

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 17日現在

機関番号：15301
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2009～2011
課題番号：21592420
研究課題名（和文） ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた象牙質・エナメル質複合体の再生に関する研究
研究課題名（英文） Study on regeneration of dentin-enamel complex by the bone marrow mesenchymal stem cells
研究代表者
伊澤 俊次（IZAWA SHUNJI）
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20273998

研究成果の概要（和文）：

全ての細胞は適切な賦活因子および組織環境因子（足場，分化因子，培地など）の条件下で，典型的炎症性サイトカインであるTNF α の刺激により，遺伝子発現の第一段階である転写を担う酵素（RNAポリメラーゼII，POLII）が自由な状態から，組織化されたPOLIIになり，これにより再生への有効な転写となる全能性細胞（胚性幹細胞）を経由して，目的の細胞に分化し，目的の組織を再生することができることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Every cell can differentiate into target cell and regenerate target tissue via embryo-stem cell under the condition that RNA polymerase II that takes on first step transcription of gene expression, change from free state to systematized state by TNF α which is typical inflammatory cytokine and appropriate activation factor and organizational environment factor (scaffold, differentiation factor, culture media).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
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：保存修復学

1. 研究開始当初の背景

う蝕などによって失われた歯質（象牙質・エナメル質など）の形態，機能を取り戻すには金属，プラスチック，セラミックなどの人工物では限界があ

り，生物学的再生療法が，理想的な治療法と考えられる．すなわち生体細胞の持つ自然治癒力によって歯質を再生させることが最良の治療法になる．

これまで，ヒト抜去第三大臼歯から抽出

した歯髄間葉系幹細胞を用いた象牙質再生実験は実際に行われており、免疫不全マウスで象牙質様物質の生成の報告がある。しかし、第三大臼歯の抜歯を前提とする再生療法は細胞調達に限界があり、再植、自家移植への利用を考慮すると最善の方法とは言い難い。さらに、象牙質の再生だけでなく、象牙質・エナメル質複合体の再生、ひいては歯の再生まで可能な再生療法が臨床応用の幅が広がり、がさらに有用である。そこで我々は、医科では既に各方面で臨床応用が進んでいる歯髄間葉系幹細胞を用いて、これまでの我々の研究成果を発展させるべく象牙質・エナメル質複合体の再生実験を計画した。

2. 研究の目的

エナメル結節はシグナリングセンターとしての役割担っていると考えられ、エナメル上皮細胞および歯乳頭細胞の分化をコントロールしている。そして Sonic Hedgehog (SHH) は、エナメル結節において産生される代表的なシグナル分子であり、そのレセプターである Patched を介して上皮細胞の分化を制御している。また象牙芽細胞は歯における特徴的な硬組織形成細胞であり、Dentin Sialoprotein は特異的、かつ唯一の象牙芽細胞マーカーであるが、骨芽細胞によって生成される骨細胞にも存在するという文献もある。最近の論文では Lhx6 (Lim homeobox protein 6) が有用な象牙芽細胞マーカーであると述べており、2004 年から開始した象牙芽細胞分化試験ではこの Lhx6 をマーカーとして用い、2006 年、2008 年の IADR 発表時にその有用性を証明した。これらの知見や解析法を手がかりに、歯髄間葉

系幹細胞を用いて歯の発生という複雑な生命現象、分化機序をインビトロにおいてシミュレートさせることによって象牙質・エナメル質複合体の再生実験を計画した。本研究ではまず歯髄間葉系幹細胞を象牙芽細胞に分化させ、象牙質を再生させ、その外側にエナメル質を再生させる象牙質・エナメル質複合体再生実験を行い、この研究期間内に *in vitro* で各種サイトカイン、分化因子、足場を用いヒト歯髄間葉系幹細胞が象牙芽細胞に分化し、長期的には象牙質を形成しその外側にエナメル芽細胞が分化発生し、エナメル質を生成し歯の再生につながる一連の象牙質・エナメル質複合体の再生現象を証明する。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄間葉系幹細胞 (RIKEN BioResource Center) を用い滅菌シャーレ上で CO₂ インキュベーターで培養する。培地には 10% ウシ胎児血清、抗生物質含有の α MEM 培地等を用い、6-8 代継代した細胞を実験に供する。

(2) 各種サイトカインによる刺激による象牙芽細胞・象牙質再生/エナメル芽細胞分化実験

Tumor necrosis factor- α , IL- β 1, Noggin, ソニックヘッジホッグ, Chordin, CTGF/CCN2, アメロジェニンなども考慮し、象牙芽細胞分化/象牙質生成・エナメル芽細胞分化/エナメル質生成における関連レセプターの活性化とそれに続く SMAD シグナリングも視野に入れた実験系を構築する。各時間刺激後、細胞を回収し、免疫染色による関連抗原の検出と、Thermal Cycler Dice を用いたリアルタイム PCR 法により標的マーカーの分子生物学的解析を行う。石灰化誘導因子あるいは象牙芽細胞・エナメル芽細胞の mRNA レベルでの

発現の解析は, type 1 collagen, alkaline phosphatase, BMP-2, osteonectin, osteopontin, osteocalcin, dentin sialoprotein, Lhx6, amelogenin に対するプライマーを用いる. また, 並行して骨髄間葉系幹細胞の分化形態を生物顕微鏡で観察し, 象牙芽細胞・エナメル芽細胞に特徴的な像が見られるどうか確認し, 分化に有効な因子の発見に努める.

(3) マイクロアレー法による関連遺伝子の検索および絞り込み実験と, 主要関連遺伝子の Real Time PCR 実験:

象牙芽細胞/エナメル芽細胞関連 m-RNA (Lhx6, アメロジェニンなど) の発現の検索と確認

① 関連遺伝子のプライマーの設計

② PCR 条件の最適化

③ Total RNA の抽出: Chomczynski の改変法で行う. 高速冷却遠心機およびマイクロアレー法による関連遺伝子の検索(一次スクリーニング実験).

④ RNA 試料から混入 DNA の除去.

⑤ リアルタイム RT-PCR: 得られた精製 RNA について逆転写反応を行い, 蛍光標識した標的プライマーを用いて逆転写産物の定量 PCR を Thermal Cycler Dice Real Time System 用いて行う.

⑥ PCR 産物の確認, 定量解析: Thermal Cycler Dice Real Time System を用いて遺伝子発現分析・定量解析を行う.

(4) 免疫染色実験:

象牙質, エナメル質関連タンパク質 {オステオカルシン, アメロジェニンなど} の発現, 局在を調べるために, 各種抗体を用いて免疫染色を行う.

① ウェルマイクロプレート内に各々カバーグラスを入れ, その上で細胞を培養する.

② カバーグラスごと細胞を取り出し, PBS で

洗浄後, 4%パラホルムアルデヒドで 10 から 15 分間固定する.

③ 1%Triton-X/0.1M リン酸緩衝液で 10 から 15 分間処理する.

④ 【ブロッッキング, 一次抗体反応】

1%BSA/PBS で室温で, 湿箱内で 30 分ブロッッキングを行う. 各種象牙質/エナメル質関連発現タンパク質に対する一次抗体を用い, 適切な希釈濃度で湿箱内で至適温度, 至適時間で反応させる.

⑤ 【二次抗体反応】 PBS で洗浄後, 至適濃度に希釈した Alexa Fluor 488, 568 (Invitrogen) などの蛍光標識抗体と, 湿箱内で 20 分/室温で反応させる.

(6) 【封入】 水溶性封入材 (VECTASHILED, DAPI 入り Vector 社) で封入する.

象牙芽細胞, エナメル芽細胞 (Cells, 細胞) 増殖因子 (Signal Molecules, シグナル分子), 足場 (Scaffold/Malrix)

の 3 要素を用いた, すなわち組織再生の Triad による象牙質・エナメル質複合体生成/再生実験を行う.

開発を行う.

4. 研究成果

今回の一連の研究により下記の 3 項目を明らかにした.

(1) TNF α とエムドゲインゲル (アメロジェニンを主成分) を用いて, 骨髄間葉系幹細胞から象牙芽細胞が誘導され, 象牙質様物質が生成されることを証明により骨髄間葉系幹細胞の多能性の証明した.

象牙芽細胞あるいは象牙質に関連したmRNA 発現の経時的変化

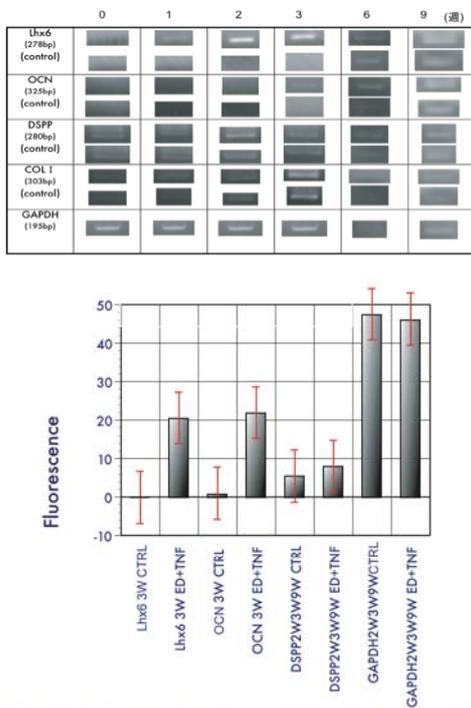


Fig.2. mRNA Expression after administration of Emd-Gel and TNF alpha

【結果および考察】

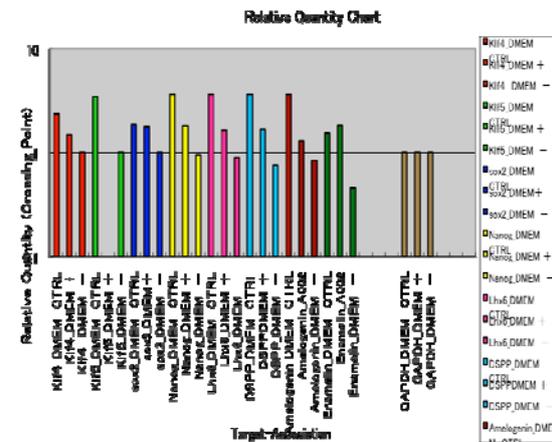
オステオカルシン, L h x 6 の m-R N A が経時的に増加した. これまでの研究結果を総合した結果, ヒト骨髄間葉系幹細胞からエムドゲインゲルと TNF alpha によって誘導された象牙芽細胞は, コラーゲンゲルなど適切なスキャホールドを用いることによって象牙質の生成を促進する可能性が示唆された.

う蝕や窩洞形成などの外因性刺激により免疫応答の一環として炎症性サイトカインが歯髄リンパ球から放出され修復象牙質が形成されるが, この時歯髄幹細胞が象牙芽細胞に分化すると考えられている. すなわち, 歯髄内の TNF alpha などの特定の炎症性サイトカインやアモロジェニンなどの分化因子が, 歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化および修復象牙質の形成に働くという仮説の下に

本研究を行った. Liechty 等によると, 移植した骨髄幹細胞は軟骨細胞, 脂肪細胞など移植部位に特異的組織あるいは臓器の細胞に分化する.

本研究では, その証拠にもとづいて, 適切な分化因子, 足場を用いて歯髄様環境を再現できれば, 骨髄幹細胞は象牙芽細胞に分化し象牙質を生成すると考えた. その結果, 象牙芽細胞分化および象牙質生成が促進されたが, これはヒト歯髄幹細胞よりも調達が容易なヒト骨髄幹細胞を用いて象牙質の再生, ひいては象牙質エナメル質複合体の再生が可能となり, 将来有用な臨床応用技術となることが示唆された.

(2) ヒト骨髄間葉系幹細胞の多能性(全能性)は分化が進んでも保たれることを証明し, 失われた組織の再生には全能性賦活因子の重要性を示唆した.



潜在的な多能性保持の証明実験

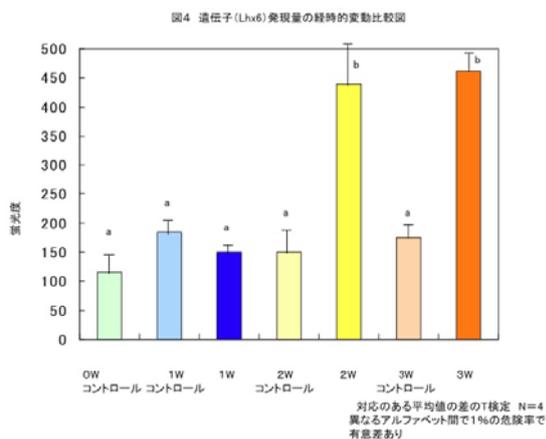
【結果および考察】 全能性試験群と分化細胞群では, Klf4 の発現に差異を認めた. また分化因子投与後 3 週では BG1a (OCN) の発現が DMEM-で少ないことがわかった. Klf4 について 3 週経過での群間で発現差が, 6 週経過では逆の差を認めた. 解離曲線の分析によって各プライマーの適正性を検討し, 各遺伝子の発現を経

時的に比較分析を行った結果, 分化細胞において Klf4 の発現が減少する傾向が認められたものの, 全般的に全能性細胞群と分化細胞群では遺伝子発現の明らかな差は認めなかった。

これにより, ヒト骨髄間葉系幹細胞は培地や分化因子によって多少の差は認められるものの, 基本的な全能性は分化が進んでも保たれることが示唆された。

多能性保持培地群 (REPROマイナス群: REPRO培地に分化因子を加えない群と) と分化試験用培地群 (DMEMプラス群: DMEM培地に分化因子を加えた群と) を比較した結果, 全能性マーカー遺伝子の有意な発現差は認めなかったがこれは, TNF α の作用で多能性遺伝子は発現し適切な分化因子により組織特異的な遺伝子がファクトリー仮説により, 有効になり再生が開始すると考えることができる。

(3) TNF α が全能性賦活因子であることを示唆。



【結果】

TNF α (+) 群では, Lhx6 の著明な経時的発現量増加を認めたが, TNF α (-) 群では認めなかった。

【考察および結論】

TNF α (+) 群では, Lhx6 の経時的発現

量増加を認めたが, TNF α (-) 群では増加を認めなかった。これより, ヒト骨髄間葉系幹細胞が多様な組織に分化するためには, 全能性賦活因子としての TNF α が必要であることが示唆された。

今回の研究結果から, 幹細胞に限らず全ての細胞はTNF α により潜在的全能性を賦活され, 環境条件を満たせば胚性幹細胞に誘導できる可能性が示唆された。

文献によると, 皮膚細胞や粘膜細胞などの分化組織細胞から全能性細胞(ips細胞)が誘導できることがわかっている。京都大学の山中伸弥教授は皮膚細胞に3つの転写因子(Oct3/4, sox2, Klf4)を導入してips細胞を誘導しているが, 今回の実験でも分化細胞においてもsox2, Klf4の発現を認めた。マウスの皮膚の細胞から直接, 神経細胞を作り出すことに, 米スタンフォード大の研究チームが成功している。これら事実は, 分化している体細胞にも潜在的万能性があること。さらに組織が万能細胞によって分化再生するにはある程度の万能細胞数が必要であること。さらに万能細胞を増殖させるための特殊な環境(培地, 足場)が必要なことを示している。

今回の結果から, ヒト骨髄間葉系幹細胞は培地や分化因子によって多少の差は認められるものの, 基本的な全能性は分化が進んでも保たれることが示唆された。そして, 失われた組織の再生には全能性を賦活させるための因子(細胞, 転写因子, 足場, 培地)が改めて重要であることがわかった。現在行っているヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた象牙質エナメル質複合体の生成にもin vitro実験と併行して組織環境をシミュレートした

in vivo 実験も必要であると思われる。現在 ips 細胞による再生療法研究が盛んであるが、ips 細胞はあくまでも人工的に作成した万能細胞であるので薬剤開発には有用であるが、生体組織の再生には、がん化や短命化などの限界がある。本研究で示唆された生体固有の全能性賦活因子による全能性細胞の誘導の可能性は、がん化や短命化などの危険のない画期的および理想的な再生治療へつながる世界的研究成果につながる。

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 1 件)

①伊澤俊次, 山路公造, 星加知宏, 中田 貴, 神農泰生, 西谷佳浩, 吉山昌宏
ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた象牙芽細胞分化と象牙質再生. 再生歯誌, 査読有り
7(1), 47-55, 2009.

[学会発表] (計 3 件)

- ①伊澤俊次, 山路公造, 星加知宏, 西谷佳浩, 吉山昌宏
ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた象牙質・エナメル質複合体の再生に関する研究
全能性賦活因子の探索
第9回日本再生歯科医学会, P56, 2011/9/10, 大阪, ポスター
- ②伊澤俊次, 山路公造, 星加知宏, 中田 貴, 神農泰生, 西谷佳浩, 吉山昌宏
ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた象牙質・エナメル質複合体の再生に関する研究
全能性の同定のための遺伝子発現比較分析
第8回日本再生歯科医学会, P52, 2010/10/30, 愛知, ポスター
- ③伊澤俊次, 山路公造, 星加知宏, 中田 貴, 神農泰生, 西谷佳浩, 吉山昌宏
ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた象牙質再生に関する研究

ーリアルタイムRT-PCR法による遺伝子発現解析ー

第7回日本再生歯科医学会学術大会・総会,
2009/9/11-12, 北九州, ポスター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊澤 俊次 (IZAWA SHUNJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20273998

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

吉山 昌宏 (YOSHIYAMA MASAHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 10201071

西谷 佳浩 (NISHITANI YOSHIHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 60325123

山路 公造 (YAMAJI KOZO)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号: 30374531