

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17146

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞のCD44を介した象牙芽細胞分化誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of CD44 mediated odontoblastic differentiation induction mechanism of dental pulp stem cells

研究代表者

太田 貴久(Ohta, Takahisa)

朝日大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：10454274

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)：我々の先行研究にてヒアルロン酸は歯髄幹細胞のCD44を介して象牙芽細胞分化誘導を示すことを明らかにしたが、CD44の発現が普遍的に象牙芽細胞分化誘導に重要であるのかが明らかになっていない。そこで我々は象牙芽細胞分化誘導にCD44が関与しているのかを検証した。我々の探索から歯髄幹細胞をshikoninにより処置することにより、象牙芽細胞のマーカーであるDSPPが発現されることがわかった。またそのDSPPの発現はPI3K, AKT, mTORを抑制することにより抑制された。またCD44をノックダウンしたDPSCsではshikoninによるDSPPの発現が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、歯髄幹細胞を効率的に象牙芽細胞へと分化誘導する化合物の探索に成功し、また、そのメカニズムの一端を明らかにした。これにより、不明確であった歯髄幹細胞の分化誘導メカニズムの一部を明らかにしたことにより、今後、歯髄再生の方策に繋がることが期待される。また、歯科臨床における、新たな治療法の開発の一助となる。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we demonstrated that hyaluronan induces odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via interactions with CD44. However, it remains unclear whether CD44 expression by dental pulp stem cells is required for odontoblastic differentiation. We found that the shikonin which is include derivatives of naphthoquinone, the skeleton of vitamin K. The shikonin-induced expression of DSPP was inhibited by PI3K, AKT, and mTOR inhibitors. In addition, in dental pulp stem cells transfected with siRNA against CD44, the shikonin-induced expression of dentin sialophosphoprotein was inhibited.

研究分野：口腔外科

キーワード：歯髄幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

従来、歯髄組織には未分化な細胞が多く存在することが知られており、臨床においては、う蝕(虫歯) 歯周病などの刺激から歯髄を守るために歯髄組織内の細胞が象牙芽細胞へと分化することは広く知られている。一方、歯髄幹細胞は歯髄組織に存在し、酵素処理した歯髄組織から容易に分取できることがわかり、その歯髄幹細胞は CD29、CD90、CD44、CD146 などの幹細胞マーカーを発現しており、さらには幹細胞の特徴でもある Oct-4、SOX2 や Nanog などの転写因子を持つことが分かっている (Gronthos S, et al: PNAS, 2000)。

近年、多くの研究者が歯髄幹細胞の有用性に注目し、*in vitro*、*in vivo*の両方において、歯髄幹細胞から筋芽細胞、神経芽細胞、骨芽細胞、象牙芽細胞へ分化誘導できることを証明してきた (Arthur A, et al: Stem Cells, 2008) (Bakopoulou A, et al: Stem Cell Res, 2015)。動物実験では、歯髄幹細胞が筋組織や骨組織など様々な組織の再生に有用であることが示された (Graiano A, et al: Stem Cell Rev, 2015)。

一方、歯髄組織において、特に根未完成な部分では CD44 を発現している細胞が多く存在し、石灰化に強く関与していることが報告された (Chen KL, et al: J Endod, 2013)。そこで、申請者らは歯髄幹細胞における CD44 を刺激すると歯髄幹細胞が石灰化誘導されるのではないかと考え、歯髄幹細胞における CD44 について研究した。その結果、歯髄幹細胞は CD44 を 62%と高発現しており、CD44 のリガンドとして知られるヒアルロン酸の刺激により石灰化の指標であるアルカリフォスファターゼ (ALP) が誘導されることをウエスタンブロッティング法と蛍光定量法両方で証明した。次に、ヒアルロン酸による CD44 を介した刺激は歯髄幹細胞を骨芽細胞へと分化誘導しているのか、もしくは象牙芽細胞へと誘導しているのかを検証した結果、象牙芽細胞のマーカーである dentin sialophosphoprotein (DSPP) と dentin matrix acidic phosphoprotein-1 (DMP-1) の両方が遺伝子レベルだけでなく、タンパク質レベルで増加していることがわかった。さらに歯髄幹細胞はヒアルロン酸により CD44 を介して象牙芽細胞へと分化していることを証明した。つまり、歯髄幹細胞はヒアルロン酸により CD44 を介して象牙芽細胞へと分化誘導されることがわかった。そこで、申請者は CD44 を介した象牙芽細胞への分化誘導メカニズムを詳細に研究することで、より効率的に象牙芽細胞への分化誘導する方策がわかり、覆髄剤や歯牙再生への治療応用に繋がると考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導メカニズムを解明し、それにより、より効率的に象牙芽細胞への分化誘導する方策を探索するために下記のことを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

我々はビタミン K 群には骨の形成促進や組織の石灰化に作用するものを含むことから、ビタミン K の基本骨格であるナフトキノ誘導体を中心に、歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化誘導に関与する化合物があるのか探索した。その中で DPSCs 象牙芽細胞分化誘導メカニズムの詳細を検証した。

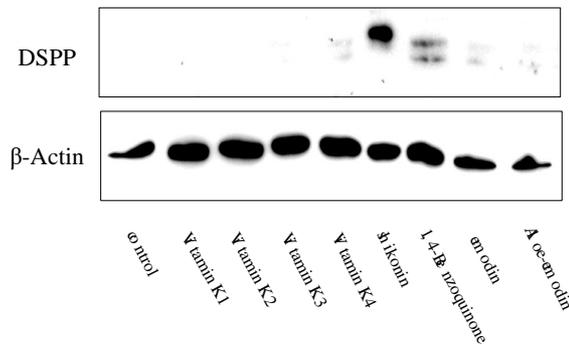
## 4. 研究成果

(1) Vitamin K 群の中で歯髄幹細胞を象牙芽細胞様分化誘導するのは Shikonin

ビタミン K は脂溶性ビタミンの 1 つとして知られている。様々な血液凝固因子に関連するタンパク質の翻訳後修飾の役割が知られている。また、オステオカルシンなどビタミン K 依存性骨

基質タンパク質の生成に骨形成に関与していることが知られている。その中で、近年ではビタミンK同族体の一つであるメナテトレインが、骨粗鬆症治療薬や止血薬として用いられている。そこで、ビタミンKの基本骨格であるナフトキノ誘導体を中心に、歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化誘導に関与しているのか

図 1 Shikonin の象牙芽細胞様分化誘導



検証した。その結

果、shikoninにおいて象牙芽細胞の分化マーカーである dentin sialophosphoprotein (DSPP) の発現を誘導した(図1)。このため、shikoninには歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導する活性を有していることが示された。

(2) Shikoninはその光学異性体 alkanin に比べ、歯髄幹細胞を象牙芽細胞様分化へ誘導する次に我々は shikonin とその光学異性体である alkanin の歯髄幹細胞に対する 50%阻害濃度 (half maximal inhibitory concentration: IC50)を調べてた。IC50 はそれぞれ、 $4.48 \mu\text{M} \pm 0.51$  と  $5.08 \mu\text{M} \pm 1.21$  で有意な差はなかった。さらに DSPP の発現誘導を検証した結果、shikonin は  $0.1 \mu\text{M}$  で DSPP が発現する(図)。その一方、alkanin には DSPP の発現誘導は見られなかった(図)。これらのことから、shikonin の光学異性体の alkanin には歯髄幹細胞を象牙芽細胞様に分化誘導する能力がないが、shikonin は歯髄幹細胞を象牙芽細胞様に分化誘導する能力があることが示された。

(3) Shikonin は Akt-mTOR を介して歯髄幹細胞を象牙芽細胞様に分化誘導する

Shikonin はどのような細胞内シグナル伝達で歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導しているのかを検証した。Shikonin は 30 分をピークに Akt のリン酸化を示し、また mTOR のリン酸化も 30 分から 90 分の間に見られた。そのことから、我々は shikonin の歯髄幹細胞を象牙芽細胞様への分化誘導には Akt-と mTOR が深く関与していると仮説を立てた。その検証のためにそれぞれの抑制剤でその細胞内シグナルを抑制した場合、DSPP の発現誘導が抑制されるのかを検証した。その結果、p-akt の抑制剤 Ly294002 で akt のリン酸化を抑制すると、DSPP の発現が抑えられた。また Akt の抑制剤 GSK690693 で Akt を抑制すると、DSPP の発現が抑えられた。mTOR の抑制剤 rapamycin で DSPP の発現が抑えられた。以上のことから、shikonin は Akt-mTOR を介して歯髄幹細胞を象牙芽細胞様に分化誘導されていることが示唆された。

(4) Shikonin は CD44 を介して歯髄幹細胞を象牙芽細胞様に分化誘導する

Shikonin が CD44 を介して、歯髄幹細胞を象牙芽細胞様に分化誘導しているのを検証するために、CD44 をノックダウンした。その結果、CD44 をノックダウンすると、shikonin による歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導は抑制された。そこで、我々は先に解明した shikonin は Akt-mTOR を介して DPSCs の象牙芽細胞分化を誘導することと、CD44 の発現が象牙芽細胞分化誘導に

関与することがどのように関連しているか調べる目的で、CD44 をロックダウンした状態で shikonin 処置した場合、shikonin による Akt-mTOR のシグナルはどうか検証した。その結果、CD44 を抑制すると shikonin による、Akt と mTOR の活性化は抑制されなかった。そのことから、shikonin による DPSCs の象牙芽細胞分化誘導は CD44、Akt-mTOR それぞれを別個で関与していることが示された。

#### (5) 結論

我々の先行研究から、ヒアルロン酸による歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導には CD44 を介することが明らかになっている。そして今回の研究から歯髄幹細胞へのヒアルロン酸による CD44 の刺激の有無ではなく、CD44 の発現自体が歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化誘導に重要であることが改めて明らかになった。また shikonin が歯髄幹細胞を Akt-mTOR signaling pathway を介して象牙芽細胞様分化誘導する。このことから shikonin は象牙芽細胞への分化誘導剤として有用であるし、歯科臨床においては歯髄保護剤としての可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sumi S, Umemura N, Adachi M, Ohta T, Naganawa K, Kawaki H, Takayama E, Kondoh N, Sumitomo S.	4. 巻 4(5)
2. 論文標題 The luminance ratio of autofluorescence in a xenograft mouse model is stable through tumor growth stages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical and experimental dental research	6. 最初と最後の頁 174-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cre2.126.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鷲見成紀、梅村直己、足立誠、太田貴久、長縄綱亮、川木晴美、高山英次、近藤信夫、住友伸一郎
2. 発表標題 口腔がん診断の自然蛍光画像診断の輝度比率は腫瘍の増大に影響せず安定してる
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術総会（九州大学）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田貴久、渡辺一弘、足立誠、笠井唯克、住友伸一郎
2. 発表標題 Nerve Integrity Monitor (NIM) を用いた顔面神経下顎縁枝温存の工夫
3. 学会等名 第36回日本口腔腫瘍学会総会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----