

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21457

研究課題名(和文)ジルコニアおよびチタン上培養細胞における骨芽細胞分化能の比較

研究課題名(英文) Differentiation potential of osteoblast from cultured C2C12 cells on zirconia disk.

研究代表者

斉藤 まり (SAITO, Mari)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：60739332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では歯・インプラント・顎骨・歯根膜の相互作用の解明について多方向よりアプローチし、成長因子の機能と細胞増殖分化制御に関する新たな知見を得た。

1. ヒト歯根膜細胞6株を樹立し、すべての細胞株でTGF- $\beta$ により骨芽細胞分化が促進し、BMPによって抑制された。2. レーザー照射によって発現の上昇が認められたMMPは、細胞内TGF- $\beta$ の活性化に関与する。3. 幼若エナメル質ではTGF- $\beta$ 1が、成熟期エナメル質ではTGF- $\beta$ 1と3が共存する。4. 樹立した歯髄細胞株は象牙芽細胞分化能を有しており、TGF- $\beta$ およびBMPによる分化誘導によってDSPP、MMP-20の遺伝子を発現した。

研究成果の概要(英文)：This study approached from a variety of angles which focus on interface of the dental implants and the alveolar bone. New knowledge was obtained it about growth factors affect the proliferation and differentiation of mesenchymal cells.

1. Six human periodontal ligament (HPDL) cell lines were picked up, TGF- $\beta$  and BMP regulated osteoblastic differentiation of all cell lines. 2. Intracellular TGF- $\beta$  was activated by MMPs enhanced in HPDL cells by Er:YAG laser irradiation. 3. We identified TGF- $\beta$  isoforms in porcine immature and mature enamel of developing teeth. These results suggest that TGF- $\beta$ 1 is predominant in the secretory-stage enamel, while both TGF- $\beta$ 1 and 3 coexist in the maturation-stage enamel. 4. We established cell lines from porcine dental pulp and examined the effects of BMP2 and TGF- $\beta$  on the odontoblastic differentiation. After differentiation, odontoblastic cells were expressed the gene of DSPP and MMP-20.

研究分野：生化学 分子生物学 歯周病学 歯科インプラント学

 キーワード：歯周組織再生 歯根膜付きインプラント 細胞増殖分化 成長因子 TGF- $\beta$  BMP オッセオインテグレーション ジルコニア

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療は、細胞(Cell)・成長因子(Growth Factor)・足場(Scaffold)の三つの構成要素の相互作用から成り立つ。現在に至るまで歯根膜付きインプラントについてさまざまな研究が行われているが、実現にはこれらの要素が複雑に作用することから開発が難航している。

報告者は以前、新規材料であるセリア系ジルコニアをもちいて細胞増殖分化と成長因子の作用を解明した(Dent Mater J. 2014 ; 33(2) : 275-83.)。現在、臨床応用されているインプラントと顎骨は直接結合しており(オッセオインテグレーション)、インプラントと顎骨の界面には歯根膜はない。生体における歯根と顎骨との界面である歯根膜の増殖分化制御については研究がおこなわれているものの、いまだ不明な点が多い。In vitro で用いるヒト歯根膜細胞は購入ないし患者提供によるものに入手法段が限られており、倫理審査が必須である。

このことから、性質の安定したヒト歯根膜細胞を株化し、再生医療の要素のひとつである成長因子と足場を組み合わせることで、細胞と成長因子の相互作用の解明による歯根膜付き歯科用インプラントの臨床応用の可能性を模索する。

## 2. 研究の目的

ヒト歯根膜細胞の増殖分化制御に必須である成長因子の細胞への作用を解明する。成長因子は Transforming growth factor(TGF) スーパーファミリーである TGF- と Bone morphogenetic protein(BMP) について検討を行う。

成長因子に対する安定した反応性をもつヒト歯根膜細胞を株化することで実験の安定性・再現性をねらい、今後の研究へ応用する。

株化歯根膜細胞を用いて、新規材料であるセリア系ジルコニア上で細胞分化を行い、その反応性を従来のインプラント材であるチタン上での反応性と比較することでインプラントフィクスチャー(歯根部)としてのセリア系ジルコニアの将来性を模索する。

## 3. 研究の方法

### (1)ジルコニア上での株化ヒト歯根膜細胞の増殖分化制御

購入したヒト歯根膜細胞に SV40 large T antigen を導入し、G418 添加と限界希釈法を用いた培養で単一細胞由来のコロニーを採取した。得られたクローンは細胞形態、細胞増殖能が株化前細胞に近似の細胞を選び、アルカリフォスファターゼ活性の測定を行った。

株化した歯根膜細胞を用い、アレルギー反応が少なく、歯に近似の色調を持つ新規材料

であるセリア系ジルコニア上で成長因子を添加して細胞分化培養を行い、その反応性を従来のインプラント材であるチタン上での反応性と比較することで、インプラントフィクスチャー(歯根部)としてのセリア系ジルコニアの将来性を模索した。

### (2)ヒト歯根膜細胞中の内在性 TGF- に対する Er:YAG レーザーの照射効果

歯科治療に用いられる Er:YAG レーザーを生体へ低出力で照射する Low reactive Level Therapy(LLLT)は創傷治癒を促進する。LLLT による治療効果は臨床的に有効であるが、細胞増殖や分化にどのような影響をおよぼしているか、その基礎的知見には不明な点が多い。細胞増殖分化を制御する TGF- に着目し、培養ヒト歯根膜細胞を用いてその影響について検討した。

ヒト歯根膜細胞に Er:YAG レーザーを 50mJ, 10pps, 照射距離 2cm, 10 秒間スイーピングモードで照射し、レーザー照射後に活性型ビタミン D3 および BMP 受容体阻害剤である LDN-193189 を添加し培養を行った。レーザー照射による細胞増殖能の測定および細胞形態の変化を確認した。アルカリフォスファターゼ活性は、象牙質タンパクおよびエナメルタンパクを添加した場合、TGF- 阻害剤 SB431542 を添加した場合、潜在型 TGF- を添加した場合で測定した。

### (3)幼若および成熟エナメル質中の TGF- アイソフォーム

成長因子である TGF- は生体内で様々な反応を司るが、その反応性等いまだ不明な点が多い。生体硬組織である歯のエナメル質中に存在している TGF- の存在様式、活性化・不活化、維持のメカニズムをヒト培養歯根膜細胞との反応性から確認した。

生後約 5 ヶ月のブタ永久第二大臼歯より幼若及び成熟エナメル質を採取し、リン酸緩衝液(pH7.4, 中性)と炭酸緩衝液(pH10.8, アルカリ性)を用いてタンパク質を抽出した。中性画分はさらに硫酸を用いて分画し、アルカリ性画分はヘパリンクロマトグラフィーで分離した。硫酸分画およびヘパリンクロマトグラフィーで得られた画分をヒト歯根膜細胞に添加し、アルカリフォスファターゼ活性の測定を TGF- 活性として評価した。また TGF- 1, 2, 3 抗体を用いた ELISA により画分中の TGF- アイソフォームを同定した。

### (4)ブタ歯髓細胞の不死化と象牙芽細胞分化に及ぼす TGF- と BMP の影響

TGF- と BMP は細胞分化に影響をおよぼすことから、歯の形成過程においても関与が考えられる。ブタ歯髓細胞を株化し、成長因子が細胞分化をどのように制御するか検討した。

萌出前のブタ切歯の歯髓から分離した細胞に SV40 T antigen を導入し、G418 添加と

限界希釈法を用いた培養で単一細胞由来のコロニーを採取した。得られたクローンはアルカリフォスファターゼ活性の高いものと低いものが存在したので、両者の代表的なクローンを選び、BMPとTGF- $\beta$ に対する反応を検討した。象牙芽細胞のマーカーとなる象牙質シアロリンタンパク質(DSPP)とそのプロセッシング酵素であるMMP-20の遺伝子発現は、qPCR法を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

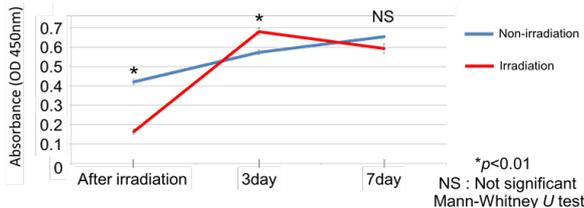
##### (1) ジルコニア上での株化ヒト歯根膜細胞の増殖分化制御

ヒト歯根膜細胞を株化し、6細胞株を分離した。細胞形態および細胞増殖能が初代培養細胞とかけ離れた細胞株を除外した。さらに、骨芽細胞分化誘導を行って分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性を測定し、初代培養細胞に近似の株化細胞を選び、初代培養細胞と性質を比較した。

分離したどの株化細胞においてもTGF- $\beta$ により骨芽細胞分化が促進し、BMPによって抑制される傾向にあった。

##### (2) ヒト歯根膜細胞中の内在性TGF- $\beta$ に対するEr:YAGレーザーの照射効果

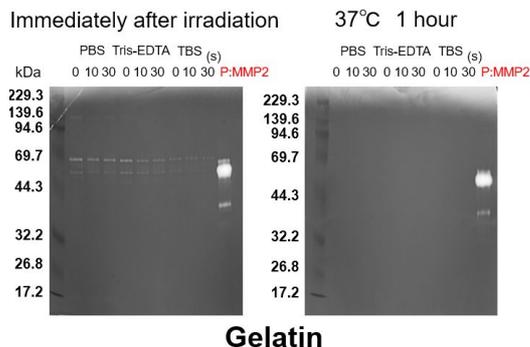
ヒト歯根膜細胞にレーザーを照射することでアルカリフォスファターゼ活性が上昇し、TGF- $\beta$ 阻害剤添加群は未添加群に比べその活性は著しく低かった。細胞増殖能測定においてレーザー照射直後は未照射群に比べて細胞数は低かったが、3日目まで未照射群の値を上回っていた(図1)。



(図1)

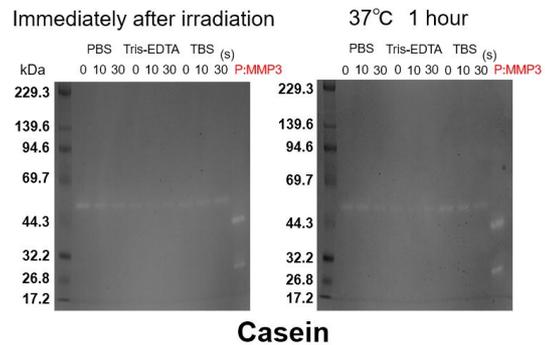
MMPの発現は3日目で強く認められたが、レーザー照射によって直接proMMPを活性化することは出来なかった。またレーザー照射した潜在型TGF- $\beta$ によるヒト歯根膜細胞に対するアルカリフォスファターゼ活性の上昇も認められなかった(図2)。

#### proMMP-2



Gelatin

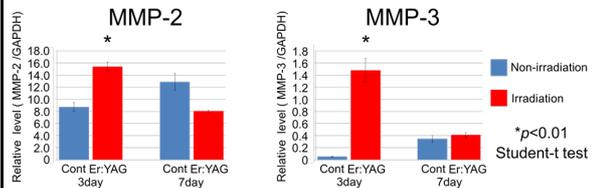
#### proMMP-3



Casein

(図2)

レーザー照射はヒト歯根膜細胞中の潜在型TGF- $\beta$ を直接的には活性化しないが、レーザー照射によって発現の上昇が認められたMMPがTGF- $\beta$ の活性化に関与することが判明した(図3)。



(図3)

##### (3) 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

幼若(S)および成熟(H)エナメル質試料の中性(N)画分から硫酸分画によって3つの画分(S-N1~S-N3およびH-N1~H-N3)を得た。また幼若-アルカリ性画分および成熟-アルカリ性画分はヘパリンクロマトグラフィーにより5つの画分(S-AL1~S-AL5およびH-AL1~H-AL5)に分離された。

ヒト歯根膜細胞のアルカリフォスファターゼ活性は、幼若および成熟エナメル質試料共にN(中性画分)1>AL(アルカリ性)1>AL2の順でアルカリフォスファターゼ活性が高く検出され、その活性はすべての画分において幼若>成熟エナメル質試料で高かった(図4)。

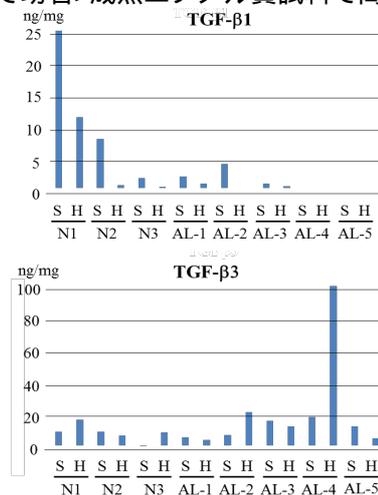
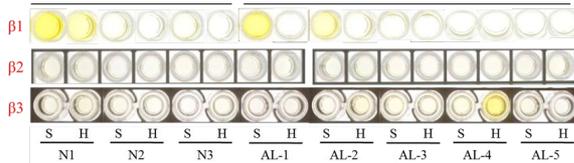


図4

TGF- $\beta$  1 抗体を用いた ELISA では測定したアルカリフォスファターゼ活性の結果に依存して陽性であったが、TGF- $\beta$  3 抗体ではアルカリフォスファターゼ活性が検出されなかった H-AL(成熟エナメル質-アルカリ性画分)2~H-AL5 で陽性であった。また TGF- $\beta$  2 は検出されなかった(図 5)。

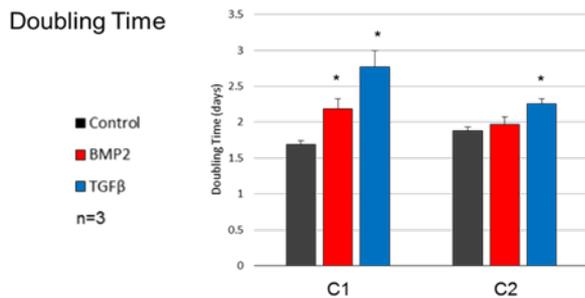


(図 5)

幼若エナメル質では TGF- $\beta$  1 が、成熟期エナメル質では TGF- $\beta$  1 と 3 が共存することが示唆された。さらに TGF- $\beta$  3 はヒト歯根膜細胞に対してアルカリフォスファターゼ活性を上昇させないことが考えられた。

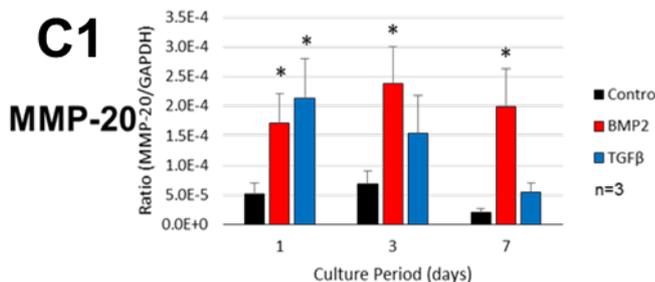
(4) プタ歯髓細胞の不死化と象牙芽細胞分化に及ぼす TGF- $\beta$  と BMP の影響

アルカリフォスファターゼ活性の高いクローン 1 の細胞増殖能は BMP に反応せず、TGF- $\beta$  で抑制された。また、アルカリフォスファターゼ活性の低い C2 の細胞増殖能は BMP で促進され、TGF- $\beta$  で抑制された(図 6)。

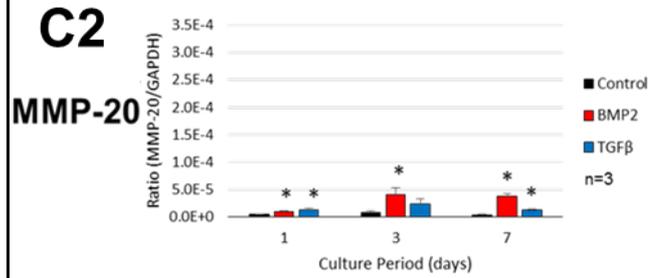


(図 6)

DSPP と MMP-20 の遺伝子発現は C1 が C2 を上回った。BMP と TGF- $\beta$  を添加して 1, 3, 7 日目の遺伝子発現を測定したところ、C1, C2 とともに MMP-20 の発現が上昇した。BMP による MMP-20 の発現上昇は測定期間中続いたが、TGF- $\beta$  による発現上昇は 1 日目に限られた(図 7a, b)。



(図 7a)  
(図 7b)



C1 は C2 に比べてアルカリフォスファターゼ活性、DSPP と MMP-20 遺伝子の発現が高く、象牙芽細胞へ分化していると考えられた。

骨芽細胞分化に対して BMP は促進的に、TGF- $\beta$  は促進と抑制の両方に働くことが示唆された。

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 1 件)

小林 一行, 丹羽 堯彦, 山川 駿次郎, 齋藤 まり, 山崎 泰志, 細矢 哲康, 五味 一博, 山越 康雄 : hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザーの照射効果. 日本レーザー歯学会誌 2016, 27(3):84-89. <http://doi.org/10.5984/jjpnsoclaserdent.27.84> (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

唐木田 丈夫, 大井田 新一郎, 山本 竜司, 齋藤 まり, 山越 康雄 : プタ歯髓細胞の不死化と象牙芽細胞分化に及ぼす TGF と BMP2 の影響, 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会, 2016 年 8 月 24-26 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)(in English)

大久保 水羽, 小林 冴子, 山本 竜司, 齋藤 まり, 長野 孝俊, 五味 一博, 大井田 新一郎, 山越 康雄 : プ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 年 8 月 24-26 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) (in English)

小林 一行, 丹羽 堯彦, 山川 駿次郎, 齋藤 まり, 山本 竜司, 山越 康雄 : hPDL 細胞中の内在性 TGF- $\beta$  に対する Er:YAG レーザーの照射効果, 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会, 2016 年 8 月 24-26 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) (in English)

小林 一行, 丹羽 堯彦, 山川 駿次郎, 齋藤 まり, 山崎 泰志, 細矢 哲康, 五味 一博, 山越 康雄 : hPDL 細胞に対する Er:YAG レーザーの照射効果, 第 28 回 日本レーザー歯学会学術大会, 2016 年 7 月 16 日, ウィンクあいち(愛知県名古屋市)

齋藤 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 年 9 月 11-13 日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)(in English)

〔その他〕

鶴見大学歯学部 業績管理システム

齋藤まり

<https://rams.manage.spcloud.jp/perfman/teachers/profile/1380?code2=D01080&ref1=dental&ref2=find>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 まり (SAITO, Mari)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号 : 60739332