

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462981

研究課題名(和文)非ステロイド性抗炎症薬による幹細胞の分化能・組織再生能の解明と応用法の開発

研究課題名(英文) Analyzed stem cell differentiation and regeneration property treated by non steroidal anti-inflammatory agent

研究代表者

筒井 健夫 (Tsutsui, Takeo)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：70366764

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)：非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の作用による、幹細胞特性について、マウス歯髄細胞とヒト歯髄幹細胞、およびヒト歯根膜細胞を用いてアスピリンを作用させ解析を行った。アスピリンを低濃度もしくは高濃度で作用させ解析を行った結果、石灰化誘導能ではマウス歯髄細胞とヒト歯髄幹細胞において、アリザリンレッド陽性像が高濃度において顕著であった。ヒト歯根膜細胞では、非作用群と作用群において差は観察されなかった。脂肪分化誘導においては、ヒト歯髄幹細胞とヒト歯根膜細胞の高濃度作用群において早期にオイルレッドO陽性像が観察され、非ステロイド性抗炎症薬による分化誘導が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed stem cell property that treated with non steroidal anti-inflammatory agent (NSAIDs) using mouse dental pulp cells, human dental pulp stem cells and human periodontal ligament cells. Differentiation potential analyzed by treated with high dose or low dose aspirin. Cultured in osteogenic and adipogenic differentiation medium, prompt positive staining revealed in treated with high dose aspirin. When cultured in adipogenic medium, prompt positive staining revealed in treated with high dose aspirin.

研究分野：幹細胞

キーワード：歯髄幹細胞 歯根膜細胞 非ステロイド性抗炎症薬 アスピリン NSAIDs 幹細胞 分化誘導

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の作用により歯髄幹細胞と歯根膜幹細胞の組織再生能が亢進するという仮説をたて、1) 組織再生能の亢進を解析するためには、歯髄幹細胞と歯根膜幹細胞における NSAIDs の作用を解明する。2) NSAIDs を投与したマウスの歯髄細胞の解析。3) ヒトの歯髄幹細胞と歯根膜幹細胞への NSAIDs の作用の解析より、新たな NSAIDs プロトコルをこれらの解析より樹立する。

NSAIDs は鎮痛・解熱・抗炎症作用を現し、医療現場において頻用されている薬物であるが、幹細胞への作用に関する研究は進んでいない。幹細胞の維持や分化の調節はニッチと呼ばれる微小環境が担っていると考えられ、ニッチの幹細胞保持に関わるメカニズムに、常用量の NSAIDs により動員された造血幹細胞では生着能と長期生着性の亢進が報告されている (Hoggatt et al., 2013)。

口腔内の幹細胞についての研究では、歯髄幹細胞については、血管周囲に STRO-1/CD146/3G5 抗体陽性像として報告されている (Shi et al., 2003)。また、歯根膜幹細胞については、血管周囲に STRO-1/CD146/CD44 抗体陽性像が観察されている (Chen et al., 2006)。

プロスタグランジン (PG) 受容体を介した幹細胞の動員について、PGE<sub>2</sub> 受容体ノックアウトマウスでは、NSAIDs の作用により前駆細胞の増加と前駆細胞と幹細胞の動員が観察され、PGE<sub>2</sub> 受容体のサブタイプである EP4 受容体シグナル伝達が減弱するためと報告している (Hoggatt et al., 2013)。また、歯髄細胞や歯根膜細胞の研究では、歯髄細胞に炎症性サイトカインの IL-1 を作用させインドメタシン添加し COX-2 発現の解析 (Chang et al., 2002) や、NSAIDs による歯根膜細胞における PGE<sub>2</sub> 産生物が減少したとの報告がある (Mingming et al., 2005)。しかし、歯髄幹細胞と歯根膜幹細胞における NSAIDs の作用の報告はない。

*In vivo* における NSAIDs の作用について、NSAIDs を投与したラットの歯髄細胞へ作用は COX-2 の発現低下の報告 (Chang et al., 2012) や、歯根膜において破骨細胞増殖の抑制が報告されている (Oka et al., 2012)。申請者らは NSAIDs を投与されたマウスの解析を行うとともに、ヒト歯髄幹細胞とヒト歯根膜細胞についても NSAIDs の作用について解析を行う。

## 2. 研究の目的

本研究は、ニッチでの幹細胞保持および骨誘導の促進に関わる NSDIDs の作用に着目し、アスピリンを処理したマウス歯髄細胞とヒト歯髄幹細胞、およびヒト歯根膜細胞における分化能について解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究は、日本歯科大学生命歯学部倫理審査委員会および日本歯科大学生命歯学部動物実験委員会の承認を得ている。

### (2) マウス歯髄細胞の培養

マウス歯髄は、マウスの下顎より歯牙を取り出し、メスを用いて歯根膜や結合組織を除去後、歯髄の採取を行った。歯髄は、コラゲナーゼ・ディスパーゼ処理を行い遠心後、細胞懸濁液を作製し、 $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) に 20% FBS と 100 $\mu$ M L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate, 2mM L-glutamin, 100units/ml ペニシリン 100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを用いて、70 $\mu$ m のナイロンセルストレイナーを通過させ培養を行った。

### (3) ヒト歯髄幹細胞の培養

ヒト歯髄は、ヒト抜去歯を 70%エタノールで清掃し、ダイヤモンドバーを用いてセメント-エナメル境に沿って切削後に歯髄を採取した。歯髄は、コラゲナーゼ・ディスパーゼ処理を行い遠心後、細胞懸濁液を作製し、 $\alpha$ -MEM に 20% FBS と 100 $\mu$ M L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate, 2mM L-glutamin, 100units/ml ペニシリン 100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを用いて、70 $\mu$ m のナイロンセルストレイナーを通過させ培養を行った。

### (4) NSAIDs と PG 受容体阻害薬

分化能の解析には、アスピリンの濃度として 2.5 $\mu$ g/ml と 50 $\mu$ g/ml を作用させた。PG 受容体阻害薬には AH6809 と AH23848 を用いて、それぞれ、1 $\mu$ g/ml, 2.5 $\mu$ g/ml および 25 $\mu$ g/ml 作用させた。作用期間は、細胞播種日を含めて 3 日間行い、その後分化培地を作用させた。

### (5) 分化誘導能の解析

石灰化誘導には、 $\alpha$ -MEM に 10% FBS と 100 $\mu$ M L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate、2mM L-glutamin、100units/ml ペニシリン 100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシンに 10mM  $\beta$ -グリセロリンリン酸と 10nM デキサメタゾン を添加し培養を行った。アリザリンレッド染色では、4%パラホルムアルデヒドで固定後に

1%アリザリンレッド S を用いて染色を行なった。脂肪分化誘導には、MEM に 20%FBS と 2 mM L-glutamine 100units/ml ペニシリン 100µg/ml ストレプトマイシン、0.5 mM 3-isobutyl 1-methylxanthine、0.5 µM hydrocortisone、60 µM indomethacin、100 µM ascorbic acid を添加して培養を行なった。オイルレッド O 染色は、4%パラホルムアルデヒドで固定後に 0.18%オイルレッド O を用いて染色した。

#### (6) RT-PCR

mRNA の発現を RT-PCR で解析を行なった。細胞培養より RNA の抽出と精製を行い、またプライマーには *Oct3/4*、*Nanog*、*Alkaline phosphatase (ALP)*、*CD146*、*CD133*、*Collagen type I(COL-I)*、*Bone sialoprotein (BSP)*、*F-Spondin*、*Periostin* を用いて、サーマルサイクラーにて PCR を行い、アガロースゲルにて発現を解析した。

#### (7) トランスプランテーションと NSAIDs の投与

トランスプランテーションは、細胞をハイドロキシアパタイト/三リン酸カルシウム (HA/TCP) と混合し、麻酔下の免疫不全マウスに皮下移植を行なった。移植後、サンプルを採取し 4%パラホルムアルデヒドで固定し 10%EDTA にて脱灰を行なった。脱灰後、パラフィン包埋を行い薄切切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色を行なった。

マウスへの NSAIDs の投与は、アスピリンを 30mg/litter ( low dose ) を 300mg/litter ( high dose ) を投与する。最初の 1 週間は high dose を投与し、low dose へ移行する。給水ボトルの交換は 2-3 日毎で行う。

#### (8) 歯根膜細胞の培養

抜去歯を 1000U ペニシリンと 1000µg ストレプトマイシンが含有されているリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄し、付着している組織を剥離し 60mm dish にて培養を行なった。培地は Dulbecco's modified Eagle's medium に 10% FBS と 0.25mM L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate、100units/ml ペニシリン 100µg/ml ストレプトマイシンを用いた。また、*H-TERT* 遺伝子を導入し細胞の不老化を得た。

### 4. 研究成果

(1)用いたヒト歯髄幹細胞については、初代培養から継代培養を行い、RT-PCR と免疫不全マウス皮下へのトランスプラントより幹細胞特性を確認された細胞を用いた。RT-PCR

より、幹細胞関連遺伝子として、*Oct3/4*、*Nanog*、*ALP*、*CD146*、*CD133*、また象牙質関連遺伝子として *COL-I*、*BSP* の発現が確認されている。*In vivo* 実験では、幹細胞の組織再生能について、ヒト歯髄幹細胞を HA/TCP とスキャフォールドとしてトランスプランテーションを行い、サンプルの採取後 H-E 染色を行い、歯髄結合組織や象牙芽細胞様細胞、および象牙質様基質より、象牙質 / 歯髄様複合体が観察されている。

(2)ヒト歯髄幹細胞とマウス歯髄細胞についてアスピリンを作用させるため濃度検定を行い、時間および濃度依存的に細胞数の減少傾向が観察された。細胞増殖曲線によりアスピリンを 2.5µg/ml と 50µg/ml を作用させたヒト歯髄幹細胞において、コントロール群 (非処理群) と比較し、細胞増殖傾向の有差は認められなかった。

(3)マウスへのアスピリンの経口投与を 300mg/litter ( high dose ) を 1 週間給水ボトにて投与後に 300mg/litter ( high dose ) を同様に給水ボトルにて投与した。マウス歯髄組織の組織学検査より、コントロール群 (非投与群) と比較して、H-E 染色像に異常像は観察されなかった。

(4)石灰化誘導において、マウス歯髄細胞とヒト歯髄幹細胞に対しアスピリン前処理により、アリザリンレッド陽性像の誘導に違いが観察された。ヒト歯髄幹細胞においては、50µg/ml で前処理を行った作用群では顕著なアリザリンレッド陽性像が観察された。

(5)ヒト歯根膜細胞とヒト不死化歯根膜細胞において、歯根膜関連遺伝子である、*F-Spondin*、*Periostin* の発現が RT-PCR より解析された。石灰化誘導においては、2.5µg/ml と 50µg/ml のアスピリン前処理による非処理群とのアリザリンレッド陽性像に差は認められなかった。

(6)アスピリン前処理による脂肪分化誘導において、ヒト歯髄幹細胞では 50µg/ml の処理群において非処理群と比較して早期のオイルレッド O 陽性像が観察された。また、ヒト歯根膜細胞においては、非処理群と比較して、50µg/ml 作用群において早期のオイルレッド O 陽性像が観察され、また、経時的に 2.5µg/ml と 50µg/ml 処理群において陽性像が増加傾向であった。ヒト不死化歯根膜細胞においては、非処理群と比較して、50µg/ml 処理群において早期のオイルレッド O 陽性像が観察され、ヒト歯根膜細胞との比較においても経時的に 2.5 µg/ml と 50 µg/ml 処理群において陽性像がより増加傾向であった。

(7) プロスタグランジン受容体阻害薬としてAH6809とAH23848を用いてそれぞれをヒト歯髄幹細胞へ、1 $\mu$ g/ml, 2.5 $\mu$ g/mlおよび25 $\mu$ g/mlの前処理を行った。石灰化誘導能においては、全ての濃度において、非処理群と比較して、アリザリンレッド陽性像に差は認められなかった。また、脂肪分化誘導においては、AH6809とAH23848それぞれを1 $\mu$ g/ml, 2.5 $\mu$ g/mlにて前処理を行った。分化誘導培地にて経時的にオイルレッドO陽性像は観察されたが、アスピリンの前処理時と比較して、オイルレッドO陽性像は顕著に減少した。アスピリンによるヒト歯髄幹細胞に関して、石灰化および脂肪分化において、誘導的に作用することが示唆された。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

筒井健夫, 小林朋子, 鳥居大祐, 松井美紀子, 中原 貴: ヒト歯髄幹細胞とヒト歯根膜細胞の分化能へのアスピリン作用の解析  
歯科基礎医学会学術大会  
札幌コンベンションセンター  
2016年8月24日～2016年8月26日  
(北海道・札幌市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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 0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

筒井 健夫 (TSUTSUI Takeo)  
日本歯科大学・生命歯学部・教授  
研究者番号：70366764

#### (2) 研究分担者

中原 貴 (NAKAHARA Taka)  
日本歯科大学・生命歯学部・教授  
研究者番号：10366768