

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390514

研究課題名（和文）

発生過程を再現する象牙質再生技術の開発－歯胚や歯髄の不死化細胞株樹立とその応用－

研究課題名（英文）

Dentin regeneration by dental pulp stem cell, dental epithelium and dental mesenchyme

研究代表者

完山 学 (KANYAMA MANABU)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：90294420

研究成果の概要：

歯髄幹細胞，歯胚上皮細胞，歯胚間葉細胞を用いて，歯胚発生段階で生じている上皮間葉相互作用を再現することで象牙質を再生しようと試みた．その結果，上皮間葉相互作用に関連する Sonic Hedgehog (Shh) と呼ばれる成長因子が象牙質を産生する象牙芽細胞の増殖や分化を促進することが明らかとなり，この Shh が象牙質再生のキーファクターであることが示唆された．また，ヒトの智歯から採取した上皮細胞と間葉細胞を用い上皮間葉相互作用が試験管内で再現できる可能性が見いだされた．

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2007 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：歯科補綴学一般，再生歯学，発生生物学，分子生物学

1. 研究開始当初の背景

近年，再生医学の発達に伴い，歯髄内に存在する歯髄細胞に対して成長因子などを直接投与し，歯髄細胞を象牙芽細胞に分化させ，

象牙質を産生させようといった方法が試みられている．しかし，こうした方法では未だ完全に象牙質を再生させるに到っていない．一方，骨再生に目を向けると，患者の骨髄か

ら幹細胞を単離し、*ex vivo* で増殖後、それらの細胞を骨再建部位に戻す方法が臨床応用されつつある。この方法を応用して、患者の骨髄や歯髄から単離しておいた組織幹細胞を象牙芽細胞に分化させ歯髄創面に戻す方法も象牙質再生方法の一つとして期待が持たれている。

こうしたいずれの方法においても、象牙芽細胞の分化を積極的に誘導し象牙質を産生させる必要があるが、そのためには、歯の発生段階、すなわち歯胚間葉が象牙芽細胞に分化し、象牙質が形成される過程のメカニズムを分子レベルで知ることが必須である。なかでも、象牙芽細胞の分化過程においては歯胚上皮細胞と歯胚間葉細胞の間で生じる上皮間葉相互作用が象牙質やエナメル質の形態形成に非常に重要であることが知られている。

現在、歯胚上皮細胞や歯胚間葉細胞に関連した研究では、初代培養細胞がよく用いられているが、小型動物を用いた実験においては採取する細胞の量に限界があり、安定した実験データを得るためには歯胚上皮細胞や歯胚間葉細胞をクローニングし、細胞株を樹立することが必要となってくる。細胞株を樹立する際には、その細胞のもっているキャラクターが継代によって変化しないことが必要であり、そのため最近ではクローニングした細胞に human telomerase reverse transcript (hTERT) を遺伝子導入することで不死化細胞株にする技術が脚光を浴びている。

そこで本研究では、歯胚上皮細胞や歯胚間葉細胞、さらには歯髄細胞をクローニングし、hTERT の遺伝子導入により不死化させ、これらの細胞を用いて発生過程に生じている上皮間葉相互作用を試験管内で再現することを考えた。

2. 研究の目的

(1) 歯胚発生期に歯胚上皮と歯胚間葉の間で需要・供給されている既存の因子 (BMPs, FGFs, MSX-1, -2, TGF- β , CTGF, Wnt, Lhx, Shh など) を、hTERT の遺伝子導入で不死化した歯髄細胞に投与することで象牙質の再生を試みるとともに、(2) 胎生期、特にエナメル質・象牙質が形成される時期の歯胚上皮細胞と歯胚間葉細胞を単離、hTERT の遺伝子導入で不死化したこれらの細胞を用い、共培養することで上皮間葉相互作用を *in vitro* で再現し、象牙質のみならずエナメル質の再生も試みる。さらに (3) 実験的に作製した露髄面にクローニングした歯胚上皮細胞を移植し、歯髄細胞との間で生じる上皮間葉相互作用を *in vivo* で再現し、その際に発現する因子を網羅的に解析することで象牙質産生に関するマスターキー因子を解明したい。そしてこうした実験を通して新規の象牙質再生技術の開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 歯髄細胞の単離とhTERT遺伝子導入を導入した象牙芽細胞株の分化能の確認

ヒト抜去歯やラット前歯より Gronthos らの方法に準じて単離した歯髄幹細胞 (hDPSCs) と、hTERT を pCI-Neo-hTERT プラスミドと FuGENE 6 を用い遺伝子導入し、A standard sterile disc cloning法でテロメアーゼ遺伝子が導入されたラット歯髄由来象牙芽細胞株 (T4-4 cell) を、RT-PCR法で象牙芽細胞のマーカー遺伝子である dentin sialophosphoprotein (*dspp*) の発現を確認することで象牙芽細胞への分化能を確認する。

(2) 上皮間葉相互作用に関連するShhの象牙芽細胞の増殖・分化に与える影響

① *In vitro*におけるgain of function実験
上皮間葉相互作用に関連している既知の成長因子であるSonic Hedgehog (Shh)を(1)

の細胞に添加し、Shhが象牙芽細胞の増殖・分化に与える影響を調べる。すなわち、MTS assayにて細胞増殖を測定し、アルカリフォスファターゼ活性値の測定やPCR法を用いて遺伝子レベルでの解析を行う。さらにalizarin red染色を行い石灰化に及ぼす影響も調べる。

象牙芽細胞の分化マーカーには、アルカリフォスファターゼ(*alp*), *dspp*, *osteocalcin* (*ocn*), *osteonectin* (*on*)などを用いる。

② *In vitro*におけるloss of function実験

①で用いた Shh の作用を抑制することで象牙芽細胞の分化に及ぼす影響を追試する。抑制には Shh のインヒビターである cyclopamine を用いる。

(3) Shh 遺伝子導入のための DNA プラスミドの作製と hDPSCs への導入

ヒト Shh の N 末端部分 (1-600) を pCMV-script ベクターに組み込み (pCMV-hShh), このベクターを hDPSCs に導入し, Shh タンパクの産生効率を検討する。また, pCMV-hShh の *in vivo* 導入を試みる。

(4) 歯胚からの歯胚上皮細胞と歯胚間葉細胞の単離と上皮間葉相互作用の検討

胎生 10 日齢マウスやヒト幼弱智歯歯胚から歯胚上皮細胞と歯胚間葉細胞を単離する。また, 上記で得られた細胞に対して上皮間葉相互作用に関連している成長因子を添加し, 細胞増殖能や分化能を検討する。さらに上皮細胞と間葉細胞を用いて混合共培養モデルによる検討を行う。

4. 研究成果

(1) 歯髓細胞の単離と hTERT 遺伝子を導入した象牙芽細胞株の分化能

Gronthos らの方法に準じてヒト抜去歯から歯髓幹細胞(hDPSCs)を単離し, これらが象牙芽細胞へと分化することを確認するため, デキサメタゾン存在下で 30 日間培養を行っ

た。その結果, 培養 18 日目から象牙芽細胞のマーカーである *dspp* の発現が確認され, さらに, 石灰化ノジュールの形成も認められた (図 1)。また, hTERT 遺伝子を導入したラット歯髓由来前象牙芽細胞 (T4-4 cell) においてもほぼ同様の結果が得られた (図 2)。

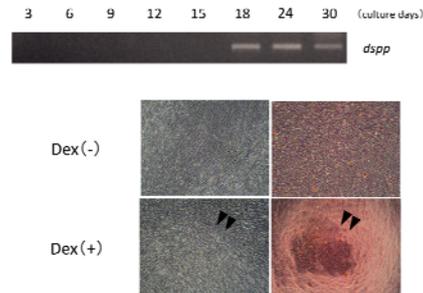


図 1 hDPSCs の象牙芽細胞への分化能

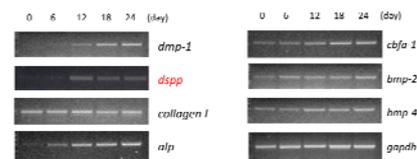


図 2 T4-4 cell の象牙芽細胞への分化能

(2) 上皮間葉相互作用に関連する Shh の象牙芽細胞の増殖・分化に与える影響

(1) で用いた hDPSCs と hTERT 遺伝子を導入したラット歯髓由来前象牙芽細胞 (T4-4 cell) を用いて上皮間葉相互作用に関連している既知の成長因子である Shh を添加し, Shh が象牙芽細胞の増殖・分化に与える影響を調べた。その結果, hDPSCs において Shh は培養 1 日目と 5 日目で細胞増殖を促進することが明らかになった。また Shh のインヒビターであるシクロパミン存在下で同様の実験を行った結果, Shh の hDPSCs に対する細胞増殖と分化の効果は抑制された (図 3)。また,

hDPSCs と T4-4 cell に Shh を添加したところ、有意にアルカリフォスファターゼ活性が高くなった (図 4)。さらに、*dspp* 遺伝子の発現を亢進させ (図 5)、石灰化ノジュールの形成をも亢進させることが明らかになった (図 6)。

以上の結果から、Shh が象牙質再生のキーファクターとなりうることが示唆された。

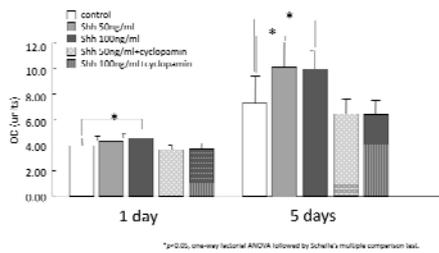


図 3 Shh の hDPSCs に対する細胞増殖に与える影響

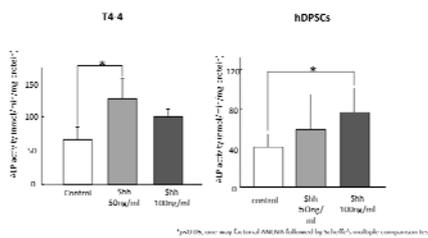


図 4 Shh の hDPSCs と T4-4 cell に対するアルカリフォスファターゼ活性に与える影響

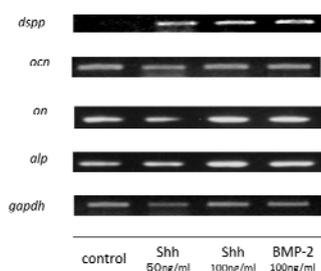


図 5 Shh の hDPSCs に対する *dspp* 遺伝子発現に与える影響

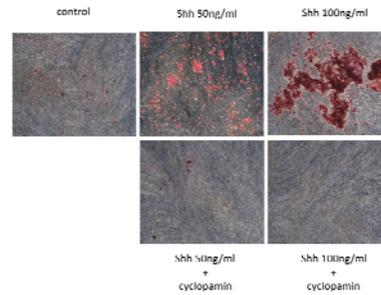


図 6 Shh の hDPSCs に対する石灰化ノジュール形成に与える影響

(3) Shh 遺伝子導入のための DNA プラスミドの作製と hDPSCs への導入

(2) において上皮間葉相互作用に関連している Shh が象牙芽細胞の増殖や分化に大きく影響を及ぼしていることが明らかになったため、本 Shh を用いた象牙質再生を試みることにした。しかし、こうした成長因子を生体に応用する場合、血流等により組織停滞性が低下し、その結果、効果を得ようとすると投与量が莫大となり、得られる効果よりも抗体産生などの副作用が懸念され、また、費用も莫大になってしまう欠点がある。そこでこの欠点を克服するために、驚くべき導入効率を示し、簡便で多臓器への遺伝子導入が可能ならば、副作用がなく、また、低コストで大量に作製できることが可能であるプラスミドによる遺伝子導入に着目した。

はじめに、ヒト Shh の N 末端部分 (1-600) を pCMV-script ベクターに組み込みこむことで pCMV-hShh を作製した。次に hDPSCs にこの pCMV-hShh を遺伝子導入したところ、本来、hDPSCs では遺伝子発現が認められない Shh タンパクの産生が認められた (図 7)。また、この pCMV-hShh の hDPSCs に対する Shh タンパクの産生効率を検討したところ、cell lysate においては pCMV-hShh 0.5 μg ~ 5.0 μg で導入 2 日後と 5 日後に、medium において

は pCMV-hShh0.5 μ g \sim 5.0 μ g で導入 2 日後に Shh タンパクの産生が認められた. 最も多く Shh タンパク産生が確認できたのは pCMV-hShh5.0 μ g を導入した medium 中であつた (図 7).

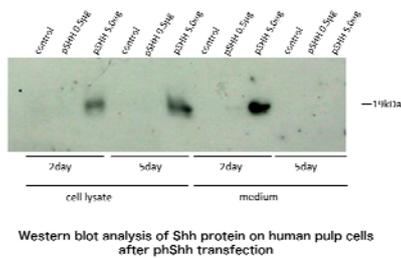


図 7 pCMV-hShh 遺伝子導入後の hDPSCs における Shh タンパクの産生

また, この条件下では, 細胞毒性による細胞死などは認められなかった. さらに *in vivo* 実験の手始めとして, pCMV-hShh をラット口蓋に作製した粘膜上皮欠損モデルに遺伝子導入したところ, コントロールと比較して血管新生が旺盛に認められた. しかし, 粘膜上皮の再生に関しては明らかな差は認められなかった.

本結果から, *in vivo* においても pCMV-hShh が遺伝子導入できる可能性が示唆されたが, 歯髄への遺伝子導入をどのように行うかが今後の課題と考えられた.

(4) 歯胚からの歯胚上皮細胞と歯胚間葉細胞の単離と上皮間葉相互作用の検討

E10 マウスの歯胚から単離した歯胚間葉細胞に上皮間葉相互作用に関連している BMP-4, CCN2, FGF-2 を添加し, その後の細胞増殖能を検討した結果, 24 時間後に BMP-4, FGF-2 添加群で, 48 時間後に FGF-2 添加群で有意に高い細胞増殖能を示した (図 8).

本結果は, 単離した歯胚間葉細胞を効率よく増殖させるには FGF-2 が有効であることを

強く示唆するものである.

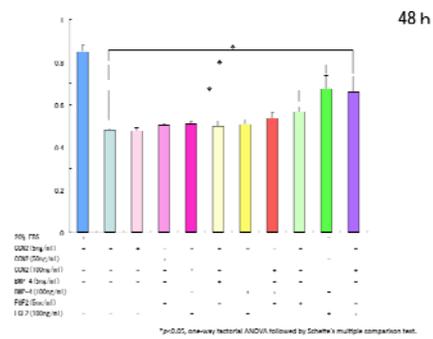


図 8 各因子添加 48 時間後の歯胚間葉細胞の細胞増殖

また, ボランティアより得られたヒト抜去歯に付着した歯小囊から上皮細胞用の培地で培養することで歯胚由来上皮細胞の分離に成功した. この細胞は RT-PCR により CK14, amelogenin 陽性であることが確認できた (図 9).

さらに, 歯乳頭を分離し, 酵素処理によって単一細胞化し, 培養により出現したコロニーをクローニングし, 歯胚由来間葉細胞を得た. この間葉細胞は RT-PCR により Vimentin が陽性であることが確認できた.

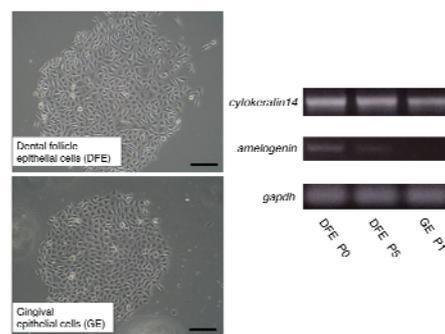


図 9 歯胚由来上皮細胞の分離と上皮細胞マーカーの確認

本結果から今後の展望として, この 2 種の細胞の上皮間葉相互作用を再構成モデルやチャンバー分離共培養モデル, 混合共培養モ

デルを用いて再現し、これまで不可能であった効率のよい象牙質再生技術を開発したいと考える。

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 2 件)

① 完山 学, 下野賢吾, 大野充昭, 窪木拓男, Shhの歯髄幹細胞の増殖と分化に及ぼす影響, Inflammation and Regeneration, 27 巻, 406, 2007, 査読無

② M Kanyama, H Sugito, T Kuboki, M Pacifici, E Koyama, Expression, Regulation and Function of CCN2 during Odontogenesis, Fourth International Workshop on the CCN Family of Genes Program and Abstracts, 27, 2006, 査読無 [学会発表] (計 4件)

① Kanyama M, Shimono K, Ono M, Matsuka Y, Kuboki T, Sonic hedgehog signaling regulates odontoblast proliferation and differentiation in vitro, 86th General Session & Exhibition the International Association for Dental Research, 2008. 7. 3, Tronto, Canada

② Tsuchimoto Y, Sonoyama W, Okamoto Y, Oshima M, Matsuka Y, Kuboki T. Characterization of Putative Amelogenic Cells Isolated from Human Dental Follicle, 86th General Session & Exhibition the International Association for Dental Research, 2008. 7. 3, Tronto, Canada.

③ 完山 学, 下野賢吾, 大野充昭, 窪木拓男, Shhの歯髄幹細胞の増殖と分化に及ぼす影響、第 28 回日本炎症・再生医学会, 2007. 8. 2, 東京

④ M Kanyama, H Sugito, T Kuboki, M

Pacifici, E Koyama, Expression, Regulation and Function of CCN2 during Odontogenesis, 4th International Workshop on The CCN Family of Genes, 2006. 10. 20, Okayama Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

完山 学 (KANYAMA MANABU)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：90294420

(2) 研究分担者

窪木 拓男 (KUBOKI TAKUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00225195

松香 芳三 (MATSUKA YOSHIKAZU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90243477

上原 淳二 (UEHARA JYUNJI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：10379836

園山 亘 (SONOYAMA WATARU)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：40325121

土本 洋平 (TSUCHIMOTO YOHEI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号：20423311

(3) 連携研究者

なし