

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462983

研究課題名(和文) 歯根膜由来の幹細胞の特性と歯周組織への分化誘導機構の解明

研究課題名(英文) Characteristic of the stem cells in periodontal ligament and differentiation mechanism of the periodontal tissues from the stem cells.

研究代表者

大井田 新一郎(OIDA, Shinichiro)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：10114745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：臨床応用を目的とした歯周組織再生のため、歯根膜由来の幹細胞の特性と歯周組織への分化誘導機構の解明を試みた。歯周組織の再生に有効なことが報告されているブタのエナメルタンパク質中にはBMPやTGF- $\beta$ の活性が高く、その存在は抗体を用いたELISA法でも確認された。歯根膜組織ではTGF- $\beta$ 活性は認められたがBMP活性は認められなかった。歯根膜由来の培養幹細胞を用いた研究で、BMPやTGF- $\beta$ は歯周組織の分化マーカー遺伝子の発現を促進し、石灰化も促進した。これらの結果から、TGF- $\beta$ とBMPは臨床的の歯周組織再生のための有効な因子であると思われる。

研究成果の概要(英文)：We studied the stem cells in the periodontal ligament to investigate the mechanism of periodontal cell differentiation for clinical usage. It has been reported that the porcine enamel proteins activated the periodontal tissue regeneration. We found BMP and TGF- $\beta$  like activity in the enamel proteins and identified TGF- $\beta$  using ELISA method. We also found TGF- $\beta$  in the periodontal ligament tissue but did not find BMP. BMP and TGF- $\beta$  stimulated the gene expression of the differentiation maker of the periodontal tissues and mineralization in culture system of periodontal ligament cells. These results suggest that BMP and TGF- $\beta$  are important factors for periodontal tissue differentiation and clinical usage.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯周組織再生 幹細胞 歯根膜 硬組織 BMP TGF-

### 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、間葉系幹細胞から骨、軟骨、筋、脂肪細胞など、数多くの細胞への分化誘導機構が研究され、特定の分化誘導物質や分化に必須な転写調節因子が明らかにされていたが、歯根膜中の間葉系幹細胞と歯周組織細胞(歯根膜細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞)への分化誘導機構はほとんどわかっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、歯根膜中の間葉系幹細胞を分離・培養し、その性質を詳細に調べるとともに、歯周組織への分化誘導の分子機構を明らかにし、歯周組織再生治療の基礎を確立することを目的として行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) エナメルタンパク質中の分化誘導因子

ブタ幼若エナメル質中のエナメルタンパク質は、エムドゲインとして歯周組織の再生治療に使用され有効な結果が得られている。抽出したエナメルタンパク質を分離精製し、培養歯根膜細胞および培養骨芽細胞への影響を与える因子を検索し、特異抗体を用いたELISA法で活性物質を同定した。

#### (2) 歯根膜中の分化誘導因子

歯周組織は歯根膜中の幹細胞から歯根膜細胞、セメント芽細胞および骨芽細胞に分化することによって維持されており、細胞を取り巻く基質中には、分化に関与する分化誘導因子が含まれていることが予想される。そこでエナメルタンパク質と同様にその因子について検索した。

#### (3) ヒト歯根膜由来細胞の不死化

ヒト歯根膜由来の培養細胞はブタエナメルタンパク質(エムドゲイン)に反応することを報告したが、初代培養では細胞の性質が安定せず、継代すると徐々に反応性が失われる。安定な実験結果を得るために、細胞を不死化し安定した反応を示すクローンを選択した。

#### (4) ラット歯根膜細胞の培養

抜歯したラットの臼歯には、中央部で断裂した歯根膜が付着している。歯根膜中央部は血管が多く、この部位から幹細胞が供給され徐々に分化してセメント質表面に至ると考えられている。そこで、抜歯した歯根膜表面から経時的に細胞を分離し、培養してその性質を比較した。

#### (5) マウス歯胚器官培養系

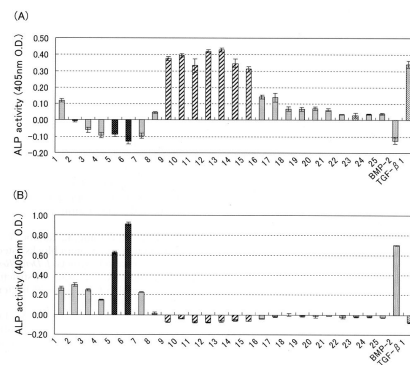
マウス歯胚の移植実験では、歯に付着した歯根膜組織から、根分岐部に骨組織を含む歯周組織が新たに再生する。移植実験では条件

を変えた様々な実験が困難であるため、器官培養での実験系の確立を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) エナメルタンパク質中の活性物質

幼若エナメル質中のエナメルタンパク質を分離精製し、その中に含まれる生理活性物質について検討した。カラムクロマトグラフィーで分離されたサンプルを試験管ごとに活性を検討し2種類の活性物質を確認した。マウス筋芽細胞(C2C12)を用い BMP 活性を検出し(図B)、ヒト歯根細胞(HPDL)を用い TGF-活性を検出した(図A)。さらに TGF- については特異抗体を用いた ELISA 法で TGF-1,2 および3のサブタイプ存在を確認した。BMP に関しても ELISA 法を試みたが、今のところ明確な結果は得られていない。



#### (2) 歯根膜中の活性物質

エナメルタンパク質と同様に歯根膜中の生理活性物質について検討した。培養細胞を用いた検索で、TGF- の活性は認められたが、エナメルタンパク質中の活性よりはるかに弱かった。ELISA法では TGF- 1 存在が確認された。BMP 活性は検出できなかった。

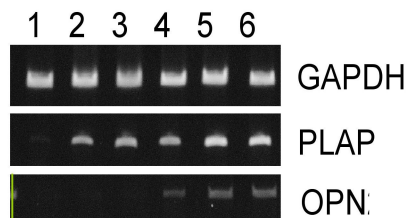
#### (3) ヒト歯根膜由来細胞の不死化

歯根膜由来の幹細胞の分化機構を研究するため、幹細胞にウイルス遺伝子を挿入し細胞を不死化して、TGF- および BMP に反応する安定したクローンを選択することができた。

#### (4) ラット歯根膜細胞の分化

抜歯したラットの臼歯歯根表面から酵素消化で順次細胞を分離し6グループに分け培養し遺伝子発現を調べた(図中の番号1~6)。その結果、歯根膜中央部から歯の表面に向かって、歯根膜の分化マーカーの一つである PLP(Periodontal Ligament-associated Protein 1)や硬組織の分化マーカーの OPN(Osteopontin) 遺伝子が徐々に増加することが明らかとなった。このことは未分化な幹細胞が歯根膜細胞やセメント芽細胞に徐々に分化していることを示唆している

思われる。



#### (5) マウス歯胚器官培養系の確立

歯周組織は骨、歯根膜およびセメント質からなる複雑な組織で、通常の細胞培養系での研究には限界がある。また動物を使用する移植実験では、さまざまな活性物質の投与や結果の解析も難しい。そこで、それらの問題を解決するために、歯胚の器官培養系の確立を試みた。歯冠部の形成がはじまった胎生 16.5 日のマウス歯胚を培養し、長期培養（10 週以上）の結果、歯根形成に成功した（図、ソフト X 線写真：中央に歯根の形成された 2 個の歯胚が認められる）。組織標本では歯周組織の形成も認められる。



今後、歯根形成時における、これらの活性物質の効果を検討する予定である。

#### 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 7 件）

Shirai M, Yamamoto R, Chiba T, Komatsu K, Shimoda S, Yamakoshi Y, Oida S, Ohkubo C, Bone augmentation around a dental implant using demineralized bone sheet containing biologically active substances. Dental Materials Journal, 査読有、35 (3), 2016, 470-478.  
DOI: <http://doi.org/10/4012/dmj.2016-026>

Zhang J, Shirai M, Yamamoto R, Yamakoshi Y, Oida S, Ohkubo C, Zeng J. Effect of nerve growth factor on osseointegration of titanium implants in type 2 diabetic rats. The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants. 査読有、31(5), 2016, 1189-1194.  
DOI: 10.11607/jomi.4455

Ujiie Y, Karakida T, Yamakoshi Y,

Ohshima T, Gomi K, Oida S, Interleukin-4 released from human gingival fibroblasts reduces osteoclastogenesis. Arch Oral Biol 査読有、72, 2016, 187-193.

DOI :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.024>

大井田新一郎．骨形成タンパク質（BMP）の発見と硬組織の再生．鶴見歯学 査読有、42(2), 2016, 11-19.

Yamamoto R, Oida S, Yamakoshi Y, Dentin sialoprophosphoprotein-derives proteins in the dental pulp. Journal of dental research 査読有、94(8), 2015, 1120-1127.

DOI :

<http://dx.doi.org/10.1177/002234515585715>

Saito M, Karakida T, Yamamoto R, Nagano T, Hayakawa T, Oida S, Gomi K, Differentiation potential of osteoblast from cultured C2C12 cells on zirconia disk. Dental materials journal. 査読有、33(2), 2014, 275-283.

DOI: <http://doi.org/10.4012/dmj.2013-321>

Yamakoshi Y, Kinoshita S, Izuhara L, Karakida T, Fukae M, Oida S, Dpp and dsp are necessary for maintaining tgf-beta 1 activity in dentin. Journal of dental research. 査読有、93(7), 2014, 671-677.

DOI :

<http://dx.doi.org/10.1177/0022034514534690>

〔学会発表〕（計 13 件）

大久保水羽、小林冴子、山本竜司、齊藤まり、長野孝俊、五味一博、大井田新一郎、山越康雄．ブタ幼若および成熟エナメル質中の TGF- $\beta$  アイソフォームについて．第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016-08-24-26 札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

小林冴子、山本竜司、大井田新一郎、朝田芳信、山越康雄．ブタ幼若エナメル質中の TGF- $\beta$  とエナメルタンパク質との相互作用について．第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016-08-24-26 札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

白井麻衣、山本竜司、小松浩一郎、下田信治、大井田新一郎、山越康雄．生理活性物質を有する脱灰骨シートを用いたインプラント周囲の骨増生．第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016-08-24-26 札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

野田千尋、藤波さをり、山本竜司、小林冴子、大井田新一郎、山越康雄。ブタ幼若エナメル質中のアメロゲンin・TGF- 1 複合体とTGF- 1 受容体との結合能について。第58回 歯科基礎医学会学術大会、2016-08-24-26 札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

唐木田丈夫、大井田新一郎、山本竜司、斉藤まり、山越康雄。ブタ歯髓細胞の不死化と象牙芽細胞分化に及ぼす BMP2 と TGF の影響。第58回 歯科基礎医学会学術大会、2016-08-24-26 札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

斉藤まり、唐木田丈夫、山本竜司、長野孝俊、山越康雄、五味一博、大井田新一郎。ジルコニアおよびチタンディスク上における骨芽細胞分化の比較。第57回 歯科基礎医学会学術大会、2015-09-11-13 朱鷺メッセ（新潟県新潟市）

丹羽堯彦、山本竜司、山川駿二郎、長野孝俊、大井田新一郎、五味一博、山越康雄。ブタ歯髓および象牙質中の TGF- 1 の存在様式について。第57回 歯科基礎医学会学術大会、2015-09-11-13 朱鷺メッセ（新潟県新潟市）

島崎絵美、唐木田丈夫、大井田新一郎、朝田芳信、山越康雄。ブタ乳歯歯根周囲組織に存在する TGF- 1 の作用。第57回 歯科基礎医学会学術大会、2015-09-11-13 朱鷺メッセ（新潟県新潟市）

唐木田丈夫、山本竜司、大井田新一郎、山越康雄。ブタ歯髓から分離した細胞の不死化とクローニング。第56回 歯科基礎医学会学術大会、2014-9-25-27 福岡国際会議場（福岡県福岡市）

山本竜司、唐木田丈夫、大井田新一郎、山越康雄。ブタ象牙質シアロリントタンパク質(DSP)遺伝子のスプライスアウトについて。第56回 歯科基礎医学会学術大会、2014-9-25-27 福岡国際会議場（福岡県福岡市）

丹羽堯彦、木下冴子、村尾一誠、大井田新一郎、五味一博、山越康雄。エムドゲイン中の生理活性物質について。第56回 歯科基礎医学会学術大会、2014年福岡国際会議場（福岡県福岡市）

木下冴子、唐木田丈夫、大井田新一郎、朝田芳信、山越康雄。ブタ幼若エナメル質中の TGF- 1 について。第56回 歯科基礎医学会学術大会、2014-9-25-27 福岡国際会議場（福岡県福岡市）

山越康雄、木下冴子、唐木田丈夫、大井田

新一郎。象牙質シアロタンパク質(DSP)および象牙質リントタンパク質(DPP)と象牙質中の TGF- 1 の相互作用について。第56回 歯科基礎医学会学術大会、2014-9-25-27 福岡国際会議場（福岡県福岡市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大井田 新一郎 (OIDA, Shinichiro)  
鶴見大学・歯学部・非常勤講師  
研究者番号：10114745

### (2) 研究分担者

山越 康雄 (YMAKOSHI, Yasuo)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号：20182470

唐木田 丈夫 (KARAKIDA, Takeo)  
鶴見大学・歯学部・学内講師  
研究者番号：40367305

山本 竜司 (YAMAMOTO, Ryuji)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号：20410053