

機関番号：32404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592232

研究課題名（和文） 自己由来増殖因子による歯髄幹細胞の増殖及び分化誘導活性の
解析とその意義研究課題名（英文） The analysis and significance of the autoderived-growthfactor as a stimulator of
the proliferation and the differentiation of human dental pulp stem cells

研究代表者

片山 直（KATAYAMA TADASHI）

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：10105596

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヒト歯髄幹細胞の増殖・分化に対する洗浄血小板抽出液（WPLT）の作用を検討し、特に同細胞の初期増殖及び硬組織形成能に対する影響について検討を行ったものである。多血小板血漿（PRP）によるヒト歯髄細胞の増殖活性促進に比べて、WPLT のそれはより効果的であった。さらに、乏血小板血漿（PPP）はヒト歯髄細胞の増殖活性を抑制した。WPLT 単独ではヒト歯髄細胞に石灰化を観察できなかったが、WPLT に β -glycerophosphate と ascorbic acid を添加すると、石灰化を観察することができた。遺伝子発現を検討すると WPLT を添加したものは bone Gla protein (BGP) の mRNA の強い発現を認めたが、bone sialoprotein (BSP) と dentin sialoprotein (DSP) の mRNA の発現は認めなかった。また、 β -glycerophosphate と ascorbic acid を添加したものは BGP と DSP の mRNA の発現を認めた。しかし、WPLT に β -glycerophosphate と ascorbic acid を添加しても、mRNA の発現には相乗効果を認めなかった。これらの結果は、WPLT がヒト歯髄細胞の増殖および石灰化において重要な役割を担う可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：The efficacy of the extract of washed platelet (WPLT) as a stimulator of the proliferation and the calcification of human dental pulp stem cells was investigated.

The growth of pulp cells was weakly stimulated by treatment with platelet-rich plasma (PRP), while it was more effectively stimulated by WPLT. Moreover, platelet-poor plasma (PPP) dose-dependently inhibited the growth of cultured human dental pulp cells. WPLT stimulated the calcification induced by β -glycerophosphate and ascorbic acid in the pulp cells, although WPLT alone was ineffective. WPLT significantly stimulated the mRNA expression of bone Gla protein (BGP), but not that of bone sialoprotein (BSP) or dentin sialoprotein (DSP), β -glycerophosphate and ascorbic acid stimulated both BGP and DSP, and addition of WPLT with BGP and Aa did not produce any addition or synergic effect of the mRNA expression by β -glycerophosphate and ascorbic acid. These results suggest that WPLT is a potent stimulator of human dental pulp cells, and play a significant role in bone calcification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：再生医学・歯学・歯髄・生体材料・PRP

1. 研究開始当初の背景

歯内療法処置、特に、生活歯髄切断等の歯髄組織保存再生療法には、従来より水酸化カルシウムが使用され一定の効果を収めている。しかしながら、同薬剤は寛恕的に歯髄創面を壊死させるだけの作用しか有さず、積極的に歯髄組織を再生・石灰化させるものではない。同薬剤の歯内療法処置への応用は 100 年近くの長い歴史を持つが、逆に、これは他に適当な因子が存在しないという、歯内療法処置の進捗が停滞している事実を如実に物語っているにすぎない。再生医療の重要性が声高に叫ばれている現在、感染部位を機械的に除去しガッタパーチャーを充填するだけの治療法から、新たな歯内療法処置を創造する時代に来ているのではなかろうか。

現代社会においては交通手段の発達や社会構造の変化に伴い、感染症も世界的規模でリアルタイムに蔓延していく傾向が認められ、HIV や狂牛病感染等の問題を再生医療用材料から除外しようとした場合、自己由来の生体材料の使用が最も安全で効率的な方法と思われる。現在このような観点から見ると、多血小板血漿(platelet-rich plasma; PRP)療法は自己由来増殖因子の供給が容易に、また、確実に行える最も現実的な治療法であるように思われる。

そこで私共は、従来の PRP 療法における効果の不確実性を解明するため、様々な細胞や因子が含まれるヒト血液を、各々の血液成分ごとに分離し、各成分の歯周組織細胞に対する増殖活性を *in vitro* で検討した。その結果、血小板と血漿成分との混合物である PRP から、血漿成分を除去し洗浄血小板として作用させることにより、これら細胞に対する安定した増殖活性が得られる事が判明した。これに対し、従来の PRP は歯周組織細胞の増殖に対しては、全く効果を示さないか、逆に抑制的に作用した。(段 建民、菊地寛高、須田朋代、佐藤 雅、田島雅道、坂上 宏、片山 直：ヒト歯髄細胞の PGE₂ 産生に対する多血小板血漿 platelet-rich plasma 及び洗浄血小板の作用、日本歯科保存学会誌 49 (3):426-434, 2006)

(高山直士、田島雅道、菊地寛高、西川博文、坂上 宏、嶋田 淳：培養骨芽細胞の増殖を阻害する血漿中因子について。日本口腔外科学会雑誌, 51, 67-76, 2005) このように洗浄血小板の形態にすれば、微少な生活歯髄切断の創面にも同因子を作用させることが可能となり、増殖因子の作用濃度を自由に調節することも可能となる。また、洗浄血小板は破骨細胞の分化を抑制する事により硬組織形成を促進する方向に作用する可能性も示唆されている。(Kikuchi H, Duan J, Kobayashi K, Suda T, Satho M, Sugi Y, Katayama T and

Nishikawa H : Inhibitory effects of platelet-rich plasma on osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. J Hard Tissue Biol. 14(2), 98-100, 2006.)

そこで今回、近年特にその存在が明らかになりつつあり、歯髄組織再生において中心的役割を担うヒト歯髄幹細胞(dental pulp stem cell; DSP)の増殖・分化に与える洗浄血小板の効果について検討し、より効率的な歯髄組織保存再生療法実現の為の一助としたいと考えた。

2. 研究の目的

洗浄血小板中の自己由来増殖因子により歯髄幹細胞を分化誘導し安全で効率的な歯髄組織保存再生療法を実現させる

3. 研究の方法

1) ヒト歯髄細胞の調製

ヒト歯髄細胞は、矯正治療上の理由により便宜抜歯を行った 21 歳女性患者の小白歯から得た。抜去歯を直ちに α -MEM にて洗浄した後に分割し、注意深く歯髄を取り出した。この歯髄片を歯科用メスで約 1 mm 角の細片とし、10% FBS を添加した α -MEM 培地中で、37°C、5% 炭酸ガス気相下にて培養した。そして、細胞が前単層状態に達したところで Ca²⁺、Mg²⁺ を含まないリン酸緩衝液 PBS(-) で洗浄後、0.02% アクチナーゼ E と 0.02% EDTA-2Na を含む PBS(-) 酵素液により細胞を剥離して、継代培養を行った。実験には 5 代から 10 代継代したものを供試した。なお、培地の交換は 3 日毎に行い、細胞形態の観察は倒立位相差顕微鏡 (ECLIPSE TS100, Nikon) により行った。

本細胞の使用に関しては、明海大学倫理委員会のガイドラインに従い、プライバシーの保護を十分配慮し、結果ならびに検体の管理には研究代表者、および、所属長の責任のもとに厳重に管理、保管している (承認番号: A0206)。

2) 血小板浮遊液の調整

PRP は既報の方法により調製した。PRP の調製は健常成人男性の静脈より、1 ml の 3.8% クエン酸を含有するプラスチック注射器にて 9 ml の血液を採取したものを、直ちに転倒混和した後、ポリプロピレン製遠心管に移した。そして、170 × g、10°C、10 分間遠心し、その上層を PRP 画分として採取した。さらに下層の赤血球を 1,700 × g、20°C、30 分間遠心し、乏血小板血漿 (platelet-poor plasma ; PPP) を得た。PRP の血小板数の補整には、この PPP 画分を用いた。また、洗浄血小板抽出液 (washed platelet extract ; WPLT) の調製

を以下の方法にて行った。PRP に 60 mM EDTA 溶液 (pH 7.4) を 1/10 量添加し、十分に混和した後、 $1,700 \times g$ 、 20°C 、20 分間遠心分離した。上層の血漿を除去し、6 mM EDTA 含有 pH7.4 リン酸緩衝液を加えて、再度 $1,700 \times g$ 、 20°C 、20 分間遠心分離して上層を除去した。その後、氷上にて冷却しながら氷冷 α -MEM を適量加え、血小板数を開始時の PRP と同じになるように調整した。PRP と洗浄血小板は、3 回の凍結融解と 10 分間の超音波破碎 (Sine Sonic100、神明台工業、秋田) により血小板から成長因子を放出させ、 $1,700 \times g$ 、 20°C 、20 分間遠心して、上清を WPLT として実験に供試した。

3) 増殖細胞数の定量

ヒト歯髄細胞の増殖を Cell counting kit-8 を用いて既報の方法にて測定した。96 ウェルプレート (Becton Dickinson, USA) に歯髄細胞を 1×10^4 cells/100 μl /well の細胞密度で播種し、 37°C 、5 %炭酸ガス気相下にて 48 時間培養した。各種試薬を添加し、さらに 24 時間培養した後、テトラゾリウム塩である WST-8 を各ウェルに 10 μl 添加し、1 時間培養後、細胞内脱水素酵素によって WST-8 を還元して生成される水溶性ホルマザンの、405 nm における吸光度をマルチウェルプレートリーダーにて測定し、それを生細胞数の指標とした。

4) ヒト歯髄細胞の石灰化能の計測

ヒト歯髄細胞を 4.5×10^5 cells/6-cm dish の細胞密度にて播種し、10 %FBS を添加した α -MEM 培地、 37°C 、5 %炭酸ガス気相下にて 5 日間培養した。細胞が単層状態に達した後培地を penicillin G (100 U/ml)、streptomycin sulfate (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、10 % FBS を添加した α -MEM に交換し、コントロール群、WPLT を添加した WPLT 群、 β -glycerophosphate (10 mM) と ascorbic acid (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した β -glycerophosphate + ascorbic acid 群、WPLT と β -glycerophosphate、ascorbic acid を添加した WPLT + β -glycero phosphate + ascorbic acid 群の 4 群を作り、5 日ごとに培養液、試薬を交換しながら 21 日間培養を行った。培養後 95 % エタノールにて細胞を固定後、Alizarin Red S 染色を行い、細胞形態を位相差顕微鏡によって観察し、デジタルカメラを用いて撮影した。また、その濃染部分の面積を NIH Image により計測し、比較検討して石灰化面積の計測を行った。

5) 遺伝子発現の測定

リアルタイム RT - PCR 法を用いて、bone Gla protein (BGP)、bone sialoprotein (BSP)、dentin sialoprotein (DSP) の遺伝子発現レベルを検討し、18S リボソーム RNA の増幅産物量に対しての、各 mRNA の増幅産物の相対比

をもって当該遺伝子発現レベルとした。

4. 研究成果

Marx により PRP の有効性が報告されて以来、数多くの論文が発表されてきたが、その多くは症例報告、あるいは病理組織学的な検索によるものであり、歯髄・歯周組織細胞を用いて同因子の反応を細胞生物学的に詳細に検討した論文は意外にもごくわずかである。また、発表論文数の増加に伴い、PRP の効果を疑問視する報告も目立ち始めているが、PRP 療法自体は有効な自己由来増殖因子の供給による最も身近で確実な再生療法である事に間違いはない。当該研究は、効果の不確実な、従来からの血小板の調整方法を工夫し、より確実に効率的な、新たな洗浄血小板療法を目指したものである。また、従来より PRP の増殖促進効果には同因子中の PDGF が重要である言われていたが、歯髄細胞の分化はほぼ完全に TGF- β に依存することを明らかにした点も目新しい。さらに、本研究課題で応用する洗浄血小板療法は、既存の PRP 療法を改良することにより、その効果を確実にすることが出来、この治療法により歯髄幹細胞をはじめ、個々の歯髄細胞に対する作用を明らかにしていく戦略は独創的で、将来的に臨床応用が非常に近い研究といえる。

本研究課題は、ヒト歯髄幹細胞の増殖および分化に対する洗浄血小板中の自己由来増殖因子の効果を明らかにする事により、安全で効果的な歯髄組織保存再生療法を確立する事を目的とした。自己由来増殖因子による歯髄細胞の増殖促進効果および石灰化促進効果は、洗浄血小板中の増殖因子の中でも、TGF- β 、及び、TGF- β スーパーファミリーに属する BMP-2 に大きく依存する事がこれまでの研究により明らかになっている。ヒト歯髄細胞に対する TGF- β 、BMP-2 の作用の差異を検討したところ、同細胞の初期増殖は、洗浄血小板中の増殖因子の TGF- β 刺激により産生されたプロスタグランジン E2 に大きく依存する事。さらに、同細胞のオステオカルシン遺伝子の発現と石灰化は、BMP-2 により有意に促進されることが明らかとなった。このように、洗浄血小板中の増殖因子による刺激により形成された、複雑なサイトカインネットワークにより、ヒト歯髄細胞の増殖と分化という、相反する作用が観察される事が明らかとなった。また、形成された石灰化ノジュールを原子吸光により解析したところ、骨に近い組成を示し、骨様の石灰化である可能性が示唆された。そこで、セルソーターにより、c-kit+/CD34+/CD45- ヒト歯髄細胞から歯髄幹細胞を分取し、この歯髄幹細胞の増殖・分化に与える、洗浄血小板中の増殖因子の効果を詳細に検討したが、増殖促進効果、石灰化促

進効果共に弱いものであった。上記増殖因子による、ヒト歯髄細胞の著しい増殖・石灰化促進効果は、c-kit+/CD34+/CD45-細胞以外の、他の細胞との協調作用が必要とされるものであることが示唆された。

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2件)

① Iwasaka K, Tomita K, Ozawa Y, Katayama T, Sakagami H: Effect of CO₂ laser irradiation on hormesis induction in cultured oral cells, Journal of Oral Science: 25(1), 93-98, 2010.

② González-Alva P, Inoue H, Miyazaki Y, Tsuchiya H, Noguchi Y, Kikuchi K, Ide F, Ishihara S, Katayama T, Sakashita H and Kusama K: Podoplanin expression in odontomas: clinicopathological study and immunohistochemical analysis of 86 case, Journal of Oral Science: 53(1), 67-75, 2010

[学会発表] (計3件)

① 須田朋代, 菊地寛高, 田島雅道, 岩坂憲助, 龍田恒康, 片山直, 中村幸雄: 自己由来増殖因子による歯髄細胞の増殖および分化誘導活性の調節, 第21回日本歯科医学会総会, 横浜

② 岩坂憲助, 安永慎, 山田晶子, 段谷由香, 坂上宏, 片山直: 培養ヒト歯肉線維芽細胞の増殖に及ぼす CO₂ レーザー照射のホルメシス効果, 日本歯科保存学会 2009 年度秋季学術大会, 仙台

③ 竹川文弘, 岸野香織, 天野修, 菊地寛高, 石原真理子, 坂上宏: 4-トリフルオロメチルイミダゾール誘導体の腫瘍選択性と誘導される細胞死のタイプ, 第50回歯科基礎医学会学術大会, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山直 (KATAYAMA TADASHI)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号: 10105596

(2) 研究分担者

中村幸生 (NAKAMURA YUKIO)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号: 40207931

須田朋代 (SUDA TOMOYO)

明海大学・歯学部・助教
研究者番号: 60226579

石原祥世 (ISHIHARA SATIYO)
明海大学・歯学部・講師
研究者番号: 10223017

岩坂憲助 (IWASAKA KENSUKE)
明海大学・歯学部・講師
研究者番号: 60424058

(3) 連携研究者

菊地寛高 (KIKUCHI HIROTAKA)
明海大学・歯学部・講師
研究者番号: 70234193