。
- (5) リガンドの作用が特定のタンパク質を介していることを証明する手段として、特定タンパク質の中和抗体を用いた解析を行った。

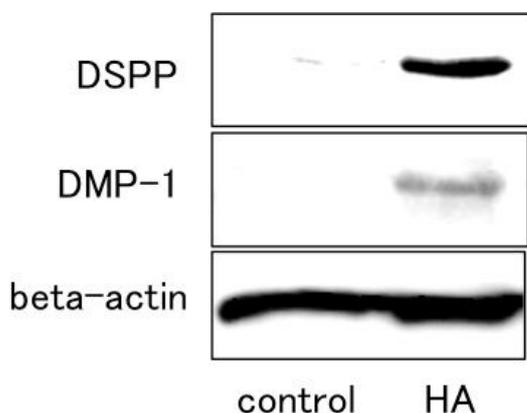
### 4. 研究成果

研究計画・方法に基づき、ヒト歯髄幹細胞を用いて石灰化誘導物質の探索を行った。まず、ヒト歯髄幹細胞に顕著に発現している分子を調べたところ、ヒト歯髄幹細胞には細胞と細胞の融合に関連する細胞表面糖タンパク質である CD44 が強発現していることを新たに見出した。そこで、CD44 のリガンド

であるヒアルロン酸を用いて、ヒト歯髄幹細胞が石灰化誘導されるかどうかを検討した。その結果、ヒト歯髄幹細胞はヒアルロン酸 10 $\mu$ g/mL 以上の濃度でアルカリフォスファターゼを顕著に誘導することが判明した(下図)。

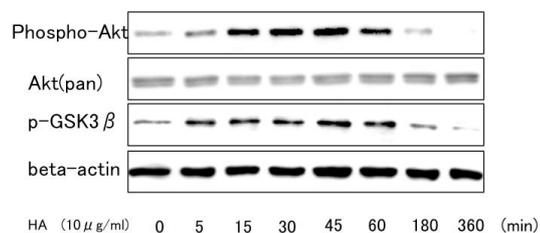


さらに、ヒト歯髄幹細胞はヒアルロン酸により象牙芽細胞の分化マーカーである DSPP (dentin sialophosphoprotein) 及び DMP-1 (dentin matrix acidic phosphorotein-1) の発現誘導が mRNA レベルで確認されたことから、タンパク質レベルでも確認したところ、確実に発現誘導が起きていることが明らかとなった(下図)。但し、mRNA レベルでの解析で、BMP2 や BMP4 にはほとんど影響が認められないことも確認した。

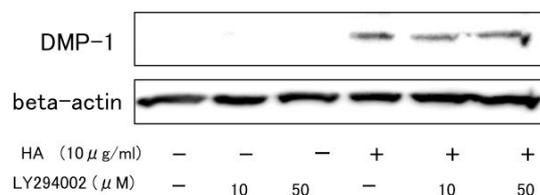


これらの結果から、ヒアルロン酸はヒト歯髄幹細胞を象牙芽細胞様に分化誘導させる可能性が示唆された。そこで、ヒアルロン酸がヒト歯髄幹細胞の CD44 に結合して象牙芽細胞

様に分化させる際に、どのようなシグナル伝達経路を介しているのかを調べることにした。我々の以前の研究から、ヒト歯髄細胞が PGE<sub>2</sub> によって PI 3 kinase/Akt シグナルを介して石灰化誘導されるという事実を得ていたことから、ヒト歯髄幹細胞がヒアルロン酸によって PI 3 kinase/Akt シグナルを活性化するかどうかを検証した。その結果、ヒト歯髄幹細胞はヒアルロン酸によって、Akt のリン酸化が誘導されることが明らかとなった(下図)。



そこで、PI 3 kinase 阻害剤である LY294002 を用いて、その下流シグナルである Akt を抑制した時に象牙芽細胞様分化マーカーである DMP-1 の発現が抑制されるかどうかを検討した(下図)。用いた LY294002 濃度が Akt のリン酸化を確実に抑制できる濃度であることを予め検討してから実施した。



ところが、Akt を抑制しても DMP-1 の発現全くは抑制されなかった。これによって、ヒアルロン酸による PI3-K/Akt 活性化は、象牙芽細胞様分化には直接関与していないことが判明した。一方、ヒアルロン酸はヒト歯髄幹細胞に対して、BMP の下流シグナルでもある Smad を活性化させていることも観察されたことから、BMP 受容体阻害剤である

DMH-1 を用いて Smad シグナルを確実に抑制した濃度を用いて調べたが、象牙芽細胞様分化マーカーである DMP-1 の発現は抑制が認められなかった。さらに、ヒアルロン酸が歯髄幹細胞の MAPK (mitogen-activated protein kinase)も活性化させたことから、ERK1/2 阻害剤 SCH772984 の有効濃度を用いて同様に調べたが、DMP-1 の発現は全く抑制が認められなかった。これらの結果から、ヒアルロン酸により活性化された PI 3 kinase/Akt、Smad、MAPK のシグナル伝達系は、象牙芽細胞分化誘導には直接関与していないことが判明した。

しかしながら、CD44 の中和抗体を用いると、DMP-1 の発現は完全に抑制されることが確認できた。このことから、ヒアルロン酸によるヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導は、CD44 を介してヒト歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導していることは確実である。但し、CD44 の下流のシグナルについては、現時点では PI 3 kinase/Akt、Smad、MAPK のシグナル伝達系の関与は否定された。しかし、それ以外のシグナル伝達系については未だ明らかには出来ておらず、今後の解明が必要である。

## 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 1 件)

- (1) Umemura N, Ohkoshi E, Tajima M, Kikuchi H, Katayama T, Sakagami H.  
Hyaluronan induces odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via CD44. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Sep 20;7(1):135. doi: 10.1186/s13287-016-0399-8. 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片山 直 (KATAYAMA, Tadashi)  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号: 10105596

### (2) 研究分担者

田島 雅道 (TAJIMA, Masamichi)  
明海大学・歯学部・講師  
研究者番号: 70130995

菊地 寛高 (KIKUCHI, Hirotaka)  
明海大学・歯学部・非常勤講師  
研究者番号: 70234193

村上 幸生 (MURAKAMI, Yukio)  
明海大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 00286014

梅村 直己 (UMEMURA, Naoki)  
朝日大学・歯学部・助教  
研究者番号: 80609107

### (3) 連携研究者

坂上 宏 (SAKAGAMI, Hiroshi)  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号: 50138484