

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390481

研究課題名（和文） Notchシグナルの歯髄細胞分化におけるメカニズムの解明とその臨床的展開

研究課題名（英文） Effects of Notch Signaling on the Pulpal Cell Differentiation and the Horizon of Pulpal Regeneration by Regulation of Notch Signaling

研究代表者

川島 伸之（KAWASHIMA NOBUYUKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60272605

研究成果の概要（和文）：

歯髄細胞が象牙芽細胞に分化・成熟する過程で様々な因子が関与していると推察されるが、そのメカニズムの詳細はいまだ明らかではない。我々はこれまでに骨芽細胞分化において Notch シグナルが重要であることを明らかにした。Notch シグナルは骨芽細胞の未分化性を維持する上で重要な働きを担っていた。歯髄組織においても Notch シグナルは発現しているとともに、骨芽細胞と同様に歯髄細胞の未分化性を維持する上で重要な働きを担っていた。Notch シグナルの下流にある因子として Hey1 があり、Hey1 の強制発現により歯髄細胞の象牙芽細胞への分化・成熟が抑制された。

研究成果の概要（英文）：

A numerous factors are involved in the course of odontoblastic differentiation. We revealed the importance of Notch signaling in the osteoblastic differentiation, suggesting that the Notch signaling may one of the essential factors to regulate the differentiation of mesenchymal stromal cells into hard tissue forming cells. In the pulp cells, Notch signaling took a central role of odontoblastic differentiation, and active Notch signaling induced pulp cells remained undifferentiated. Hey1 was a major transcriptional factor in the Notch signaling in the osteo/odonto-blastic differentiation, and enforced expression of Hey1 in the pulp cells were disturbed their odontoblastic differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：歯内療法学・歯髄生物学

科研費の分科・細目：歯科 保存治療系歯学

キーワード：歯髄細胞、象牙芽細胞、分化、Notch、未分化間葉系細胞、Hey1

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えるにあたって、“健康に噛める”ことの重要性は近年ますます高まっている。補綴技術の進歩とインプラントの隆盛には目を見張るものがあるが、自分の歯で咀嚼できることが最も望ましいのは明らかである。現在、歯の喪失の大きな要因となっているのは、歯周疾患、う蝕そして歯の破折である。う蝕に対して歯髄は痛みという警鐘を鳴らすとともに修復象牙質を形成して細菌侵襲にたいするバリアを築く。しかし、歯髄が失活してしまう、あるいは歯髄を失った無髄歯においては、そのシステムが働かないため、う蝕はどこまでも進行し、歯の喪失をもたらす。また歯の破折は、外傷により惹起されるものを除いて失活歯に多く認められる。失活歯の物性の劣化および支台の築造が主な原因である。すなわち、歯髄を失うことは、歯の喪失の大きな要因であり、歯髄をいかに保存する、あるいは再生させるかは今後の歯科医療において大きな課題であるといえよう。

ところで、歯髄を構成する細胞から象牙芽細胞が分化することは、防御システムとして修復象牙質が形成されることから明らかであるが、その分化メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。象牙芽細胞は象牙芽細胞突起を有する極性を持った細胞であり、**dentin sialo-phospho protein(DSPP)**, **Nestin**などを分化マーカーとして発現しているが、これらの遺伝子は分化の指標であり分化を決定する因子ではない。すなわち歯髄細胞分化を規定する因子についてはいまだ明らかではないのが現状である。

申請者らは、象牙芽細胞と同様に硬組織を形成する細胞である骨芽細胞の分化メカニズムについて検討してきた。その中で、**Notch**シグナルが骨芽細胞分化に大きな役割を果たしていることを報告してきた(文献)。すなわち、**Notch**シグナルは骨芽細胞も未分化状態を維持するシグナルであり、その解除は分化誘導をもたらすことを明らかにした。同様のシグナルが歯髄における硬組織形成細胞である象牙芽細胞の分化においても働いている可能性は高いと思われる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は歯髄細胞の分化における**Notch**シグナルの役割を明らかにすることである。さらに**Notch**シグナルを修飾することで、歯髄細胞分化をコントロールする可能性について検討し、臨床応用の可能性について検討する。

(1) **Notch** およびその下流のシグナルの発現動態の解明

(2) **Notch** およびその下流のシグナルの歯髄細胞における機能的な解析

## 3. 研究の方法

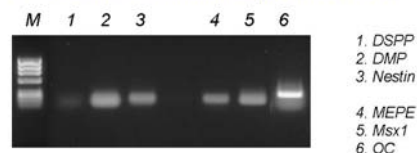
(1) **Notch** およびその下流のシグナルの発現動態の解明

**Notch** およびその下流の転写調節因子、モジュレーターなどの発現動態を解析する。

2) **Notch** およびその下流のシグナルの歯髄細胞における機能的な解析

歯髄細胞を象牙芽細胞に分化誘導したときに**Notch**シグナルの変動について検討する。

### 1. Odontoblastic marker expression in OLC

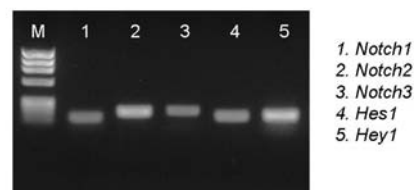


Expression of typical odontoblastic markers was observed in OLC.

Expression of typical odontoblastic markers was observed in OLC.

歯髄細胞株 OLC は、象牙芽細胞マーカー **Dspp**, **Dmp**, **Nestin**, **MEPE**, **Msx1**とともに石灰化マーカー**オステオカルシン (Oc)**を強く発現していた。

### 2. Notch signaling expression in OLC

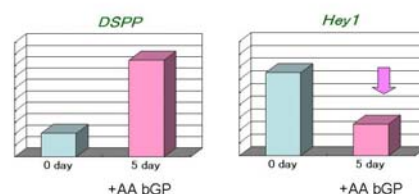


Expression of typical Notch receptors and their signaling factors was observed in OLC.

また、歯髄細胞は **Notch1-3**, **Hes1**, **Hey1**を強く発現していた。

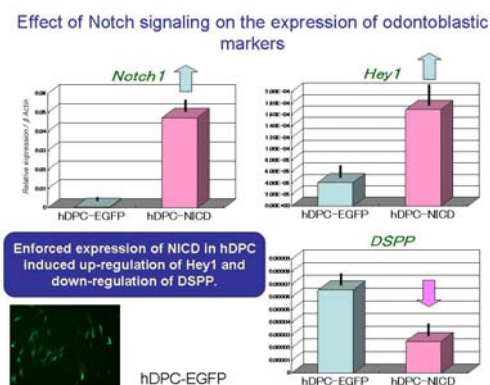
2) **Notch** およびその下流のシグナルの歯髄細胞における機能的な解析

Modulation of Notch signaling in the process of pulpal cell differentiation

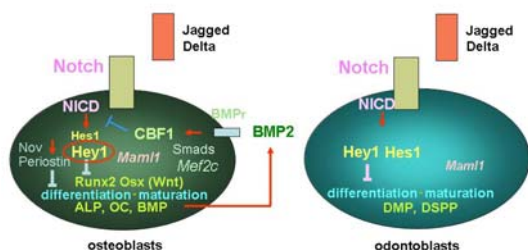


Down-regulation of Notch signals was observed in the process of pulpal cell differentiation.

歯髄細胞株 OLC をアスコルビン酸と  $\beta$  グリセロリン酸により分化誘導させると、象牙芽細胞マーカーである Dspp 発現は増加するが、代表的な Notch シグナルである Hey1 の発現は低下した。



Notch シグナルの強制発現により、Hey1 の発現は増加し、逆に象牙芽細胞マーカーである Dspp 発現は抑制された。



#### <結果のまとめ>

歯髄細胞の分化においても骨芽細胞と同様に Notch シグナルが働いており、その機能は分化を抑制し、未分化性を維持することにあることが明らかになった。

逆に Notch シグナルを抑制することにより、積極的に分化を誘導できる可能性が示唆された。臨床応用を図る上で、効率的に Notch シグナルの抑制を図る方法について今後検討していく。

#### 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 10 件)

1. Osteogenic differentiation of mouse mesenchymal progenitor cell, Kusa-A1 is promoted by mammalian transcriptional repressor Rbp. S. Wang, N. Kawashima, K. Sakamoto, K. Katsube, A. Umezawa, H. Suda, Biochemical and Biophysical Research Communications 400, 39-45, 2010. 査読有り

2. Differentiation of Odontoblasts Is Negatively Regulated by MEPE via Its C-Terminal Fragment. H.G. Wang, N. Kawashima, T. Iwata, J. Xu, S. Takahashi, T. Sugiyama, H. Suda, Biochemical and Biophysical Research Communications 398, 406-12, 2010. 査読有り

3. MEPE Activated by Furin Promotes Pulpal Cell Adhesion. H.G. Wang, N. Kawashima, T. Iwata, J. Xu, S. Takahashi, T. Sugiyama, H. Suda, Journal of Dental Research 2011 in press. 査読有り

4. Expression of Notch-Signalling-related Genes in Normal and Differentiating Rat Dental Pulp Cells. Sun H, Kawashima N, Xu J, Takahashi S, Suda H, Australian Endodontic Journal 36, 54-8, 2010. 査読有り

5. Root Canal Medicaments. Kawashima N, Wadachi R, Suda H, Yeng T, Parashos P. Int Dent J. 2009 Feb;59(1):5-11. 査読有り

6. T Cell Response Mediated by Myeloid Cell-Derived IL-12 Is Responsible for Porphyromonas gingivalis-Induced Periodontitis in IL-10-Deficient Mice. Sasaki H, Suzuki N, Kent R, Kawashima N, Takeda J and Stashenko P, The Journal of Immunology, 2008, 180: 6193-6198. 査読有り

7. Amelogenin positive cells scattered in the interstitial component of odontogenic fibromas. Kabasawa Y, Nagumo K, Takeda Y, Kawashima N, Okada N, Omura K, Yamaguchi A and Katsube K, J. Clin. Pathol., Jul 2008; 61: 851 - 855. 査読有り

8. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally-induced rat periapical lesions. Kawashima N., Suzuki

N., Yang G., Ohi C., Okuhara S., Kawanishi H., Suda H., Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 103, 707-711, 2007. 査読有り

9. Kinetic study of immunohistochemical colocalization of antigen presenting cells and nerve fibers in rat periapical lesions. Yang G, Kawashima N, Kaneko T, Suzuki N, Okiji T, Suda H J. Endodon, 33 (2), 132-136, 2007. 査読有り

10. Differentiation of an ameloblast-lineage cell line (ALC) is induced by Sonic hedgehog signaling. Takahashi S, Kawashima N, Sakamoto K, Nakata A, Kameda T, Sugiyama T, Katsube K, Suda H, BBRC, 353 (2007) 405-411. 査読有り

[学会発表] (計 26/42 件)

1. Expression of Mef2c in Murine Odontoblasts. N Kawashima, J Xu, N Suzuki, M Zhou, K Takimoto, Y Koizumi, M Yamamoto, A Salima, S Takahashi, H Suda, 8th World Endodontic Congress, 6 - 9 October 2010, in Athens, Greece.

2. Shh Signaling is Related to BMP and Wnt Signaling in Ameloblast Differentiation. S Takahashi, N Kawashima, K Katsube, T Sugiyama, H Suda, 8th World Endodontic Congress, 6 - 9 October 2010, in Athens, Greece

3. Wnt Signaling in Odontoblast Differentiation Induced by BMP. Y Koizumi, N Kawashima, K Takimoto, S Takahashi, J Xu, N Suzuki, M Zhou, M Yamamoto, A Salima, T Sugiyama, H Suda 8th World Endodontic Congress, 6 - 9 October 2010, in Athens, Greece

4. Analysis of osteoblastic mesenchymal cell adhesion on laser-induced dentin modification. Gombo Bolortuya, Arata Ebihara, Satoshi Watanabe, Tomoo Anjo, Chizuko Kokuzawa, Hidetoshi Saegusa, Nobuyuki Kawashima, and Hideaki Suda 8th World Endodontic Congress, 6 - 9 October 2010, in Athens, Greece

5. Promotive effects of Sp7 on Dsp expression. N Kawashima, J Xu, T Iwata, S Takahashi, Y Koizumi, K Takimoto, Z

Mengyu, C Ohi, N Suzuki, T Sugiyama, H Suda, 89th IADR General Session & Exhibition in Barcelona, Spain, July 14-17, 2010.

6. Effects of MMP-3 on Inflammatory Mediator Synthesis from Macrophages. K Takimoto, N Kawashima, M Nakashima, H Nakamura, Y Koizumi, and H Suda 89th IADR General Session & Exhibition in Barcelona, Spain, July 14-17, 2010.

7. Effective suppression of periapical lesion expansion by Cathepsin K inhibitor. Suzuki N, Kawashima N, Xu J, Suda H. 89th IADR General Session & Exhibition in Barcelona, Spain, July 14-17, 2010.

8. Expression of Vasoactive Intestinal Peptide Receptors in HERS Cells. J Xu, N Kawashima, N Fujiwara, H Harada, H Suda, 89th IADR General Session & Exhibition in Barcelona, Spain, July 14-17, 2010.

9. Induction of IL17 synthesis in the experimentally-induced murine periapical lesions. Kawashima N., Xu J., Suzuki N., Zhou M., Wei S., Takimoto K., Koizumi Y., Takahashi S., Suda H., 2010 Spring Scientific Meeting of Korean Academy of Endodontics, BEXCO Busan, Korea March 27, 2010.

10. 象牙芽細胞分化におけるSp7による dentin sialophosphoprotein発現誘導. 川島伸之、許セイ、岩田隆紀、周夢宇、瀧本晃陽、小泉悠、大井智恵、高橋里美、鈴木規元、須田英明、口演 日本再生医療学会 広島国際会議場 平成 22 年 3 月 18 日

11. Expression of Sp7 in the rat dental pulp. Kawashima N., Zhou M., Takimoto K., Koizumi Y., Ohi C., Takahashi S., Suzuki N., Suda H., 2009 Autumn Scientific Meeting of Korean Academy of Conservative Dentistry, Ramada Plaza, Jeju, Korea, Nov. 13, 2009.

12. VIP receptor expression in tooth development. Xu J, Kawashima N, Suzuki N, Okuhara S, Wei S, Takahashi S, Zhou M, Koizumi Y, Suda H, The 15th Asian Pacific Endodontic Confederation poster program 70, Toshi center Hotel Tokyo Japan 2009 年 4 月 25 日

13. Expression of Th17 related cytokines in experimentally-induced rat periapical lesions. Wei S Kawashima N, Suzuki N, Xu J, Takahashi S, Zhou M, Koizumi Y, Suda H, The 15th Asian Pacific Endodontic Confederation, Toshi center Hotel Tokyo Japan 2009年4月25日

14. Keratocystic Odontogenic Tumor: Case Report. Kawashima N, Kabasawa Y, Suda H, KAE Spring Scientific Meeting 37th Seosuk Hall, Chosun Univ, Gwangju, Korea, April 16-17, 2008.

15. Notch Signaling in the Dental Pulp. Kawashima N, Takahashi S, Okuhara S, Ohi C, Sun H, Wang H, Xu J, Katsube K, Arany S, Nakata A, Sugiyama T, Suda H, July 2-5, 2008 IADR General Session & Exhibition Metro Toronto Convention Centre, ON, Canada

16 Processing of Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein in Dental Pulp Cells Wang H, Kawashima N, Xu J, Takahashi S, Okuhara S, Iwata T, Suda H, July 2-5, 2008 IADR General Session & Exhibition Metro Toronto Convention Centre, ON, Canada

17. Shh Signaling is Related to BMP Signaling in Ameloblast Differentiation. Takanashi S, Kawashima N, Nakata A, Kameda T, Sugiyama T, Katsube K, Suda H, July 2-5, 2008 IADR General Session & Exhibition Metro Toronto Convention Centre, ON, Canada

18. The effects of Er:YAG laser irradiation on osteoblasts. A. Ebihara, S. Watanabe, H. Saegusa, T. Anjo, N. Kawashima, H. Suda, , July 2-5, 2008 IADR General Session & Exhibition Metro Toronto Convention Centre, ON, Canada

19. Role of Mef2c signaling in osteoblast differentiation. N. Kawashima, S. Takahashi, J. Xu, S. Okuhara, H. Wang, C. Ohi, N. Suzuki, H. Suda, 2008 Autumn Scientific Meeting (130th) of Korean Academy of Conservative Dentistry, COEX Seoul Korea Nov. 28-29, 2008.

20. 先進医療X線CT画像診断に基づく手術用顕微鏡を用いた歯根端切除手術の治療成績. 吉岡降知、八幡祥生、中野生和子、花田降周、石村瞳、菊地和泉、鈴木規元、川島伸之

之、砂川光宏、須田英明, 日本歯科保存学会 秋季大会 仙台国際センター 仙台 平成 21年10月29日

21. 歯髄細胞におけるOsterix発現. 川島伸之、許セイ、周夢宇、瀧本晃陽、小泉悠、大井知恵、高橋里美、鈴木則元、須田英明, 日本歯科保存学会 秋季大会 仙台国際センター 仙台 平成 21年10月29日

22. ラット実験的根尖性歯周炎の進展におけるカテプシンK阻害薬の抑制効果. 鈴木則元、川島伸之、許セイ、須田英明, 日本歯科保存学会 秋季大会 仙台国際センター 仙台 平成 21年10月29日

23. マクロファージのNO産生能に対するMMP-3の影響. 瀧本晃陽、川島伸之、小泉悠、中島美砂子、須田英明. 日本歯科保存学会 秋季大会 仙台国際センター 仙台 平成 21年10月29日

24. Tooth development in FGF18 deficient mice. Ohi C, Kawashima N, Suda H. 2007 2008 IADR General Session & Exhibition, San Aonio, 平成 19年3月24日

25. Expression of Maml1 in dental pulp cells. Kawashima N., Okuhara S., Takahashi S., Sun H., Wang H., Xu J. and Suda H. General meeting of European Society of Endodontology, Istanbul Convention Center ept 6-8, 2007

26. Detection of pulpal tissue autofluorescence using a confocal laser scanning microscope. Ebihara Arata, Watanabe Satoshi, Saegusa Hidetoshi, Anjo Tomoo, Kawashima Nobuyuki, Suda Hideaki General meeting of European Society of Endodontology, Istanbul Convention Center ept 6-8, 2007

〔図書〕(計1件)

Kawashima N and Suda H, Pathological aspects of pulpal and periapical inflammations in : Orstavik D and Pitt Ford TR editors, Essential Endodontology, Oxford, Blackwell Publishing, 2007 pp44-80.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 伸之 (KAWASHIMA NOBUYUKI)  
東京医科歯科大学・大学院歯学総合研究科・助教

研究者番号 : 60272605

(2) 研究分担者

勝部 憲一 (KATSUBE KENICHI)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・講師  
研究者番号：20233760  
坂本 啓 (SAKAMOTO KEI)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・助教  
研究者番号：00302886

(3) 連携研究者

なし