

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10162

研究課題名(和文) 超遠心法による分画抽出血清のプロテオーム解析を利用した新規硬組織形成誘導法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method for inducing hard tissue formation using proteome analysis of the fraction of serum extracted by the ultracentrifugation

研究代表者

上田 公子(山口公子)(UEDA, Kimiko)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：40335807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：超遠心法により得られたウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum：FBS)分画とその成分に注目し、硬組織形成細胞への効果について検討したところ、第1層は分化を促進し、第3層は増殖を促進する所見を得た。そこでプロテオーム解析を行い、コントロールと比較して各分画に特徴的なタンパク質を確認した。その結果からいくつかの分子について検討したところ、歯原性間葉細胞の分化を促進する因子としてFam3Cの関与が示唆された。そのメカニズムとしてWntシグナルの関与について検討中である。今後はさらにメカニズムの解明をすすめ、その応用として象牙質再生または骨再生の新規治療方法の開発に繋がる研究を目指したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の形成には、永久歯ではおよそ10年から15年と、長い期間を必要とする。今日の歯に関する研究の進歩にも関わらず、歯の再生技術の実用化が難しい原因の一つに、歯の形成には長期の時間がかかることが考えられる。すなわち、硬組織の形成を促進する因子やその詳細な機構については不明な点が多い。そこでFBSに含まれる硬組織形成促進因子が同定され、その機構が明らかになれば、硬組織形成細胞の増殖・分化の促進が可能となる。特に、これまで長い時間を要した石灰化についての研究で、今後の同研究を期間短縮という点で大きく後押しし、これまで不明だった様々な分子メカニズムの解明に大きく貢献できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the fraction and its components of the fetal bovine serum (FBS) extracted by ultracentrifugation, the effect on hard tissue formation cells was examined. As a result, the first fraction promoted differentiation and the third fraction promoted proliferation. Therefore, proteomic analysis was performed, and the characteristic proteins of each fraction were confirmed in comparison with the controls. From the results, we focused on several molecules and examined about them. It was suggested that Fam3C is one of a factor that promotes the differentiation of odontogenic mesenchymal cells. The involvement of Wnt signaling as a mechanism is under investigation. In the future, we would like to further elucidate the mechanism and apply this research to the development of new treatment methods for dentin regeneration or bone regeneration.

研究分野：小児歯科学

キーワード：硬組織形成 ウシ胎児血清 超遠心法 歯原性間葉細胞 細胞分化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は先行する研究で、超遠心したウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: 以下 FBS) 上清の最上層にある分画が硬組織形成細胞の分化を極めて劇的に促進する所見を得た。

超遠心法により得られた FBS 各分画の効果については、最も上方の第 1 層を使用するとウシ受精卵の成熟が遅れ、下層の第 3 層を使用すると成熟が促進される<sup>1)</sup>と報告されている。しかし、成熟の促進に関与する成分は明らかにされていない。

そこで我々は、各分画に特徴的な分子の検索を行うためプロテオーム解析を行い、硬組織形成細胞の分化誘導能力が非常に高い最上層に特徴的に存在する分子の中から、骨の分化に関与するとの報告がある Fam3C とその他いくつかの分子に注目した。これらの分子について歯原性細胞への影響を調べた研究はない。

### 2. 研究の目的

プロテオーム解析により得られた Fam3C とその他いくつかの分子に注目し、硬組織形成細胞 (象牙芽細胞、エナメル芽細胞) への影響を検討するとともにそのメカニズムの解明を行い、その応用として象牙質再生または骨再生の新規治療方法の開発に繋がる研究を目指し実践したい。

### 3. 研究の方法

これまで使用していた FBS から、FBS の Lot が変更となり、硬組織形成細胞の分化に対する、超遠心法により得られた FBS 分画についての、Lot 変更の影響を検討する必要が生じたため、硬組織形成細胞の増殖、分化に対する、超遠心法により得られた FBS 各分画の影響を検討することから研究を開始した。

#### (1) FBS 分画の抽出

FBS は超遠心分離機 (himac CP80WX、HITACHI) にて 100,000g×18 時間超遠心し、3 層に分かれた分画をそれぞれ回収し、最上方を第 1 層、中間層を第 2 層、最下層を第 3 層 (図 1) として使用した。

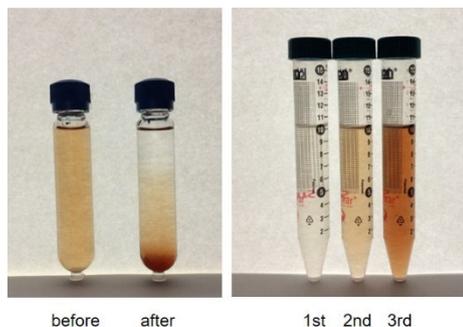


図 1 超遠心前後の FBS

#### (2) 細胞

硬組織形成細胞は歯原性間葉細胞株として mDP 細胞、歯原性上皮細胞株として HAT-7 細胞を用いた。

各細胞とも、培地には DMEM/F-12 を使用し、10% (または各実験の条件での濃度の) FBS を使用して、37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。

#### (3) 増殖試験

各分画を 10% 含む培地にて歯原性上皮細胞の培養を行い、増殖試験として細胞カウントと BrdU 免疫組織染色を行った。次に各分画を 10% 含む培地にて歯原性間葉細胞の培養を行い、増殖試験として細胞カウントを行った。

#### (4) 分化の検討

歯原性上皮細胞の分化について検討するため Ameloblastin を用いて、免疫染色を行った。次に、歯原性間葉細胞について、分化について検討するためアリザリンレッド染色を行った。

#### (5) FBS 各分画のタンパク成分の検索

硬組織形成細胞の増殖や分化を促進する分子の同定を行うため、FBS 各分画のタンパク成分の検索を行い、FBS 各分画間での蛋白成分の差を確認するために、FBS の超遠心により得られた各分画と超遠心前のコントロールの FBS についてプロテオーム解析を行い、コントロールに比較して、各分画に特徴的なタンパク質の解析を行った。

#### (6) RT-PCR

分化誘導培地にて歯原性間葉細胞の培養を行い、Fam3C と Myocilin の発現について RT-PCR にて確認した。また、分化誘導培地にて歯原性間葉細胞の培養を同様に行い、細胞の分化を示す遺伝子である Panx3 と Dspp の発現について RT-PCR にて確認した。

#### (7) Real-time PCR

歯原性間葉細胞を使用し、分化誘導培地へ Fam3C タンパクを添加して分化誘導し、mRNA を回収して、初期の分化を示す分子である Panx3 の発現を real time PCR にて確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) 硬組織形成細胞に対する、超遠心法により得られた FBS 分画の影響の検討

硬組織形成細胞の増殖、分化に対する、超遠心法により得られた FBS 分画の影響を検討したところ以下の結果を得た。

#### ① 増殖試験

歯原性上皮細胞の増殖試験について、細胞数のカウントでは、コントロールと比較して、第1層の使用で、細胞の増殖は有意に抑制され、第2層と第3層の使用で細胞の増殖が有意に促進された。BrdU 陽性細胞率では、コントロールと比較して、第1層の使用で有意に減少し、第3層の使用で有意に増加した。

次に歯原性間葉細胞を用いて、増殖試験を行ったところ、細胞カウントの結果、コントロールと比較して、第1層の使用で、細胞増殖は抑制され、第3層の使用で細胞増殖が促進される傾向を認めた。

これらの結果より、超遠心法により得られた FBS 分画抽出液により、歯原性上皮細胞の細胞増殖は、第1層で抑制され、第3層で促進された。

#### ② 分化の検討

歯原性上皮細胞の分化についての検討では、Ameloblastin を用いて免疫染色を行ったところ、その発現範囲が、第2層と第3層の使用で、コントロールと比較して有意に狭かった。この結果より、超遠心法により得られた FBS 分画抽出液により、歯原性上皮細胞について、第2層と第3層では細胞分化が抑制された。

次に、歯原性間葉細胞を用いて、分化について検討するため各分画の FBS を 10% 含む石灰化誘導培地にて培養した細胞を使用しアリザリンレッド染色を行ったところ、第1層の使用で、細胞が極端に増えず、石灰化の傾向は、はっきりとは認められなかった。そこで、最も効果的な第1層の使用量を確認することにし、第1層を 1%、3%、5%、10% 含む培地を使用し、同様の実験を行った。結果は第1層を 5% 含む培地の使用で通常より早い時期に石灰化が開始する傾向を確認できた。

これらの結果から、超遠心法により得られた FBS 分画は硬組織形成細胞の増殖や分化に影響を与えることが示唆された。

### (2) 硬組織形成細胞の増殖や分化を促進する分子の同定

#### ① 超遠心法により得られた FBS 各分画のタンパク成分の検索

変更した Lot の FBS についても、超遠心法により得られた各分画のタンパク成分の検索を行い、各分画間での蛋白成分の差を確認するため、FBS の超遠心により得られた各分画と超遠心前のコントロールの FBS についてプロテオーム解析を行い、コントロールと比較して、各分画に特徴的なタンパク質の解析を行った。その結果、歯原性上皮細胞や歯原性間葉細胞の分化を促進する所見のみられる第1層に、骨や軟骨等の硬組織について、分化への関与が報告されている Fam3C と Myocilin が特徴的に発現していることが確認できた。

その結果から、硬組織形成を促進するメカニズムの解明のため、まず Fam3C と Myocilin に注目した。

#### ② RT-PCR

通常の FBS10% 使用をコントロール、通常の FBS5%、通常の FBS5% に各分画 5% を加えた 10% FBS の 5 群について、分化誘導培地にて歯原性間葉細胞の培養を行い、mRNA を回収して、Fam3C と Myocilin、初期の分化を示す分子である Panx3、分化を示す分子である Dspp について、RT-PCR にて発現を確認した。結果、第1層を 5% 添加した培地の使用で、早期に Fam3C の発現を認め、続いて、Panx3、Dspp と順に発現する傾向を確認できた。Myocilin の発現は Fam3C より遅く、発現量もわずかだった。

#### ③ Real-time PCR とアリザリンレッド染色

Fam3C の添加濃度や培養期間による、硬組織形成細胞の分化への影響を検討するため、歯原性間葉細胞を使用し、分化誘導培地へ Fam3C タンパクを添加して分化誘導し、mRNA を回収して、初期の分化を示す分子である Panx3 の発現を Real-time PCR にて確認した。結果は十分に安定しなかったが、培地へ 1ng/ml または 30ng/ml の Fam3C タンパクを添加した際に、コントロールと比較して、Panx3 が上昇する傾向を認めた。

そこで、歯原性間葉細胞について、Fam3C タンパクの分化誘導培地への添加濃度が石灰化へおよぼす影響を確認するため、1ng/ml または 30ng/ml の Fam3C タンパクを添加した分化誘導培地にて分化誘導し、アリザリンレッド染色にて確認した。結果は安定しなかったが、1ng/ml または 30ng/ml の Fam3C タンパクの添加で、コントロールと比較して、石灰化が促進される傾向を認め、Fam3C を 1ng/ml 添加したときの方が、石灰化を促進する傾向をやや強く認めた。そのメカニズムとして Wnt シグナルの関与について検討中である。

### (3) まとめ

以上の結果から、歯原性間葉細胞の分化を促進する因子として Fam3C の関与が示唆された。そのメカニズムとして Wnt シグナルの関与について検討中である。今後はさらにメカニズムの解明をすすめ、その応用として象牙質再生または骨再生の新規治療方法の開発に繋がる研究を目指し、実践したい。

歯の発生は胎生期に始まり、歯冠の形態形成、石灰化を経て歯根の形成と完成にいたるまで、永久歯ではおよそ 10 年から 15 年の年月を要する。このように歯の形成には、長い期間を必要と

する。今日の歯に関する研究の進歩にも関わらず、歯の再生技術の実用化が難しい原因の一つに、歯の形成には長期の時間がかかることが考えられる。すなわち、硬組織の形成を促進する因子やその詳細な機構については不明な点が多い。そこで FBS に含まれる硬組織形成促進因子が同定され、その機構が明らかになれば、硬組織形成細胞の増殖・分化の促進が可能となる。特に、これまで長い時間を要した石灰化についての研究で、今後の同研究を期間短縮という点で大きく後押しし、これまで不明だった様々な分子メカニズムの解明に大きく貢献できると考えられた。

<引用文献>

① Momozawa K, Fukuda Y, Effects of Fractions of Bovine Follicular Fluid and Fetal Bovine Serum as Supplements to Maturation Medium on In Vitro Development of In Vitro Fertilized Bovine Embryos, J Mamm Ova Res, 28, 2011, 68-74

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

〔産業財産権〕

〔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	岩本 勉  (IWAMOTO Tsutomu)  (90346916)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授   (12602)	
研究分担者	北村 尚正  (KITAMURA Takamasa)  (50614020)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教   (16101)	
研究分担者	赤澤 友基  (AKAZAWA Yuki)  (10646152)	徳島大学・病院・助教   (16101)	

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