

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670826

研究課題名(和文)セマフォリン3Aと歯髄幹細胞を用いた新規象牙質/歯髄複合体再生直接覆髄法の開発

研究課題名(英文)The study on the effects of Semaphorin3A on dentin regeneration using dental pulp stem cells

研究代表者

和田 尚久(Wada, Naohisa)

九州大学・大学病院・教授

研究者番号：60380466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄が露出した場合、直接覆髄法が確立されているが、従来の覆髄用材料では限界があり新たな覆髄法の確立が待望されている。本研究では、ラット歯髄組織およびヒト歯髄細胞はSema3Aおよびその受容体を発現しており、Sema3A刺激によりヒト歯髄細胞の走化性、遊走能、増殖能および象牙芽細胞分化を促進することが明らかになった。一方、ラット露髄モデルにおいて、Sema3Aを用いて直接覆髄した臼歯では、象牙細管様構造を伴った修復象牙質の形成が認められた。以上の結果からSema3Aは象牙質再生において機能的に作用する因子であることが示唆され、将来の新規直接覆髄材としての可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In cases of pulp exposure, existing pulp-capping materials have a limited ability to reconstruct dentin-pulp complexes. Therefore, the development of more effective therapeutic agents has been anticipated for direct pulp capping. We investigated the effects of semaphorin 3A (Sema3A) on various functions of human DPSCs in vitro and reparative dentin formation in a rat dental pulp exposure model. Sema3A induced cell migration, chemotaxis, proliferation, and odontoblastic differentiation of DPSC clones. In addition, Sema3A treatment of DPSC clones increased β -catenin nuclear accumulation. Furthermore, in the rat dental pulp exposure model, Sema3A promoted reparative dentin formation with dentin tubules and a well-aligned odontoblast-like cell layer almost completely covering pulp tissue. These findings suggest that Sema3A could play an important role in dentin regeneration via canonical Wnt/ β -catenin signaling. Sema3A might be an alternative agent for direct pulp capping.

研究分野：Endodontology and General Dentistry

キーワード：歯髄細胞 象牙質再生 露髄

1. 研究開始当初の背景

う蝕や外傷によって歯髄が露出した場合、歯髄保存を図るため水酸化カルシウム製材などを用いた直接覆髄法が確立されている。しかしながら、欠損範囲の広い象牙質および歯髄組織の再生には露髄面において象牙芽細胞を誘導、活性化させるメカニズムが必要であるため、従来の覆髄用材料では限界があり抜髄に至るケースは少なくなく、近年、象牙質ならびに歯髄組織を積極的に再生する方法の確立が期待されている。我々はこれまでに歯根膜幹細胞などの口腔組織由来幹細胞について解析を行ってきた (Fujii S. et al, J Cell Physiol, 215(3):743-749, 2008; Tomokiyo A. et al, Differentiation, 76(4):337-347, 2008; Mrozik K. et al, Regen Med, 8(6):711-723, 2013)。ヒト歯髄幹細胞に関しても多分化能および免疫抑制能を有していることを明らかにしており (Wada N. et al, J Cell Physiol, 219(3): 667-676, 2009; Wada N et al, Perio 2000, 63(1):198-216, 2013; Yoshida S. et al, the 9th WEC, 2013)。感染性の炎症により破壊された組織再生における移植細胞源として有用である可能性を見出していた。最近、血管および末梢神経の発生を制御することが知られているセマフォリン 3A (Sema3A) が、Wnt/ β -catenin シグナル経路を介して骨芽細胞による骨形成を促進すること (Hayashi M. et al, Nature, 485(7396):69-74, 2012)、免疫細胞遊走および T 細胞活性化を抑制すること (Takegahara N. et al, Nat Cell Biol, 8(6):615-22, 2006; Takamatsu H. et al, Nat Immunol, 11(7):594-600, 2010) が報告された。また、最近、歯根膜幹細胞クローンをを用いたマイクロアレイ遺伝子解析により検出した遺伝子群より、Sema3A が歯根膜細胞の多分化能を誘導することを明らかにしており (Wada N. et al, Stem Cells Dev. 23(18): 2225-2236, 2014)、象牙質再生においても効果が期待できる。そこで、本研究では、Sema3A と歯髄幹細胞およびスキヤフォールドを組み合わせて用いた新規象牙質/歯髄複合体再生直接覆髄法を開発することを本研究の構想とした。

2. 研究の目的

本研究では、硬組織誘導能および免疫抑制能を有する Sema3A を活用した新規象牙質/歯髄複合体再生直接覆髄法の開発を目指して、Sema3A が修復象牙質形成に重要な役割を果たしているのではないかと仮説を立て、Sema3A がヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化に及ぼす影響ならびに Wnt/ β -catenin canonical 経路の関連、またラット露髄モデルを用いた直接覆髄後の修復象牙質形成に及ぼす影響について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養

ヒト歯髄細胞は、抜歯を目的として九州大学病院口腔外科を受診した患者 (22 歳女性) から同意を得た後、第一小臼歯を抜歯し、これまでの報告を参考に単離した (Wada et al, J Periodont Res. 36(1): 56-63, 2001)。培養開始後、細胞がコロニー形成を開始した段階で、コロニーを単離し、同様の条件下で培養した (single colony selection)。単離した 10 種類の細胞クローンのうち、多分化能を有し (骨芽細胞分化能、脂肪細胞分化能、軟骨細胞分化能)、間葉系幹細胞の表面抗原マーカー (CD73, CD90, CD105, CD146, CD166) を発現する 4A-1, 4A-7 をヒト歯髄幹細胞クローンとして本実験に用いた。全ての実験は九州大学病院歯学研究院生命倫理委員会の承認の下で行った。

ヒト歯髄幹細胞クローンの多分化能の解析 - 各種分化実験 (骨芽細胞分化誘導、脂肪細胞分化誘導、軟骨細胞分化誘導) -

骨芽細胞分化誘導は、各細胞クローンを 24 ウェル細胞培養プレートに播種し、石灰化誘導培地にて培養した。4 週間培養後 Alizarin Red S 染色を行った。

脂肪細胞分化誘導は、各細胞クローンを 48 ウェル細胞培養プレートに播種し、脂肪細胞誘導培地にて培養した。4 週間培養後 Oil Red O 染色を行った。

軟骨細胞分化誘導は、各細胞クローンを遠心分離して生じた細胞塊を、TGF- β 3 添加軟骨誘導培地にて培養した。4 週間培養後、細胞を固定し、パラフィン包埋を行った。5 μ m の薄切切片を作製し、Alcian blue 染色を行った。

ヒト歯髄幹細胞クローンにおける細胞表面抗原の発現解析 - フローサイトメトリー分析法 -

細胞表面抗原の発現測定はフローサイトメーターを用いて行った。各細胞クローンを、各種間葉系幹細胞マーカーに特異的な各種抗体とともに、培養し EC800 cell analyzer にて解析を行った。

ラット歯髄組織ならびにヒト歯髄幹細胞クローンにおける Sema3A およびその受容体の発現解析法

ラット歯髄組織における Sema3A およびその受容体である Nrp1 の発現を解析するため、免疫蛍光染色を行い、ヒト歯髄幹細胞クローンにおける Sema3A および Nrp1 の発現について検討するため、免疫細胞化学的染色を行った。

Sema3A がヒト歯髄幹細胞クローンの各種機能に及ぼす影響

以下の方法で検討した。

- ・ Scratch wound healing assay による細胞遊走能の解析
- ・ Transwell assay による細胞走化性の解析

- ・ WST-1 proliferation assay による細胞増殖能の解析

遺伝子およびタンパク発現解析

以下の方法で解析した。

- ・ 半定量的 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)
- ・ 定量的 RT-PCR 法
- ・ ウエスタンブロット法

ラット歯髄モデル

8週齢の雌性Wisterラットに三種混合麻酔薬を用いた腹腔内麻酔をした後、#1/2ラウンドバーを用いて左側上顎第一臼歯咬合面の近心側に半月状の窩洞形成を行い、探針にて歯髄組織を露髄させた。ナノ粒子のbeta-tricalcium phosphateを配合したコーゲンスキヤフォールド (Nano -TCP collagen scaffold; 北海道大学病院 歯周・歯内療法科より供与) を担体として用い、Sema3A (25, 50, 200 ng) を浸透させたスキヤフォールドで露髄面を封鎖し、ガラスアイオノマーセメントで仮封した。4週間飼育後、4% PFA で灌流固定し、試料を摘出した。摘出した試料は、10% ギ酸で2週間脱灰後、パラフィン包埋を行い、5 μm の薄切切片を作製して修復象牙質形成の有無をH-E染色にて確認した。全ての実験は九州大学病院歯学研究院生命倫理委員会の承認の下で行った。

4. 研究成果

ヒト歯髄幹細胞クローンの多分化能

ヒト歯髄組織から single colony selection により単離したヒト歯髄幹細胞クローン 4A-1および4A-7の多分化能を検討するため、骨芽細胞、脂肪細胞ならびに軟骨細胞への分化誘導実験を行った。

ヒト歯髄幹細胞クローンを石灰化誘導培地にて4週間培養した結果、Alizarin Red S 染色陽性の沈着物を形成した。また、脂肪細胞分化誘導培地にて4週間培養した結果、ヒト歯髄幹細胞クローン 4A-1、4A-7ともにOil Red O 染色陽性の脂肪滴を形成した。さらに軟骨細胞分化誘導培地にて4週間培養した結果、ともにAlcian blue 染色陽性の軟骨基質を形成した。

ヒト歯髄幹細胞クローンにおける細胞表面抗原の発現

ヒト歯髄幹細胞クローン 4A-1 および 4A-7 における間葉系幹細胞マーカーの発現を検討するため、フローサイトメトリーを行った。両クローンにおいて、間葉系幹細胞マーカーとして知られている CD73, CD90, CD105, CD146 および CD166 発現細胞が非常に高い割合で検出された。以上より、4A-1 および 4A-7 は歯髄幹細胞様細胞の特徴を有していることが明らかになった

ラット歯髄組織ならびにヒト歯髄幹細胞ク

ローンにおける Sema3A およびその受容体の発現

ラット歯髄組織における Sema3A およびその受容体である Nrp1 の発現を解析するため、免疫蛍光染色を行ったところ、抗 Sema3A 抗体ならびに抗 Nrp1 抗体に対する陽性反応が、ラット歯髄組織中央部に散在的に、また象牙芽細胞層において観察された。

次にヒト歯髄幹細胞クローンにおける Sema3A ならびにその受容体である Nrp1, PlxnA1, PlxnA2 の発現について半定量的 RT-PCR 法を用いて解析したところ、両クローンにおいて、Sema3A ならびに Nrp1, PlxnA1, PlxnA2 の mRNA 発現が認められた。

さらにヒト歯髄幹細胞クローンにおける Sema3A および Nrp1 の発現について検討するため、免疫細胞化学的染色を行った。ヒト歯髄幹細胞クローン 4A-1 および 4A-7 は抗 Sema3A 抗体および抗 Nrp1 抗体に陽性反応を示した。

Sema3A がヒト歯髄幹細胞クローンの細胞遊走能、走化性および細胞増殖能に及ぼす影響

Sema3A がヒト歯髄幹細胞クローンの細胞遊走能に及ぼす影響を検討するため、細胞遊走試験 (Scratch wound healing assay) を行った。10 ng/ml の Sema3A で 24 時間刺激した両クローンは、コントロールと比較して遊走細胞数が有意に増加した。

Sema3A がヒト歯髄幹細胞クローンの走化性に及ぼす影響を検討するため、インサートを用いた走化性試験 (Transwell assay) を行った。10 ng/ml の Sema3A で 48 時間刺激した両クローンは、コントロールと比較してインサートを通過した細胞数が有意に増加した。

Sema3A がヒト歯髄幹細胞クローンの細胞増殖能に及ぼす影響を検討するため、細胞増殖試験 (WST-1 cell proliferation assay) を行った。10 ng/ml の Sema3A で刺激したヒト歯髄幹細胞クローンは、コントロールと比較して増殖細胞率が有意に上昇した。

Sema3A がヒト歯髄幹細胞クローンの象牙芽細胞様細胞分化に及ぼす影響

Sema3A がヒト歯髄幹細胞クローンの象牙芽細胞様細胞分化に及ぼす影響について検討するため、ヒト歯髄幹細胞クローンを石灰化誘導培地にて4週間培養後、Alizarin Red S 染色を行った。通常培地にて培養したヒト歯髄幹細胞クローン 4A-1 および 4A-7 では Alizarin Red S 陽性沈着物の形成が認められなかったのに対し、誘導培地にて培養を行ったヒト歯髄幹細胞クローンにおいては Alizarin Red S 陽性沈着物の形成が認められた。また、10 ng/ml の Sema3A を加えた DM 培地で培養したヒト歯髄幹細胞クローンにおいては、Sema3A を添加していない培地で培養したヒト歯髄幹細胞クローンと比較して、Alizarin Red S 陽性領域が有意に増加してい

た。

次に、Sema3A がヒト歯髄幹細胞クローンにおける象牙質関連遺伝子発現に及ぼす影響について検討するため定量的 RT-PCR を行った結果、10 ng/ml の Sema3A 刺激下のヒト歯髄幹細胞クローン 4A-1 および 4A-7 において、培養開始 1 週間後に DSPP、DMP1、ならびに ALP、培養開始 3 週間後に OCN の遺伝子発現が、Sema3A を添加していないヒト歯髄幹細胞クローンと比較して有意に上昇していた。

Sema3A がヒト歯髄幹細胞クローンにおける β -catenin の核内集積に及ぼす影響

ヒト歯髄幹細胞クローン 4A-7 および 4A-1 における β -catenin の核内集積に及ぼす影響を検討するため、10 ng/ml の Sema3A で細胞を 24 時間培養後、免疫蛍光染色を行った。その結果、無刺激下のヒト歯髄幹細胞クローンでは、 β -catenin は細胞質に均一に局在が認められたのに対し、Sema3A で刺激したヒト歯髄幹細胞クローンにおいて β -catenin が核内に集積した像が観察された。さらに、細胞質のタンパク質を回収し、細胞質における β -catenin のタンパク発現を検討するため、ウエスタンブロット法を用いて解析した。10 ng/ml の Sema3A で刺激したヒト歯髄幹細胞クローンにおいて、細胞質の β -catenin のタンパク発現が減少した。これらの結果より、Sema3A 刺激は ヒト歯髄幹細胞クローンにおいて β -catenin の核内集積を促進することが示唆された。

Sema3A が FARP2 の遺伝子発現ならびに Rac1 の活性化に及ぼす影響

FARP2 は、グアニンヌクレオチド交換因子として Rac1 に特異的に作用しており、また β -catenin の核内集積には GTP 結合活性型の Rac1 が必要であると報告されている。Sema3A が、ヒト歯髄幹細胞クローンにおける FARP2 の遺伝子発現に及ぼす影響を検討するため、10 ng/ml の Sema3A でヒト歯髄幹細胞クローンを 24 時間刺激し、定量的 RT-PCR 法を行った結果、FARP2 の遺伝子発現が有意に上昇していることが明らかになった。

次に Sema3A がヒト歯髄幹細胞クローンにおける Rac1 の活性化に及ぼす影響について検討した。ウエスタンブロット法を用いて GTP 結合型の Rac1 (Rac-GTP; 活性型 Rac) の発現を解析した結果、10 ng/ml の Sema3A で 24 時間刺激したヒト歯髄幹細胞クローンにおいて、Rac-GTP の発現上昇が観察された。

Sema3A がラット臼歯の直接覆髄後の修復象牙質形成に及ぼす影響

Sema3A が直接覆髄後の修復象牙質形成に及ぼす影響を検討するため、ラット露髄モデルを用いて、直接覆髄 4 週間後の露髄面における修復象牙質形成を H-E 染色により解析した。コントロール群では、直接覆髄 4 週間後の露髄面は封鎖されておらず、歯髄組織内に

不均一な骨様象牙質が集積していた。Sema3A 群では、象牙細管様構造、象牙前質ならびに歯髄腔側内面における象牙芽細胞様細胞の配列を伴った修復象牙質による露髄面の封鎖が認められた。

本研究より、Sema3A およびその受容体である Nrp1 はラット歯髄組織ならびにヒト歯髄幹細胞クローンに発現しており、Sema3A はヒト歯髄幹細胞クローンの細胞遊走能、走化性、増殖能ならびに象牙芽細胞様細胞分化を促進し、Wnt/ β -catenin canonical 経路を活性化することが明らかになった。また、ラット露髄モデルにおいては、Sema3A は直接覆髄後の露髄面に対し、効果的な修復象牙質形成を示した。以上のことから、Sema3A は直接覆髄面において歯髄幹細胞をリクルートメントし、さらに象牙芽細胞への分化を誘導することにより、修復象牙質形成を促進している可能性が考えられた。今後さらに Sema3A が歯髄幹細胞や生活歯髄療法に対して及ぼす影響について解析を進めることで、新規の歯髄・象牙質複合体再生療法の開発へと繋げていける可能性が示唆された。

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 4 件)

1. Mitarai H, Wada N, Hasegawa D, Yoshida S, Sonoda M, Tomokiyo A, Hamano S, Serita S, Mizumachi H, Maeda H. Transgelin mediates transforming growth factor- β 1-induced proliferation of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2017 Jun 7. doi: 10.1111/jre.12466. [Epub ahead of print]
2. Serita S, Tomokiyo A, Hasegawa D, Hamano S, Sugii H, Yoshida S, Mizumachi H, Mitarai H, Monnouchi S, Wada N, Maeda H. Transforming growth factor- β 1-induced gene product-h3 inhibits odontoblastic differentiation of dental pulp cells. *Arch Oral Biol.* 78:135-143. 2017. doi:10.1016/j.archoralbio.2017.02.018.
3. Yoshida S, Wada N, Hasegawa D, Miyaji H, Mitarai H, Tomokiyo A, Hamano S, Maeda H. Semaphorin 3A Induces Odontoblastic Phenotype in Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res.* 95(11):1282-1290, 2016. doi: 10.1177/0022034516653085
4. Yoshida S, Yamamoto N, Wada N, Tomokiyo A, Hasegawa D, Hamano S, Mitarai H, Monnouchi S, Yuda A, Maeda H. GDNF from Human Periodontal Ligament Cells Treated with Proinflammatory Cytokines Promotes Neurocytic Differentiation of PC12 Cells. *J Cell Biochem.* 118(4):699-708. 2016. doi: 10.1002/jcb.25662.

〔学会発表〕(計 3件)

1. Mitarai H, Wada N, Hasegawa D, Yoshida S, Sonoda M, Tomokiyo A, Hamano S, Maeda H. Transgelin Mediates TGF-beta1-induced Human Periodontal Ligament Cell Proliferation. 95th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR), San Francisco, Calif., USA, 2017. 3. 22-25.
2. Yoshida S, Wada N, Hasegawa D, Tomokiyo A, Hamano S, Mitarai H, Hideki S, Maeda H. Semaphorin 3A induces odontoblastic phenotype in dental pulp stem cells. 94th General Session & Exhibition of the IADR, CoEx Convention & Exhibition Center, Seoul, Korea, 2016. 6. 22-25.
3. 吉田晋一郎、和田尚久、前田英史、門野内聡、長谷川大学、御手洗裕美、濱野さゆり、祐田明香、杉井英樹、赤峰昭文. Semaphorin3A がヒト歯髄幹細胞による硬組織形成に及ぼす影響. 第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会、滋賀県立芸術劇場(大津市) 2014年6月19、20日

〔図書〕(計 2件)

1. Wada N, Tomokiyo A, Maeda H. Future Perspectives in Dental Stem Cell Engineering and the Ethical Considerations. In: Dental Stem Cells, Şahin F, Dogan A, Demirci S (ed). Springer International Publishing Switzerland, Basel, Switzerland: Chapter 14, pp289-307, 2016.
2. Tomokiyo A, Wada N, Maeda H. Contribution of stem cells to dental tissue regeneration: isolation, function, and application. In: Frontiers in stem cell and regeneration medicine research vol.2, Atta-ur-Rahman and Shazia Anjum (eds). Bentham Science Publishers, Sharjah, United Arab Emirates: pp3-38, 2016.

〔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
和田 尚久(WADA, Naohisa)
九州大学・大学病院・教授
研究者番号：60380466
 - (2)研究分担者
前田 英史(MAEDA, Hidefumi)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号：10284514
 - (3)連携研究者
()
研究者番号：
 - (4)研究協力者
()