

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21673

研究課題名（和文）Runx2の転写制御を介した象牙質再生の新戦略

研究課題名（英文）A novel strategy for dentin regeneration by transcriptional regulation of Runx2

研究代表者

山城 隆（Yamashiro, Takashi）

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70294428

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：歯髄は幹細胞を多く含むにも関わらず、象牙質の再生は確立されていない。歯髄細胞は通常の石灰化誘導培地で分化誘導を行うと骨芽細胞様の細胞に分化する。本研究では、Runx2の抑制に着目して新たな象牙芽細胞分化を促進する手法を検討した。その結果、塩素系の酸化剤である要時生成型亜塩素酸イオン水溶液（MA-T）は、細胞表面の糖鎖を修飾し、Runxシグナルを抑制し古典的Wntシグナルを活性化した。さらに、MA-TはDspやDmp1の発現を亢進し、ex vivoで切歯歯胚の象牙質の基質形成を促進した。シングルセルRNA解析より、象牙芽細胞分化の亢進とともにRunx2の発現が抑制されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

象牙質の再生は多くの研究グループによって検討されてきた。これまでに、BMPを含めた様々なサイトカインが歯髄細胞から象牙質を誘導する因子として検討されてきた。しかし歯髄細胞から骨様の石灰化物は誘導されるものの、象牙細管を有する基質を産生する象牙芽細胞を誘導する方法は未だ確立されていない。本研究は、象牙芽細胞への分化の分子機構の一部を明らかにしたことで学術的に意義が高い。また、塩素系酸化剤である要時生成型亜塩素酸イオン水溶液が、歯髄細胞の細胞周囲の糖鎖を修飾することで、象牙芽細胞分化を誘導するという、将来の臨床研究につながる所見が得られたため、臨床的な意義も高い。

研究成果の概要（英文）：Dentin regeneration has not been demonstrated despite the fact that dental pulp is rich in stem cells. Dental pulp cells differentiate into osteoblast-like cells when induced to differentiate in normal calcification induction medium. In this study, we investigated a new method to promote dentinoblast differentiation, focusing on the inhibition of Runx2. We found that MA-T, a chlorine-based oxidant, modified cell surface sugar chain, suppressed Runx signaling, and activated canonical Wnt signaling. In addition, MA-T increased the expression of Dsp and Dmp1 and promoted dentin matrix formation in incisor embryos ex vivo. Single-cell RNA analysis suggested that Runx2 expression was suppressed with increased dentinoblast differentiation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：Runx2 Wntシグナル 象牙芽細胞 歯髄細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯髄は、神経堤細胞由来の中胚葉由来の歯乳頭から形成された非石灰化組織である。一方、象牙質は歯髄腔の周囲にある硬組織であり、歯髄細胞から象牙芽細胞に分化し産生される。従来、齲蝕の治療においては、齲蝕部分は切削によって取り除かれ、保存修復処置がなされる。しかし、齲蝕によって発生するう窩が大きい場合、歯髄が除去される。しかし、髄除去後は、歯への栄養の供給が絶たれるため象牙質の脆弱化が起こり、また痛みを伝える神経がないため、再び齲蝕が進行した場合に自覚症状が得られず悪化するという問題がある。従って、歯の健康状態を維持するためにはできるだけ歯髄を保存するのが好ましいと考えられている。歯髄を保存し、その機能を維持するためには、象牙質の破損状態と歯髄の病理学的状態に応じて、間接覆髄によって修復象牙質の形成が期待される。一方、直接覆髄は、歯髄が露出している場合や治療により歯髄の一部を切断した場合に用いられる。直接覆髄剤としては、従来、水酸化カルシウム製剤、Mineral trioxide aggregate (MTA)が用いられている。しかしながら、これらには象牙芽細胞への分化誘導の作用はなく、効率的な象牙質形成促進は得られていない。そのため直接覆髄の適応は、う蝕の範囲が小さく切削除去後に生じる歯髄の露出面が小さい場合に限定されている。また水酸化カルシウム製剤と接する神経は歯髄組織を変性壊死させ、その後の修復機転で象牙質を再生させるため、時間を要し、効率が悪く、予後が不確定であること等の問題点があった。

これまで多くの研究グループが象牙質の再生を試みている。しかし、そこで得られた骨用の石灰化修復物であり、骨様の修復物は石灰化物ではあるものの強度的には不十分であるため、象牙質の再生において、骨様の石灰化修復物の出現を抑え、象牙細管を有する修復象牙質の誘導方法を確立することは急務である。骨形成のマスター遺伝子である *Runx2* は、歯髄において、歯髄の幹細胞の維持には必須であるものの、象牙芽細胞の分化に伴い、その発現は著しく減弱する。さらに遺伝子改変動物を用いて象牙芽細胞に特異的に *Runx2* を強制発現させると、象牙質は形成されずに骨様の粗造な石灰化物が形成される。そのため、*Runx2* は本来、象牙芽細胞への分化と象牙質の形成に抑制的に働くと考えられる。一方、歯髄に様々な刺激が加わると *Runx2* の発現が著しく亢進する。また、骨様修復物を取り巻く細胞には *Runx2* の発現が認められる。そのため、申請者らは、歯髄に露髄などの刺激が加わると *Runx2* の発現が亢進し、その結果、骨への分化機転が働き、骨様修復物が形成されると考えた。そして、骨様の修復物の出現を抑えるために、歯髄で亢進する *Runx2* の働きを抑制する、という発想に至った。

我々はこれまでに、*Wnt* シグナルが象牙芽細胞の分化を亢進する分子過程を明らかにしてきた。象牙質特有の基質の形成には、*Dspp* と *Dmp1* の発現が重要であることは、これらの遺伝子のヌル変異動物の歯の表現形から明らかである。この *Dspp* と *Dmp1* は直接 *Wnt* シグナルに γ によって制御されている。そのため、古典的 *Wnt* シグナルを活性化する塩化リチウムを歯髄細胞に作用させると、*Dspp* と *Dmp1* の発現の亢進し、*in vivo* で象牙質の形成を誘導した。また、組織によっては、*Wnt* シグナルを強く誘導することで、*Runx* シグナル抑制する働きがあることが報告されており、効率的に *Runx2* の働きを抑制するために、*Wnt* シグナルが活性化する細胞環境を整えることで、象牙質再生を試みるという発想に至った。

象牙芽細胞における *Wnt* シグナルは細胞周囲に存在するヘパラン硫酸 (HSPG) の硫酸期の修飾によって影響を受ける。HSPG は 6-O 位に硫酸基があると、HSPG と *Wnt* リガンドの親和性が高く成り、*Wnt* リガンドが受容体に結合することが阻害され、*Wnt* シグナルが減弱する。

我々は、これまでに、過塩素酸ナトリウムが、細胞表面の HSPG の硫酸基の酸化作用を介して歯髄細胞が象牙芽細胞へ分化することを見出したものの、過塩素酸ナトリウム等の塩素酸塩は活性酸素による強い酸化力を有しており、これらの塩素酸塩は酸化反応の制御が難しく、一旦、ラジカル反応が生じると一気に反応がすすむため、効果の維持やその安定的な使用が容易ではない。そのため、臨床応用が困難であった。

最近開発された「要時生成型亜塩素酸イオン水溶液 (MA-T)」は強力な酸化剤であり、要時生成型亜塩素酸イオン水溶液の中に含まれる亜塩素酸イオンが、反応すべき菌やウイルス等が存在する時にのみ、必要な量だけ二酸化塩素の成分を水の中で生成する。その結果、効果が長時間維持され、必要がなくなれば反応が停止するため安全性が高い。しかしながら、MA-T が歯髄細胞から象牙芽細胞に分化誘導すること、さらには象牙質形成促進作用を有することについての報告はない。

そこで、本研究では、この MA-T を用いて、これまでにない、発想に基づく歯髄細胞から象牙芽細胞への分化誘導剤及び分化誘導方法を検討した。

2. 研究の目的

本研究では、“歯髄で *Runx2* の働きを抑制しながら *Wnt* シグナルを活性化させるという新たな発想で、歯髄細胞から象牙芽細胞への優れた分化誘導剤及び分化誘導方法を検討した。特に、これまで課題であった、骨様の修復象牙質ではなく、真の象牙質形成を誘導方法の確立を目的としている。特に、塩素系の酸化剤である MA-T の HSPG の硫酸基に対する作用に着目し、MA-T が糖鎖修飾を介した象牙芽細胞への分化に及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) シングルセル RNA 解析による象牙芽細胞分化に関与する分子機構の探索

NCBI の GEO に収載されているデータセットを用いて、シングルセル RNA 解析によって象牙芽細胞分化における発現プロファイルを改正する。特に、Runx2 の発現が Dspp や Dmp1 を発現する象牙芽細胞においてどのような変動をするのか検討する。また、象牙芽細胞のクラスターにおいて、活性化されるシグナル経路と分子を同定した。

(2) MA-T の安全性について

マウス歯髄細胞である mDPSC 細胞に、各濃度の要時生成型亜硫酸イオン水溶液を添加して培養したときの mDPSC 細胞の細胞毒性を MTT 法によって評価した。

(3) MA-T による細胞表面の HSPG の硫酸基の脱硫酸化について

硫酸化した HSPG を認識する 10E4 抗体をもちいて、MA-T が歯髄細胞表面の HSPG の硫酸化に及ぼす影響を検討した。

(4) MA-T による石灰化形成能の評価と象牙芽細胞分化マーカーの発現

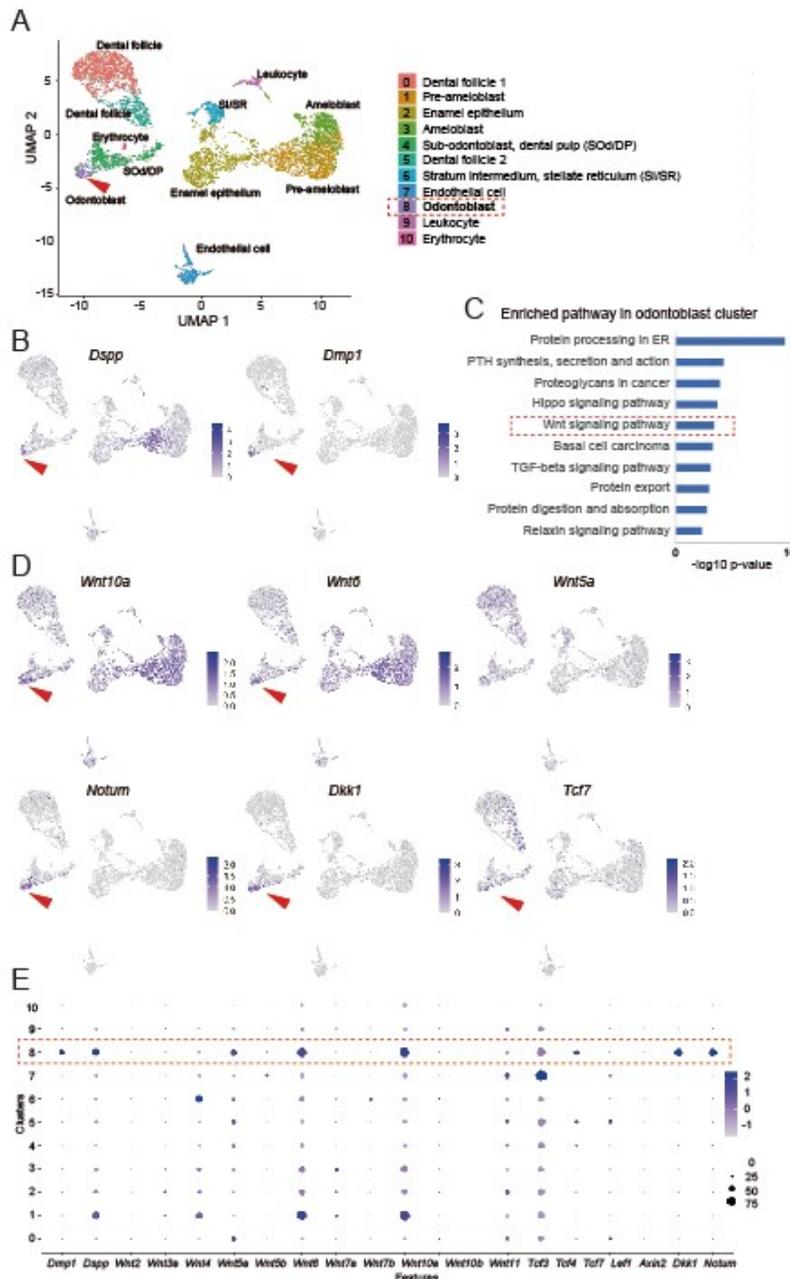
歯髄細胞に、MA-T を添加して培養した際の石灰化を検討した。また、Dspp 及び Dmp1 の発現を検討した。

(5) MA-T による Wnt シグナル関連分子の発現に及ぼす影響

シングルセル RNA 解析により同定された象牙芽細胞特異的に発現する Wnt 関連分子について、MA-T が及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

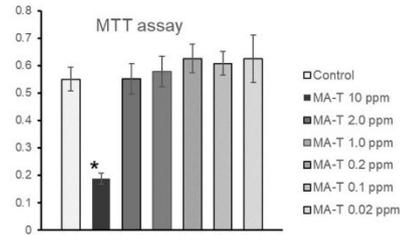
(1) シングルセル RNA 解析



切歯から得られた歯髄およびその周辺の細胞のシングルセル RNAseq で得られた公共のデータセットを再解析した。その結果、*Dspp* や *Dmp1* の発現とオーバーラップするクラスターを特定した。この細胞クラスターにおいては、GO 解析によって、シグナル経路のなかで”Wnt シグナル”が最も高くエンリッチされた。さらに、*Wnt10a*、*Wnt6*、*Notum*、*Dkk1* が Wnt 関連分子として特定された。*Runx2* は歯小嚢をしめすクラスターに発現したものの、象牙芽細胞における発現は低かった。

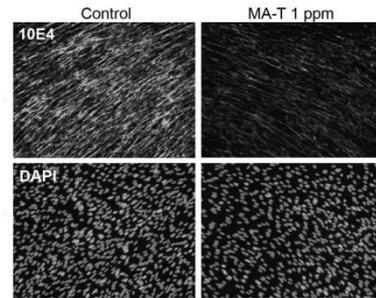
(2) MA-T の細胞毒性について

要時生成型亜塩素酸イオン水溶液は 10 ppm の濃度において生細胞数を減少させた。しかし、2.0 ppm 以下の濃度においては、mDPSC 細胞に細胞毒性は認められなかった。



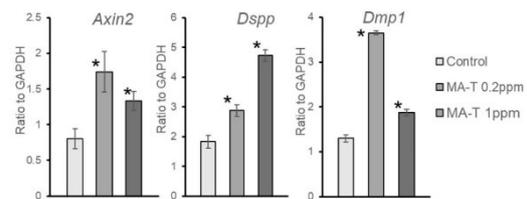
(3) MA-T による HSPG の硫酸基の脱硫酸化について

要時生成型亜塩素酸イオン水溶液群では、1.0 ppm の濃度で mDPSC 細胞表面の HSPG の硫酸基を脱硫酸化した。

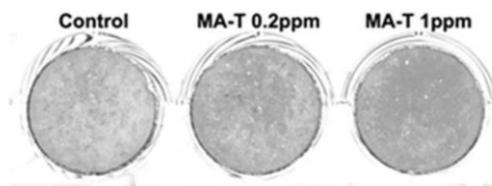


(4) MA-T による石灰化形成能の評価と象牙芽細胞分化マーカーの発現および象牙質形成について

MA-T の添加により、0.2 ppm 及び 1.0 ppm のいずれの濃度においても、添加 3 日後に *Axin2* 及び *Dspp*、添加 6 日後に *Dmp1* の発現の亢進が見られた。これより、MA-T によって象牙芽細胞への分化を誘導することが示された。2) の結果を考慮すると、酸化剤である MA-T は HSPG の硫酸基を除去することで、HSPG と Wnt リガンドとの親和性を変化させ、その結果、Wnt シグナル伝達経路を活性化し、直接的又は間接的に象牙芽細胞への分化を促進したと考えられる。

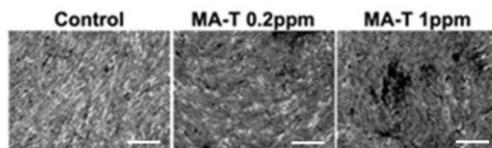


MA-T を作用させると、0.2 ppm 及び 1.0 ppm のいずれの濃度においても hDPSC 細胞の石灰化物の産生が control 群に比べ亢進した。また MA-T は切歯歯胚を用いた *ex vivo* 実験においても、基質の形成を促進させた。



(5) MA-T が象牙芽細胞特異的な Wnt 関連分子の発現に及ぼす影響について

MA-T は Wnt リガンドである *Wnt10a* と *Wnt6*、また Wnt を阻害する *Notum* と *Dkk1* の発現を増大させた。



これらの所見より、要時生成型亜塩素酸イオン水溶液である MA-T は、細胞膜のヘパラン硫酸の糖鎖修飾を介して Wnt シグナルを活性化し、同時に *Runx2* の発現を抑制しながら、象牙芽細胞分化を亢進させることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 歯髄細胞から象牙芽細胞への分化誘導剤及び分化誘導方	発明者 山城隆、犬伏俊博	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-152553	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	黒坂 寛 (Kurosaka Hiroshi) (20509369)	大阪大学・大学院歯学研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	犬伏 俊博 (Inubushi Toshihiro) (30550941)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	
研究分担者	杉山 弘 (Sugiyama Hiroshi) (50183843)	京都大学・理学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	村田 有香 (Murata Yuka) (90755068)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教 (14401)	

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
---------	---------