

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463092

研究課題名(和文)象牙芽細胞の分化におけるエピジェネティック制御機構の解析

研究課題名(英文)Epigenetic regulation of odontoblast differentiation

研究代表者

竹内 優斗 (Yuto, Takeuchi)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60721454

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)：象牙質は骨と同様の細胞外基質を分泌するものの、骨のようにリモデリングが生じな点で大きく異なる。象牙質に症状が現れる先天性疾患の理解や、歯の再生医療を現実化させるためにも、象牙芽細胞分化に関わる分子機構の解明は重要である。しかし、象牙芽細胞の分化に関わる分子機構はまだまだ明らかにされていない。本研究は、エピゲノムが象牙質の形成と維持に果たす役割を明らかにすることを検討した。その結果、エピジェノミクな修飾に関与する塩化リチウムが象牙芽細胞の分化に影響を及ぼすことを明らかにした。この所見は、治療・再生医療への基盤となることから、学術的なだけでなく臨床的にも非常に意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Dentin is similar to bone in terms of its matrix protein composition and abundance of molecular cascades participating in odontoblast differentiation that are shared with osteoblast differentiation. On the other hand, dentin does not undergo remodeling, and odontoblasts secrete dentin throughout their lifespan. In this study, we topically applied LiCl, an activator of canonical Wnt signaling, as a novel capping material in order to activate reparative dentin formation. MicroCT and microscopic analyses demonstrated that the topical application of LiCl induced dentin repair, including the formation of a complete dentin bridge. In contrast, a dentin bridge was not induced in the control group treated with pulp capping with material carriers alone. These results provide a scientific basis for the biomimetic regeneration of dentin using LiCl to activate dentine regeneration presumably through epigenetic modulation.

研究分野：矯正歯科学

キーワード：象牙芽細胞 エピジェネティクス 象牙質

1. 研究開始当初の背景

象牙質に症状が現れる先天性疾患の理解や、歯の再生医療を現実化させるためにも、象牙芽細胞分化に関わる分子機構の解明は重要である。象牙芽細胞は石灰化基質を形成する点で骨芽細胞と共通点が多く、遺伝子発現のプロファイルも非常に似ている部分が多い。一方で、象牙芽細胞が骨芽細胞と最も大きく異なる点は、象牙芽細胞の分化が歯原性上皮組織と神経堤由来歯原性間葉組織の間で生じる上皮間葉相互作用によってその分化が空間的に極めて精密に制御・維持されている点である。しかし、このような象牙芽細胞と骨芽細胞の差異を際立てる、象牙芽細胞の分化に関わる分子機構はいまだ明らかにされていない。

ゲノムプロジェクトによって、ヒト DNA の塩基配列が解明され、ヒトの遺伝子数は予想外に少ないことが明らかとなった。つまり、生物の多様性を説明するには、ゲノム DNA 配列をさらに修飾する働きが重要であることを示唆している。象牙芽細胞の分化の場合、細胞周囲の微小環境が、分化を開始する部位や時間をきわめて精巧に制御することから、ゲノム DNA 配列だけでは説明がつかない要素によって、遺伝子発現がきわめて精巧に制御されていることが示唆される。我々はこれまでにゲノム情報で規定されない遺伝子制御が象牙芽細胞の分化に及ぼす影響を検討し、ヘパラン硫酸の糖鎖修飾の動態がゲノム情報では推定できない機能を果たすことを見出した。

一方、このような遺伝子発現を制御する別の機構としてエピゲノムが昨今注目されている。エピゲノムはゲノム DNA 配列を伴わない DNA のメチル化とヒストン修飾によるクロマチンへの後天的な修飾によって維持・伝達される遺伝情報である。一般的に、細胞は、エピゲノムにより、同一の DNA 塩基配列を有しながらも、様々な異なる種類の

細胞へと分化し、環境あるいは細胞間のシグナルに対して異なる反応を示すことが出来る。

象牙芽細胞は、分化ステージに応じて、特異的な遺伝子発現を示すことが、これまでの研究や我々の研究成果から明らかにされている。特に、分化初期の前象牙芽細胞では **Bmp4** が特異的に発現し、やがて分化が進むと、**Bmp2** や **Bone sialoprotein (BSP)** の発現が亢進する。そして成熟した象牙芽細胞では **Dspp** の発現が顕著となる。このことから、象牙芽細胞分化において生じるエピジェネティックな変化に着目するに至った。

2. 研究の目的

象牙質に症状が現れる先天性疾患の理解や、再生医療における歯の再生を現実化させるためにも、特に象牙芽細胞分化に関わる分子機構の解明は重要である。しかし、その分子機構の多くは依然明らかにされていない。象牙芽細胞の分化には、歯原性上皮組織と神経堤由来歯原性間葉組織の間で生じる上皮間葉相互作用を介した細胞周囲の微小環境が非常に重要であり、細胞固有の安定した形質維持は、ゲノムの塩基配列に規定されずエピジェネティックな遺伝子制御が重要な役割を果たしていると考えられる。本研究は、歯髄幹細胞の維持と象牙芽細胞分化におけるエピジェネティック修飾の動態を解析し、エピゲノムが象牙質の形成と維持に果たす役割を明らかにすることを目的とする。

近年、リチウムは **histone deacetylase** を阻害することが知られるようになってきており、**in vitro** で象牙芽細胞分化を促進することが明らかにされている。そのため本研究では、塩化リチウムが **in vivo** でも同様に象牙芽細胞分化を促進するかどうか検討した。さらに塩化リチウム同様、**histone deacetylase** を阻害するバルプロ酸 (**Valproic acid; VPA**) の作用についても検討をおこなった。

3. 研究の方法

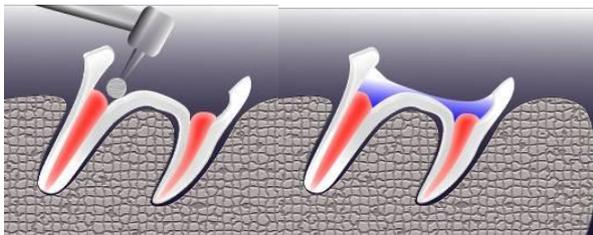
歯髄幹細胞の維持と象牙芽細胞分化におけるエピジェネティック修飾の動態を解析し、エピゲノムが象牙質の形成と維持に果たす役割を明らかにするために、以下について検討を行った。

① エピゲノム修飾のターゲット分子を特定する。

- 象牙芽細胞株 mDP を用いて、塩化リチウムによって発現が変動する mRNA を qPCR で検討をおこなった。

② エピゲノムを修飾する薬剤が、象牙芽細胞分化に及ぼす影響を検討する。

- ICR マウスの歯髄に窩洞を形成し、歯根の歯髄は残存させたまま、歯科部歯髄を切除した。この切除面に塩化リチウムを含む覆髄剤を塗布し、象牙芽細胞の再生を観察した。観察は、マイクロ CT 撮影を行い。さらに組織学的観察および *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

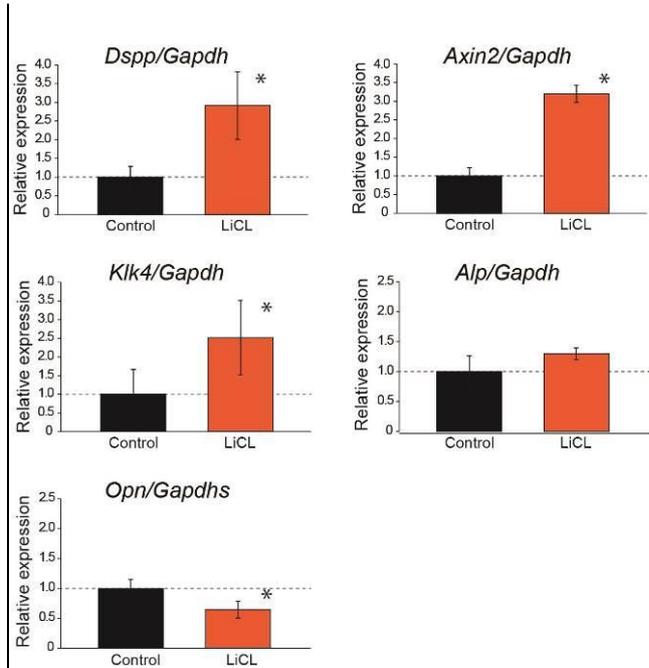
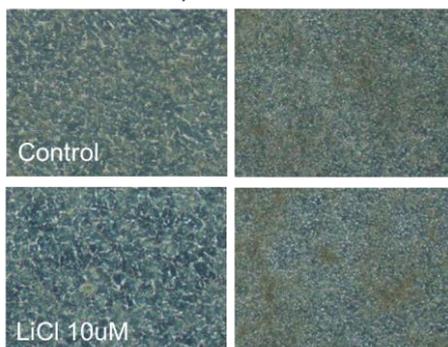


- ICR マウスに VPA を作用させ、マイクロ CT にて象牙質のけ厚みを検討した。

4. 研究成果

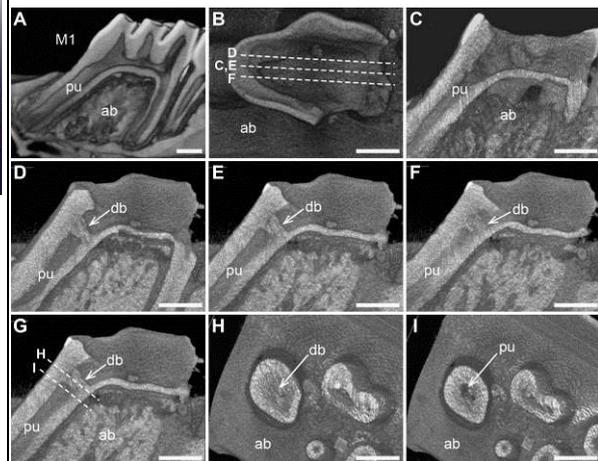
象牙芽細胞株における遺伝子発現について

mDP cell Day10

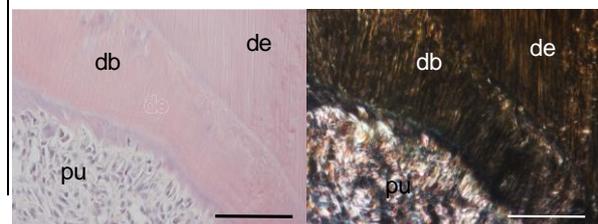


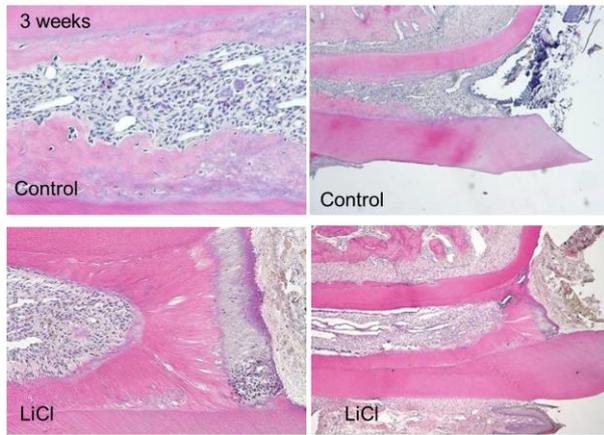
上記のように mDP 細胞に塩化リチウムを作用させると *Dspp*、*Axin2* の遺伝子発現が有意に上昇した。また、*Klk4* の発現も上昇し、現在の機能についても検討している。

この成果をもとに、塩化リチウムを歯髄に作用させた。マイクロ CT (下図) で観察したところ、塩化リチウムによって象牙質が再生されていた。



また、HE 染色および位相差顕微鏡観察で観察したところ、修復象牙質には象牙芽細管が形成されていた (下図)。





一方、VPA を生後 3 週から 2 週間 VPA を投与したマウスの臼歯の象牙質の厚さを検討したが、コントロールと統計学的な有意差はみとめられなかつた。

本研究は、エピジェノミクな修飾が象牙芽細胞の分化に影響を及ぼすことを明らかにした。この所見は、治療・再生医療への基盤となることから、学術的なだけでなく臨床的にも非常に意義が大きい。

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 2 件)

Nomir AG, Takeuchi Y, Fujikawa J, El Sharaby AA, Wakisaka S, Abe M. Fate mapping of *Trps1* daughter cells during cardiac development using novel *Trps1-Cre* mice. *Genesis*. 2016 Jul;54(7):379-88. doi: 10.1002/dvg.22951. Epub 2016 Jun 20. PubMed PMID: 27257806.

Ishimoto K, Hayano S, Yanagita T, Kurosaka H, Kawanabe N, Itoh S, Ono M, Kuboki T, Kamioka H, Yamashiro T. Topical application of lithium chloride on the pulp induces dentin regeneration.

PLoS One. 2015 Mar 26;10(3):e0121938. doi:10.1371/journal.pone.0121938. eCollection 2015. PubMed PMID: 25812134; PubMed Central PMCID: PMC4374937.

[学会発表] (計 件)

Nomir A, Takeuchi Y, Fujikawa J, Abe M, Wakisaka S: A novel transgenic mice explains pleiotropic congenital cardiac defects of TRPS patients. 第 58 回 歯科基礎医学会学術集会、2016 年 8 月 24-26 日

[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

竹内 優斗 (TAKEUCHI, Yuto)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号 : 60721454

(2)研究分担者

三原聖美 (MIHARA, Kiyomi)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号 : 00551920

山城 隆 (YAMASHIRO, Takashi)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号 : 70294428