

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2022

課題番号：16K11600

研究課題名(和文) 歯髄細胞の幹細胞化を応用した新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy based on stem cell conversion of dental pulp cells

研究代表者

宮城 麻友 (MIYAGI, Mayu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：20625719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：TNF- α 刺激歯髄細胞から得たタンパク質から、抗体アレイにてp38MAPK、TRAF1等が検出された。

また、骨髄由来細胞(BMC)においてもTNF- α の刺激は細胞増殖や細胞形態に影響を与えず、未分化性マーカー遺伝子の発現を上昇させた。TNF- α 刺激群および非刺激群のBMCを各誘導培地で培養し、マーカー遺伝子の発現をリアルタイムRT-PCRで比較すると、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞マーカーは非刺激群の方が高い発現量を示し、脂肪細胞マーカーは有意差を認めなかった。TNF- α 短期刺激により骨分化は一時的に遅延する傾向があったが、これは幹細胞性を持つ細胞の割合が増加した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TNF- α がBMCの未分化性獲得に関与し、幹細胞性質を保ったまま大量培養できる可能性が示されたことから、歯槽骨や神経の再生、骨折・抜歯窩の治癒促進への貢献が期待される。また、メカニズムを解明し、歯髄組織において人為的に象牙芽細胞の再活性化を促すことで、歯髄組織の再生、象牙質の再生に結びつけることが可能となれば、抜髄リスクの軽減やう蝕の抑制、歯の延命、さらには、健康寿命の延長につながると考えている。また、この技術が他の細胞でも応用できれば、今後再生医療における細胞材料としての幅を広げることができると考える。

研究成果の概要(英文)：p38MAPK, TRAF1, and few others were detected in proteins obtained from TNF- α -stimulated dental pulp cells by antibody array.

TNF- α stimulation did not affect cell proliferation or morphology of bone marrow-derived cells (BMC), but increased expression of undifferentiated marker genes. TNF- α -stimulated and non-stimulated BMC were cultured in their respective induction medium. The expression of marker genes were compared using RT-PCR. BMC expression of osteoblasts, chondrocytes, and neurons were higher in the non-stimulated group, while no significant difference was observed for adipocyte markers. Bone differentiation tended to be temporarily delayed by short-term TNF- α stimulation, suggesting that the proportion of cells with stem cell properties may have increased.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯髄細胞 TNF-

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

象牙質・歯髄複合体は自己修復能を有しており、齶蝕、咬耗、摩耗や窩洞形成などの歯の損傷時には歯髄保護のために象牙質の修復が起きることが知られている。すなわち、象牙質に及ぶ歯の損傷は象牙芽細胞の損傷と炎症反応を惹起し、炎症性細胞から炎症性サイトカインやケモカインが放出され、それに引き続き血管新生が誘導され、さらに既存の象牙芽細胞が再活性化されて象牙質の再生が生じる、あるいは、歯髄内に存在する前駆細胞や歯髄幹細胞が新たに象牙芽細胞に分化し象牙質の再生が生じると推測されている。しかしながら、これらの現象の生理的メカニズムは完全には解明されていない。

一方、炎症性サイトカインの一つである TNF- α は損傷治癒過程において初期の段階で局所発現し、様々な成長因子やサイトカインの発現を誘導したり、細胞の遊走を促進して組織再生に関与している。骨折部位に TNF- α を作用させると治癒が促進するという報告 (Glass et al., PNAS 2011) がある。すなわち、創傷治癒過程の初期段階においては TNF- α のシグナルが重要な役割を果たしていると推測される。実際、研究代表者は、マウス露髄モデルにおいて、前駆細胞や歯髄幹細胞が露髄刺激により誘導されることを間葉系幹細胞のマーカーである CD146 の免疫染色にて確認しており、歯髄の炎症と幹細胞誘導の間には密接な関連が推測される。

研究代表者はこれまでの研究により、ヒト歯髄組織から得られた歯髄細胞に TNF- α を作用させることで、より多分化能の高い細胞の比率を上昇させることを示した。ヒト抜去歯由来歯髄細胞を TNF- α で処理すると、生細胞数は変化しないものの、間葉系幹細胞の表面抗原マーカーである SSEA4、CD146 陽性率が増加し、oct4 や nanog といった幹細胞マーカー遺伝子の発現が上昇すること、コロニー形成能が亢進され、テロメラーゼ活性が上昇することを確認した。さらに、TNF- α 前処理により歯髄細胞は脂肪細胞や軟骨細胞、骨芽細胞への分化が促進された。

これらの結果から、培養ヒト歯髄細胞において TNF- α は、培養歯髄細胞において、間葉系幹細胞の性質を保持した、より多分化能がある細胞の比率を上昇させる可能性 (リプログラミング効果) を有すると考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者が発見した、TNF- α による歯髄細胞の幹細胞化メカニズムをより詳細に解明し、歯髄細胞のリプログラミングに関与する因子を同定することにより、これを応用した新規覆髄剤を開発する。さらに、本技術の適応拡大に向けて、より採取しやすい骨髄細胞においても TNF- α 刺激による同様の効果が得られるか検討し、新たな生体材料の開発を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

実験 1 : TNF- α 短期刺激による発現タンパク質の変化

歯髄細胞を培養して、TNF- α (10ng/ml) で刺激した歯髄細胞と無処理の歯髄細胞からそれぞれタンパク質を回収し、抗体アレイ実験を行った。TNF- α のシグナル経路に関与する因子を 45 種類選択、配置したメンブレンを作製した。サンプル溶液中にメンブレンを浸してインキュベートすると、メンブレンに配置された各抗体と相互作用のあるタンパク質が複合体を形成することにより捕捉される。メンブレンを洗浄後、酵素標識抗体ミックスとインキュベートし、洗浄後、酵素反応 (化学発光) させることでタンパク質の検出を行った。ルミノイメージアナライザーを用いて検出・画像解析を行った。

<抗体アレイに用いた抗体>

Apaf1、BID、Caspase1、Caspase2、Caspase3、Caspase4、Caspase5、Caspase6、Caspase7、Caspase8、Caspase9、Caspase10、cytochromeC、ERK1、ERK2、FADD、c-Fos、JNK1、2、3、p-JNK1、2、3、c-Jun、MEK1、MEK1、MEK2、NF- κ B 50、NF- κ B 52、NF- κ B p65、I κ B- α 、I κ B- β 、I κ B- γ 、I κ B- ϵ 、I κ B kinase α 、I κ B kinase β 、NIK、Notch、p38MAPK、RAID0、Ras、RIP、SODD、TNFR1、TNFR2、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3

実験 2 : TNF- α 短期刺激による幹細胞特性への影響

骨髄細胞に TNF- α 刺激を行い、継代後 7 日間培養を行い、Quantitative real-time PCR および傾向免疫染色にて幹細胞マーカーとして Nanog と Oct4 の発現を検討した。

実験 3 : TNF- α 刺激が細胞の形態および増殖能に与える影響

2 日間の TNF- α 刺激後に継代した細胞を顕微鏡で観察し、細胞形態の評価を行った。また、培養 14 日後に CFU-F assay にてコロニー形成能、培養 1、3、5、7 日後に MTS assay にて生細胞数を測定し増殖能の評価を行った。

実験 4：TNF- α による多分化能への影響

BMCを10ng/mlのTNF- α で2日間刺激した後、継代し、骨、軟骨、神経、脂肪の各種分化誘導培地にて7日間培養を行い、Quantitative real-time PCRを行った。各種マーカー遺伝子として骨はOcn、Runx、軟骨はCol2a1、Aggrecan、神経はGfap、Tuj1、神経はAP2、Ppar- γ を用いた。

実験 5：骨分化の長期観察

骨形成マーカーのひとつであるアルカリフォスファターゼ (ALP) の活性を検出するため、WakoのLabAssay™ ALPを用いた。これまでの実験と同様にBMCをTNF- α で2日間刺激した後、継代し、3、5、7日後にALPアッセイを行った。また、培養7、14、21日目 にアリザリンレッド染色を行い、カルシウム沈着により石灰化した骨結節を染色した。

4. 研究成果

実験 1：TNF- α 短期刺激による発現タンパク質の変化

TNF- α により刺激した歯髄細胞から得られたタンパク質から、p38MAPK、TRAF1、Caspase3、SODD、RIP、TNFR1、JNK1、2、3、I κ B- α が検出された。しかしながら、無処理の歯髄細胞から得られたタンパク質と比較した、TNF- α 刺激による各因子の発現の増減に関しては結果が不安定であり確定は得られなかった。

実験 2：TNF- α 短期刺激による幹細胞特性への影響

Quantitative real-time PCRにより、幹細胞マーカーのOct4およびNanogの遺伝子発現について検討した(図1)。10ng/mlによるTNF- α 刺激により、コントロール群およびほかの濃度の刺激群と比較してOct4、Nanogともに遺伝子発現が有意に上昇した。

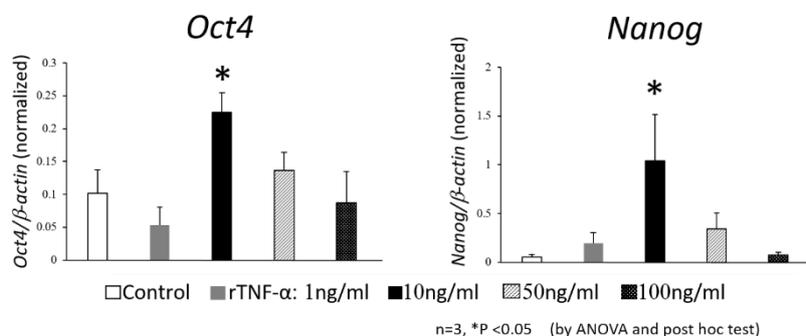


図 1. 幹細胞マーカーの遺伝子発現

次に、OCT4およびNANOGの発現について蛍光免疫染色にて検討した(図2、3)。コントロール群と比較して、TNF- α 10ng/mlによる刺激群では、単位面積当たりの陽性細胞の数が有意に増加した。

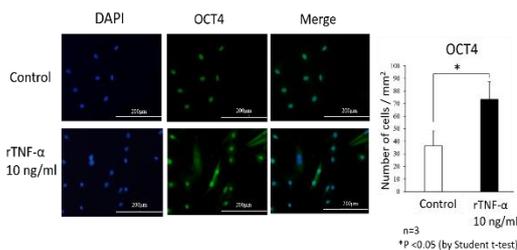


図 2. OCT4 遺伝子の免疫組織学的染色

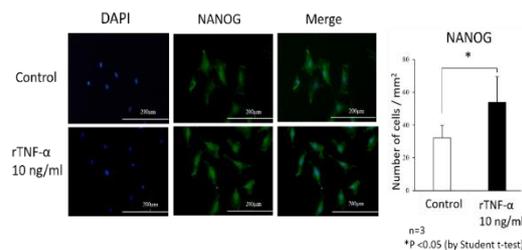


図 3. NANOG 遺伝子の免疫組織学的染色

実験 3：TNF- α 刺激が細胞の形態および増殖能に与える影響

BMSCの細胞形態は、コントロール群、TNF- α 10ng/ml 刺激群ともに紡錘形の細胞形態を示し、TNF- α 刺激による細胞形態への影響は認めなかった(図4)。

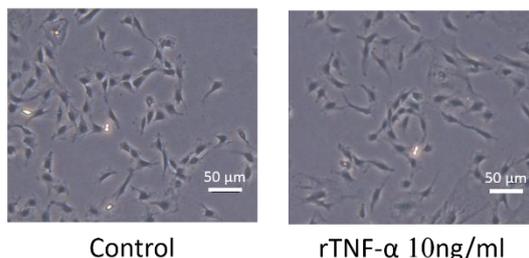


図 4. BMSC の細胞形態

CFU-F assay は、TNF- α 刺激 2 日後にプラスチックあたり 100 個の濃度で播種し、14 日間培養を行った。50 個以上の細胞数から形成されたコロニー数を計測し、コロニー形成能の評価とした。コントロール群、TNF- α 刺激群の間に、コロニー形成数に有意差はなかった (図 5)。

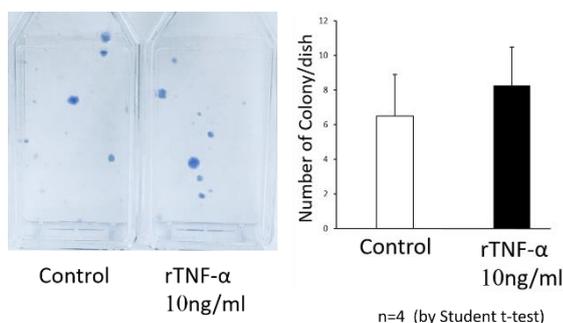


図 5. CFU-F assay

MTS assay は、1~100ng/ml の各濃度での TNF- α 刺激を行ったのち、2 日後に継代を行い、7 日間培養した。培養 1、3、5、7 日目に生細胞数の測定を行ったところ、各日程においてコントロール群、1ng/ml、10ng/ml での TNF- α 刺激群の間に生細胞数の差はなかったが、3 日目以降は 50ng/ml、100ng/ml 刺激群において他群と比較して生細胞数が有意に低い値を示した (図 6)。

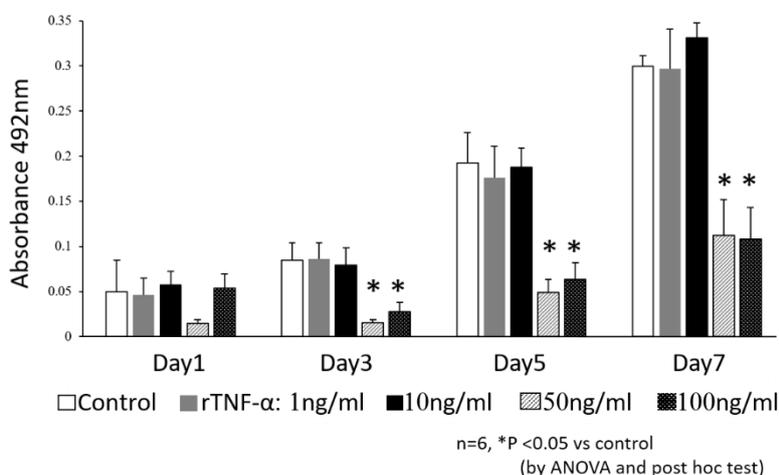


図 6. MTS assay

実験 4 : TNF- α による多分化能への影響

骨、軟骨、神経のいずれのマーカー遺伝子発現においても、コントロール群と比較して TNF- α 刺激群では有意に低い値が示された (図 7)。また脂肪のマーカー遺伝子については、両群の間に差は認めなかった (図 7)。

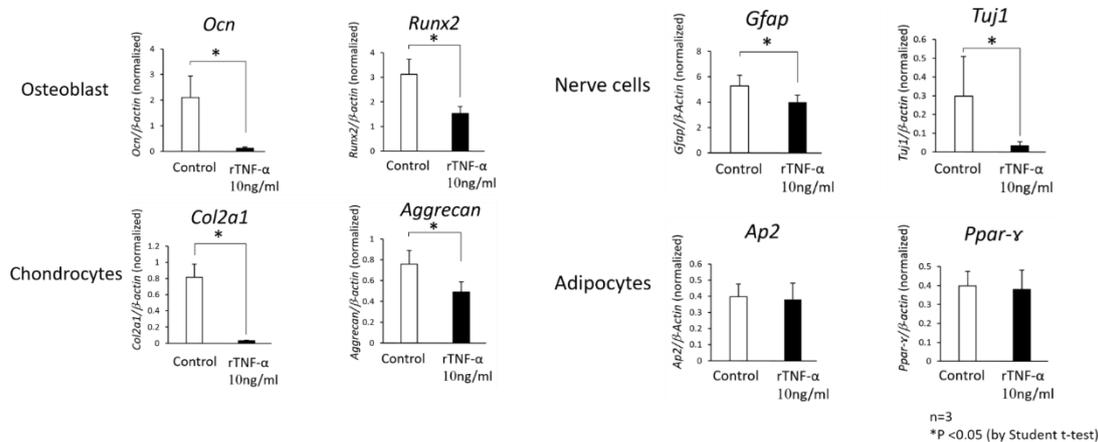


図 7. 骨細胞、軟骨細胞、神経細胞、脂肪細胞マーカー遺伝子の定量的 RT-PCR

実験 5：骨分化の長期観察

コントロール群と TNF- α 刺激群において、培養 3 日目の ALP 活性について差は認めなかったが、5 日目および 7 日目においては刺激群のほうが有意に低い値を示した (図 8)。

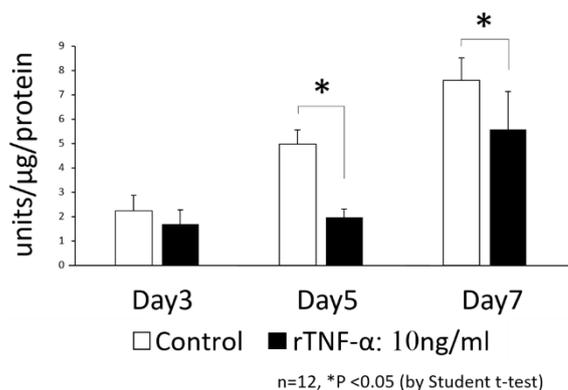


図 8. ALP assay

アリザリンレッド染色において、14、21 日目ではコントロール群と比較して刺激群で染色性が抑制されているが、その後 28 日目の段階では刺激群の石灰化が進み、コントロール群と比較して同程度以上まで回復している様子が観察された (図 9)。

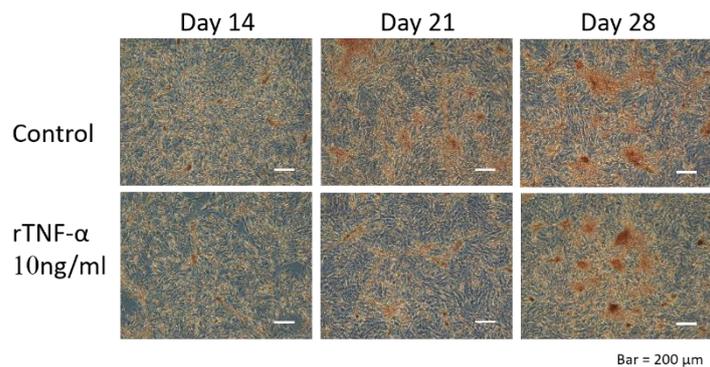


図 9. アリザリンレッド染色

以上の結果から、BMC に対して TNF- α 短期刺激を行うことで、生細胞数に影響を与えることなく、幹細胞の性質を持つ細胞の割合が増加し、骨分化においては一時的に遅延する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上枝麻友
2. 発表標題 炎症環境による歯髄細胞の幹細胞化 歯髄細胞分化に与えるTNF- の影響
3. 学会等名 日本顎口腔機能学会第56 回学術大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井上 美穂 (INOUE Miho) (20271059)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	
研究分担者	松香 芳三 (MATSUKA Yoshizo) (90243477)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	
研究分担者	大野 充昭 (OHNO Mitsuaki) (60613156)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------