

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462904

研究課題名(和文)象牙芽細胞擬態マトリックスと万能性幹細胞を用いた新規な歯髄再生法の開発

研究課題名(英文) Development of new dental pulp regeneration method using odontogenesis-mimicking matrix and pluripotent stem cells

研究代表者

尾関 伸明 (Ozeki, Nobuaki)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：70469005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞は、特定の微小環境に晒されると様々な細胞に分化することができる。本研究では、象牙芽細胞擬態マトリックスと幹細胞を用いて象牙芽細胞への分化機構を検索し、象牙芽細胞擬態マトリックスと幹細胞の接触が特定の増殖因子の発現および分泌を誘導することが明らかとなった。本研究結果から、象牙芽細胞擬態マトリックスとインテグリンの相互作用により、象牙芽細胞への分化に必要な増殖因子を幹細胞自身が分泌することが明示された。

研究成果の概要(英文)：Pluripotent stem cells can differentiate into multiple cell lineages following exposure to specific microenvironmental signals. We identified unique conditions that mouse pluripotent stem cells (mpSC) to differentiate into odontogenic cell lineages. Isolated acellular mimicking extracellular matrices (mECM) were sufficient to promote cell differentiation along odontoblastic pathways. The mpSC interactions with mECMs and their subsequent differentiation was suppressed by function-blocking integrin antibody. Furthermore, we found that mpSC cultured on the mECM induced the expression and secretion of a set of specific growth factors. These results show that mpSC odontogenic cell lineage commitment is mediated by integrin interactions with specific ECM microenvironment substrates, leading to unique autocrine growth factor secretion.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脱細胞化

1. 研究開始当初の背景

歯髄はさまざまな外来侵襲に対して反応象牙質や修復象牙質の形成を有する重要な組織であり、歯の延命には歯髄組織を極力保存し、その機能を効果的に賦活する処置法が必要である。従来から口腔内に露出した歯髄に対して覆髄法あるいは断髄法を施すことにより、歯髄の機能を保存、維持させる試みがなされている。興味深いことに、歯髄組織は物理的あるいは化学的な刺激により象牙質を再生する能力を有し、近年では、歯髄幹細胞が象牙質の再生に関与することが報告され、幹細胞を用いた再生療法が従来のう蝕治療法に代わる有効な手段となる可能性がある。先行する医学領域においては、角膜、軟骨、血管、心筋などの組織再生に関連する臨床研究が盛んに行われている。さらに、摘出した臓器に界面活性剤を灌流して生細胞を溶解(脱細胞化)し、脱細胞化した細胞外マトリックス(擬態マトリックス)を作製し、この擬態マトリックス上に幹細胞を播種し、目的の細胞へ分化させる(再細胞化)ことで臓器再生を目指す再生治療が近年注目されている。

申請者はこれまでにマウス胚性幹細胞(ES細胞)を用いて、上皮-間葉相互作用を介さない新規な象牙芽細胞様細胞への分化誘導法を報告した。さらに、本細胞中のマトリックスメタロプロテアーゼ-3が歯髄炎における象牙芽細胞様細胞の増殖と抗アポトーシス作用を有し、歯髄再生と創傷治癒に関与することを報告した。また、ヒト骨格筋幹細胞と人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた上皮-間葉相互作用を介さない象牙芽細胞様細胞への分化誘導法についても報告してきた。

本研究では、マウスES細胞およびiPS細胞由来象牙芽細胞の培養後に脱細胞化した象牙芽細胞由来細胞外マトリックス(象牙芽細胞擬態マトリックス)と幹細胞、さらに摘出したラット歯牙の基盤鋳型を用いて歯髄再生のメカニズムを明らかにすることを目的とし

た。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が新規に確立したマウスES細胞およびiPS細胞由来象牙芽細胞を培養後に界面活性剤により脱細胞化し、象牙芽細胞に特異的な細胞外マトリックス(象牙芽細胞擬態マトリックス)を培養ディッシュ上に作製後、幹細胞を播種し、象牙芽細胞の分化誘導ならびに歯髄再生のメカニズムについて生化学的手法を用いて基礎的検討を行う。さらに、ラットより摘出した歯を基盤鋳型として、歯髄再生を観察することで、従来の歯髄保存治療であるう蝕治療法や覆髄法に代わる新規な歯髄再生モデルを構築することを研究目的とする。

3. 研究の方法

マウスES細胞およびiPS細胞由来象牙芽細胞を脱細胞化し、象牙芽細胞擬態マトリックス上に幹細胞を播種し、歯髄再生の効率について生化学的手法を用いて基礎的検討を行う。さらに、ラットを用いた*in vivo*において、摘出した歯を基盤鋳型として歯髄再生を観察する。

4. 研究成果

(1) 象牙芽細胞擬態マトリックスの精製

通法に従い、マウスES細胞およびiPS細胞から象牙芽細胞を分化誘導後、Triton-X, SDSおよびTween-20にて生細胞を除去し、象牙芽細胞擬態マトリックスの精製を行った結果、10% Triton-Xが象牙芽細胞擬態マトリックスの精製に最適であることが明らかとなった。

(2) 象牙芽細胞擬態マトリックスの再細胞化の効率の検討

10% Triton-Xを用いて精製した象牙芽細胞擬態マトリックス上に、幹細胞を播種し、細

胞増殖能, 細胞接着性および細胞運動能について検討を行った結果, 統計学的有意な細胞増殖能, 細胞接着性および細胞運動能が観察された.

(3) 象牙芽細胞擬態マトリックスと幹細胞を用いた歯髄細胞分化の評価

象牙芽細胞擬態マトリックス上に幹細胞を播種し, 経時的に total RNA を抽出し, 歯髄細胞の分化マーカーの遺伝子発現動態を RT-PCR 法を用いて観察した結果, 統計学的有意な歯髄細胞分化マーカーの発現が観察された.

(4) 象牙芽細胞擬態マトリックスと幹細胞を用いた歯髄細胞分化に関するシグナルカスケードの検討

歯髄細胞分化に関わる Wnt シグナル伝達経路について, siRNA を用いて検討したところ, Wnt5 シグナル伝達経路の存在が明らかとなった.

(5) 歯髄細胞分化誘導を導くセンサー分子の同定

骨系組織由来擬態マトリックス上に幹細胞を播種し, 経時的に total RNA を抽出し, 象牙芽細胞分化因子, 骨芽細胞分化因子および軟骨細胞分化因子の発現動態を RT-PCR 法と ELISA を用いて観察すると同時に, siRNA を用いた分化抑制評価を行った結果, 象牙芽細胞擬態マトリックス上に播種した幹細胞は, 象牙芽細胞分化誘導に必須な分化誘導因子を自己分泌することを確認した. また, 幹細胞と擬態マトリックスの接触において, 幹細胞表面のメカニカルセンサー分子がインテグリンであること, さらに, 本タンパク質が擬態マトリックス上の特異的な 2 種類のタンパク質を認識することで, 歯髄細胞分化を導く分子機構であることが明らかとなった.

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 3 件)

① Ozeki N, Kawai R, Hase N, Hiyama T, Yamaguchi H, Kondo A, Nakata K, Mogi M. $\alpha 2$ integrin, extracellular matrix metalloproteinase inducer, and matrix metalloproteinase-3 act sequentially to induce differentiation of mouse embryonic stem cells into odontoblast-like cells. *Experimental Cell Research* 査読有, 2015; 331:21-37.

② Ozeki N, Hase N, Kawai R, Yamaguchi H, Hiyama T, Kondo A, Nakata K, Mogi M. Unique proliferation response in odontoblastic cells derived from human skeletal muscle stem cells by cytokine-induced matrix metalloproteinase-3. *Experimental Cell Research* 査読有, 2015; 331:105-114.

③ Ozeki N, Hase N, Yamaguchi H, Hiyama T, Kawai R, Kondo A, Nakata K, Mogi M. Polyphosphate induces matrix metalloproteinase-3-mediated proliferation of odontoblast-like cells derived from induced pluripotent stem cells. *Experimental Cell Research* 査読有, 2015; 331:105-114.

[学会発表] (計 5 件)

① 尾関伸明, 檜山太希, 長谷 奈央子, 山口秀幸, 川合里絵, 中田和彦. ヒト骨格筋幹細胞を用いた象牙芽細胞分化における象牙芽細胞擬態マトリックスの役割. 第 23 回日本歯科医学会総会, 2016 年 10 月 22 日, 福岡国際会議場・福岡サンパレス (福岡・福岡)

② Ozeki N, Hase N, Yamaguchi H, Hiyama T, Kawai R, Mogi M, Nakata K: Integrins in human stem cells determine odontoblast cell differentiation by recognizing extracellular matrix profiles, leading to autocrine secretion of growth factors. International Association for Dental Research (IADR), Pulp Biology

Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016.

2016年6月27日, 名古屋国際会議場・名古屋市工業研究所 (愛知・名古屋)

③ 尾関伸明, 山口秀幸, 長谷 奈央子, 檜山太希, 川合里絵, 茂木 眞希雄, 中田和彦.
ヒト骨格筋幹細胞を用いた象牙芽細胞分化における象牙芽細胞擬態マトリックスの役割.
日本歯科保存学会 2015年度秋季学術大会(第143回), 2015年11月13日, 文京シビックホール (東京・文京)

④ Ozeki N, Hase N, Kawai R, Yamaguchi H, Hiyama T, Nakata K, Mogi M. Unique Proliferation in Odontoblasts Derived from Human Skeletal Muscle Stem Cells by MMP-3. 第14回日本再生医療学会総会, 2015年3月20日, パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)

⑤ Ozeki N, Mogi M, Yamaguchi H, Hiyama T, Kawai R, Nakata K, and Nakamura H. $\alpha 1$ integrin is required for human skeletal muscle stem cells derived-odontoblasts differentiation. 第13回日本再生医療学会総会, 2014年3月5日, パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾関 伸明 (Ozeki Nobuaki)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号: 70469005

(2) 研究分担者

茂木 眞希雄 (Mogi Makio)

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号: 00174334