

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861766

研究課題名(和文) PDGFによる歯髄幹細胞分化誘導法の検討

研究課題名(英文) Evaluation of induction method for dental pulp stem cells using PDGF

研究代表者

菅原 優 (Sugawara, Yu)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：00636954

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)：PDGF-AAは歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を促進し、PDGF-BBは歯髄幹細胞のオリゴデンドロサイト分化を促進することが示唆された。また、PDGF-BBは歯髄幹細胞の増殖を促進することが明らかになった。さらに、PDGF-BBは受容体の発現は抑制せずにsmad5のリン酸化を抑制することによりBMP2による歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を抑制することが示唆された。

これより、PDGF-BBが、象牙芽細胞ではなくオリゴデンドロサイト分化に関与している可能性が考えられた。また、これは初代培養歯髄幹細胞を用いた実験と同様の結果であり、細胞株を用いた手法が歯髄幹細胞研究に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：PDGF-AA promotes dental pulp stem cell differentiation to odontoblast, whereas PDGF-BB promotes dental pulp cell differentiation to oligodendrocyte and proliferation which might be regulated by ERK1/2 and Akt pathway via PDGFRb. And furthermore, PDGF-BB inhibits dental pulp cells differentiation to odontoblast which BMP2 promotes by inhibiting smad5 phosphorylation without inhibition of the expression of BMP2 receptors.

From these results, because of the difference between differentiation markers mRNA expressions induced by PDGF-AA and PDGF-BB, it was showed PDGF-BB dose not take part on dental pulp cell differentiation to odontoblast but take part in dental pulp cell differentiation oligodendrocyte differentiation. Because these results are same when we used primary cultures mouse dental pulp stem cells, it was showed it is useful using cell line.

研究分野：矯正・小児系歯学

キーワード：歯髄幹細胞 オリゴデンドロサイト PDGF 再生 歯

## 1. 研究開始当初の背景

近年、歯髄中に存在する間葉系幹細胞の1つである歯髄幹細胞が、脊髄損傷などの治療に応用可能な再生医療の細胞ソースとして注目されている。本研究室では、この歯髄幹細胞の細胞調整法の開発や、小分子化合物による人工誘導法の開発を進めてきた。歯髄幹細胞が、他の間葉系幹細胞と比較して期待されている理由として、自然脱落する乳歯から容易に歯髄幹細胞を回収できる点である。歯髄幹細胞は神経堤由来細胞 (NC 細胞) であり、間葉細胞でありながら神経のマーカ分子を発現するという特徴的な細胞集団であることが知られている。

歯髄幹細胞の特徴の1つである NC 細胞由来であるという点から、本細胞は NC 細胞のマーカ分子を発現している。NC 細胞のマーカ分子として、従来より血小板由来成長因子 (PDGF) の受容体の一つである PDGF 受容体が知られており、これら細胞の同定には抗 PDGF 受容体抗体を用いた染色法が利用されている。しかしながら、本分子の NC 細胞および歯髄幹細胞での役割や機能については未だ不明である。そこで、我々は歯髄幹細胞が他の組織幹細胞よりも神経系の細胞に分化誘導しやすいことに着目し、研究を進めることとした。

## 2. 研究の目的

歯髄幹細胞を用いた効率の良い神経細胞への分化誘導法の開発とその応用を本研究の目的とした。これまでに我々は歯の歯髄由来の歯髄幹細胞を血小板由来成長因子 (PDGF-BB) で刺激することにより、中枢神経損傷の治療に有効なオリゴデンドロサイトへ分化誘導させ得る可能性を示唆する知見を得た。そこで、本研究期間においては、その詳細な分子メカニズム (PDGF-BB 受容体とその下流シグナル伝達経路の同定) を解明し、効率よく神経細胞へと分化誘導させる方法の開発を行う。また、脊髄損傷モデルマウスを用い、誘導させた神経細胞を移植する実験を行うことにより、その有用性及び歯髄幹細胞による神経再生能力を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯髄幹細胞の培養

マウス歯髄細胞株 (mDP) に 2 種類のヘキスト色素を取り込ませ、フローサイトメトリーを用いた細胞ソーティング法にて得られた多分化能を有する歯髄幹細胞 (SP 細胞) を用いた。これを D-MEM/10%FBS で培養し、外因性の因子として、PDGF-AA (UPSTATE)、PDGF-BB (systems) を添加する場合にはそれぞれ、5ng/ml、10ng/ml で BMP2 を添加する場合には 200ng/ml の最終濃度で用いた。

またマウス切歯および臼歯の歯髄細胞を初代培養し、上記と同様の手法を用いて、歯髄幹細胞の調整を行った。また、小分子化合物 BIO を、初代培養歯髄細胞に添加し、Oct4

陽性の人工誘導歯髄幹細胞を作成し、他の細胞と同様に実験に供した。

(2) PDGF による歯髄幹細胞の分化誘導の評価  
RT-PCR 法を用いて今回用いた各種細胞における象牙芽細胞分化マーカである DSPP とオリゴデンドロサイトの分化マーカである Plp1 と Olig2 の mRNA の発現を確認した。Total RNA は TRIzol 試薬 (invitrogen) を用いて抽出した。

(3) PDGF による歯髄幹細胞の増殖能の評価  
細胞数の測定

6well のプレートに  $1 \times 10^4$  個/well ずつそれぞれ 3well に細胞を播種し、PDGF-AA または PDGF-BB を添加後、0、1、2、3 日後の細胞数を測定した。細胞数は、1well からランダムに 20 視野ずつ抽出し、細胞数を計測し、その合計を 1well の細胞数とし、3well より平均値を出し比較を行った。

WST-8 の代謝を模した細胞増殖能の評価  
細胞増殖試験として Cell counting kit8 を用いた細胞増殖試験を行った。

BrdU の取り込み試験

細胞をスライドグラス上に播種し、PDGF-AA もしくは PDGF-BB を添加し 24 時間培養し、その後 5-bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection kit (Roche) を用いて細胞増殖活性の測定を行った。

(4) 細胞内シグナル伝達経路の解析

ウェスタンブロッティング法

PDGF による SP 細胞の細胞内シグナル伝達経路の解析のためにウェスタンブロッティング法を用いた。PDGF の受容体として PDGF 受容体と PDGF 受容体が知られており、その下流では Ras-MAPK、PI3K、PLC- が関与していることが分かっている。そのため、今回は ERK1/2、p38、SAPK/JNK、Akt のリン酸化を確認した。また、PDGF-BB が BMP2 による象牙芽細胞分化誘導に与える影響を調べるために、smad5 のリン酸化を確認した。

細胞内シグナル伝達経路特異的阻害剤の使用

PDGF による分化誘導、増殖促進がどの経路を介しているかを調べるために、各種細胞を PDGF 受容体チロシンキナーゼ特異的阻害剤 (AG17) あるいは ERK1/2 経路阻害剤 (MEK 阻害剤、U0126)、p38 経路阻害剤 (SB203580)、Akt inhibitor で処理し RT-PCR 法、細胞増殖試験を行った。

PDGF-BB による歯髄幹細胞の BMP 受容体 mRNA の発現の評価

PDGF-BB が BMP2 による象牙芽細胞分化誘導に与える影響を調べるために、RT-PCR 法を用いて各種細胞における BMP 受容体である BMPR 及び ALK3 の mRNA の発現を確認した。

## 4. 研究成果

(1) PDGF-BB による SP 細胞のオリゴデンドロサイト分化促進

SP 細胞に PDGF-AA もしくは PDGF-BB を添加し 48 時間後の olig2 と Plp-1 の mRNA の発

現を RT-PCR を用いて解析を行ったところ、PDGF-AA を添加した SP 細胞では、発現の上昇を認めなかったが、PDGF-BB を添加した SP 細胞では発現の上昇を認めた。同様の結果は、初代培養マウス歯髄幹細胞においても確認された。一方で、人工誘導歯髄幹細胞においては、他の細胞に比較して *olig2* と *Plp-1* の発現上昇は減弱していた。

#### (2) PDGF-AA による SP 細胞の象牙芽細胞分化促進

SP 細胞に PDGF-AA、PDGF-BB もしくは 200ng/ml BMP2 を添加し 48 時間後の *DSPP* の mRNA の発現を RT-PCR を用いて解析を行ったところ、PDGF-BB を添加した SP 細胞では変化を認めなかったが、PDGF-AA を添加した SP 細胞では BMP2 を添加した SP 細胞と同様に発現の上昇を認めた。同様に初代培養マウス歯髄幹細胞および人工誘導歯髄幹細胞においても、*DSPP* の発現の上昇が観察できた。特に BMP2 未添加の状態においても、人工誘導歯髄幹細胞においては *DSPP* の発現の上昇が認められた。また、p38 経路阻害剤 (SB203580) を添加した場合には、PDGF-AA による *DSPP* の mRNA の発現促進を抑制した。

#### (3) PDGF-BB による SP 細胞の増殖促進

細胞数の測定においては、PDGF-BB を添加した SP 細胞でコントロール、PDGF-AA を添加した SP 細胞と比較して有意に細胞数の増加が確認された。また、BrdU 取り込み試験では、PDGF-BB を添加した SP 細胞で、コントロール、PDGF-AA を添加した SP 細胞と比較して、約 1.5 倍の BrdU 陽性細胞が認められた。cell counting kit8 を用いた細胞増殖試験では、PDGF-BB を添加した SP 細胞で、コントロール、PDGF-AA を添加した SP 細胞と比較して、有意に細胞の増殖促進が認められた。同様に初代培養マウス歯髄幹細胞および人工誘導歯髄幹細胞においても、PDGF-BB を添加した場合には、細胞増殖の亢進が認められた。

#### (4) PDGF による SP 細胞の細胞内シグナル伝達経路の解析

ウェスタンブロッティング法による解析より PDGF-AA を添加した SP 細胞では、p38 のリン酸化が強く誘導された。また PDGF-BB を添加した SP 細胞では、ERK1/2、p38、Akt のリン酸化が強く誘導された。初代培養マウス歯髄幹細胞および人工誘導歯髄幹細胞においても、PDGF-AA を添加した場合に、p38 のリン酸化が誘導され、PDGF-BB を添加した場合には、ERK1/2、p38、Akt のリン酸化が誘導された。

#### (5) PDGF-BB による SP 細胞の増殖促進の細胞内シグナル伝達経路

SP 細胞を AG17、U0126、SB203580 もしくは Akt inhibitor で処理し PDGF-AA もしくは PDGF-BB 添加後 48 時間後に cell counting kit8 を用いた細胞増殖試験を行った。AG17、U0126 (5ng/ml、10ng/ml) Akt inhibitor は SP 細胞の増殖と PDGF-BB によって誘導される

SP 細胞の増殖促進を抑制した。一方、SB203580 による SP 細胞の増殖抑制は認められなかった。さらに、siRNA を用いて PDGF 受容体の発現を抑制した SP 細胞では、SP 細胞の増殖と PDGF-BB によって誘導される SP 細胞の増殖促進を抑制した。一方で、PDGF 受容体の発現を抑制した SP 細胞では SP 細胞の増殖抑制は認められなかった。初代培養マウス歯髄幹細胞および人工誘導歯髄幹細胞を用いての細胞内シグナル伝達の阻害剤および siRNA を用いて PDGF 受容体の発現を抑制実験については、現在研究を進めているところである。

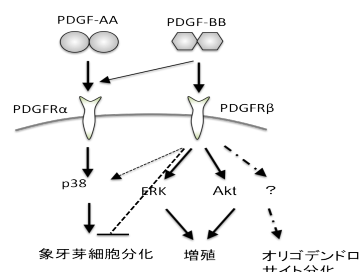
#### (6) SP 細胞の象牙芽細胞分化誘導における PDGF-BB と BMP2 の相互作用

SP 細胞に PDGF-BB と BMP2 の両方を添加した場合の *DSPP* の mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。PDGF-BB と BMP2 の両方を添加した SP 細胞では、BMP2 単独で添加した SP 細胞と比較して *DSPP* の mRNA の発現が減少した。

また、PDGF-BB が SP 細胞における BMP2 のシグナル伝達に及ぼす影響について調べるために、smad5 のリン酸化をウェスタンブロッティング法にて確認した。PDGF-BB と BMP2 を同時に添加した SP 細胞では、BMP2 単独で添加した SP 細胞と比較して、smad5 のリン酸化が弱かった。さらに、PDGF-BB が BMP2 による SP 細胞の象牙芽細胞分化促進を抑制する経路を特定するため、RT-PCR 法を用いて SP 細胞における BMP 受容体である *BMPR* 及び *ALK3* の mRNA の発現を確認した。*BMPR* 及び *ALK3* の mRNA の発現は PDGF-BB 単独の添加では抑制されるが、PDGF-BB と BMP2 を同時に添加した場合には抑制されなかった。

PDGF-AA は p38 を介して歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を促進し、PDGF-BB は歯髄幹細胞のオリゴデンドロサイト分化を促進することが示唆された。また、PDGF-BB は PDGF 受容体に依存し、その下流で ERK1/2、Akt を介して歯髄幹細胞の増殖を促進することが明らかになった。さらに、PDGF-BB は受容体の発現は抑制せずに smad5 のリン酸化を抑制することにより BMP2 による歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を抑制することが示唆された。

これらの結果より、PDGF-AA、PDGF-BB を添加した場合の分化マーカーの発現の違いと合わせて、PDGF-BB が、象牙芽細胞ではなくオリゴデンドロサイト分化に関与している可能性が考えられた。これらは歯髄幹細胞の細胞運命決定や歯髄幹細胞を用いた神経再生における重要な情報となる。



一方で、初代培養歯髄幹細胞を用いた研究では、SP細胞を用いた実験と同様の結果を得ることができ、細胞株を用いた手法が、歯髄幹細胞研究に有効であることが示唆された。しかしながら、小分子化合物B10で人工誘導した幹細胞においては、象牙芽細胞分化については、他の細胞と同等の分化が確認されたが、神経系細胞への分化が弱い傾向を示した。したがって、これら細胞間における神経誘導効率の差を明らかにし、その分子機序を解明することで、より効果的な神経誘導技術の開発に繋がるものと考えられる。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Yu Sugawara, Aya Yamada, Satoshi

Fukumoto, Cross-talk between PDGF-BB and BMP-2 is important for the stemness of dental pulp stem cells, 25th Congress of the International Association

Paediatric dentistry (IAPD)、2015年7

月1日～7月4日、グラスゴー

〔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 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

菅原 優 (Sugawara, Yu)