

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861600

研究課題名(和文)象牙芽細胞分離培養法の樹立と象牙細管形成機構解明

研究課題名(英文) Establishment of the isolation method of odontoblasts and clarification of the mechanism of the dentinal tube formation.

研究代表者

中島 和慶 (NAKAJIMA, Kazunori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：40707246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：象牙質はエナメル質の内側にある硬組織で、象牙芽細胞によって外来刺激に応じて一生の間添加されます。象牙芽細胞はこれまで単離培養されたという報告はなく、そのため生物学的な特徴はよくわかっていません。本研究では、象牙芽細胞に特異的に発現する分子を標的として歯髄組織から象牙芽細胞の単離を試みました。その結果、象牙芽細胞は単離できましたが、長期的な維持にはさらなる条件の検討が必要であることがわかりました。象牙芽細胞の単離により象牙質形成機序が明らかとなれば、大きな虫歯から歯髄を守る薬の開発へと繋がる可能性があり、本研究は歯科医療に大きく貢献するものと思われれます。

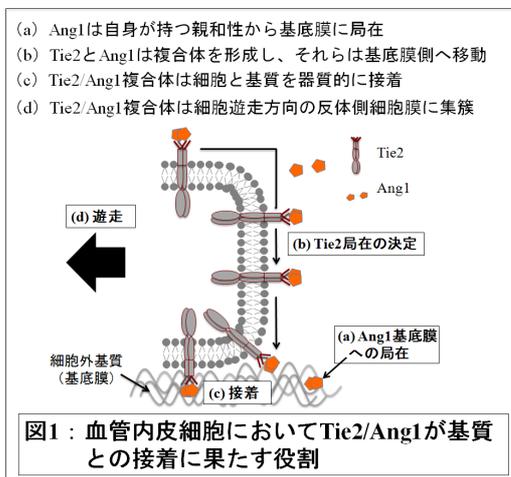
研究成果の概要(英文)：Dentin is located inside of enamel and added by foreign stimulation throughout our life by odontoblasts. Because odontoblasts have not been isolated so far, their biological features were not known well. The aim of this study was to isolate odontoblasts from pulp tissues by targeting the specific molecule expressed by odontoblasts. As a results, odontoblasts were isolated, however, it was suggested that their long-time culture required additional certain factors to maintain their biological features. This findings may contribute to the development of the researchs of odontoblasts cell biology.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：象牙芽細胞 Tie2

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞が発現するチロシンキナーゼ型受容体 Tie2 と血管支持細胞が分泌するリガンド Ang1 は、パラクラインな機序で血管新生や安定化に寄与し、両分子欠損マウスは胎生致死であることから、シグナル伝達が極めて重要である¹⁻³⁾。また Tie2/Ang1 には、上記機能の他、図1に示すような細胞と基質間の接着および遊走機構が明らかにされているが⁴⁻⁶⁾、歯牙における Tie2/Ang1 の局在は国内外で全く報告されておらず、ましてや機能的意義などは全くの不明である。



そこで申請者は、Tie2/Ang1 が歯牙組織でも発現するのではないかと考え、マウス臼歯歯胚から成熟歯牙への発生過程を観察し、以下の3点を明らかにした。

- 1) 象牙芽細胞の Tie2/Ang1 発現は胎生18日目から開始し、完成歯牙象牙芽細胞でも維持する。
- 2) Tie2/Ang1 の局在は、象牙芽細胞マーカーとして知られる Nestin と一致する。
- 3) Tie2は骨芽細胞とセメント芽細胞は発現しない。

これは象牙芽細胞が硬組織中で唯一 Tie2/Ang1 陽性細胞であることを意味する事から、申請者は、両分子が骨組織やセメント質にはない象牙質特有の細管構

造(象牙細管)の形成に寄与しているのではないかと考えた。すなわち、象牙突起が象牙細管内に保持される為には象牙突起と象牙基質間に何らかの接着機構が存在する必要があると予想し、さらに図1に示す血管内皮細胞での Tie2/Ang1 の機能を鑑み、「象牙細管形成には Tie2/Ang1 が関与する」という仮説を考案した。具体的には以下の3点である。

- 1) 象牙芽細胞が分泌する Ang1 は象牙基質に局在する。
- 2) 象牙芽細胞細胞膜に表出した Tie2 は Ang1 と複合体を形成し、象牙突起を象牙基質に器質的に接着させる。
- 3) Tie2/Ang1 複合体は細胞遊走方向後縁に集簇し、象牙芽細胞は歯髓側へ遊走する。

以上が本研究の着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

- 1) Tie2 を標的として象牙芽細胞の分離培養が可能である事を明らかにする。
- 2) 象牙芽細胞における Tie2/Ang1 の機能的役割(象牙細管形成機構)を明らかにする。

3. 研究の方法

[当初の研究計画]

歯髓細胞の抽出

象牙芽細胞の分離培養

播種した歯髓細胞には種々の細胞が混在しており、抗 Tie2 抗体を用いて細胞分離を行う。

4. 研究成果

[初年度の成果]

申請者は以下の手法により生後1日目マウスの歯髄細胞より象牙芽細胞の分離培養を試みた。その結果、歯髄細胞をTie2陽性と陰性の2つの分画に分離する事に成功した。さらに、Tie2陽性分画はTie2陰性分画と比較して象牙芽細胞マーカーであるDSPP (dentin sialo phosphoprotein) の発現量が約70倍高かった。

- 1) 実体顕微鏡を使用し、18G 注射針を用い臼歯歯胚から歯髄組織を掻き出し、0.05% Trypsin と 1.5U/ml コラゲナーゼ I で 30 分間処理する。
- 2) 細胞懸濁液を抗Tie2抗体で標識し、細胞分離を行う。

[次年度の成果]

初年度に象牙芽細胞マーカーの発現量が高い細胞集団を単離できた一方で、この細胞集団は培養すると培養前後で形質が変化し、DSPP の発現は有意に減少することが分かった。このことから、今回使用した抗体で単離した細胞の大部分は形質の維持のため特殊な培養条件が必要であると考え、別の分子を標的とすることでより培養に適した細胞のみを単離することができないかと考えた。

そこでまず、別の標的分子を模索するにあたり初年度に単離した細胞集団の遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、特に integrin α v (CD51)の発現が特に高いことが分かった。CD51 は fibronectin などの細胞外マトリクスのレセプターとして働くことが知られており、象牙芽細

胞でも接着分子として機能することが報告されていることから、磁気ビーズ付き CD51 抗体を使用して歯髄細胞の分離を行ったところ、CD51 陽性分画と CD51 陰性分画に分離することができた。しかし、得られた二つの細胞集団について real-time PCR を行い象牙芽細胞関連遺伝子の発現量を検索したところ、CD51(+)細胞集団は CD51(-)細胞集団に比べ Osteocalcin、Nestin、Dmp-1 などの発現量が有意に少なかった。すなわち、本研究で使用した CD51 抗体が細胞に存在する CD51 のエピトープを認識できず、CD51 陽性分画として象牙芽細胞が分離されなかったと考えられた。象牙芽細胞はその細胞突起を硬組織に伸張するという特徴的な形態ゆえに、歯冠から歯髄組織を機械的に剥離する時点で象牙芽細胞細胞膜の損傷が起こり、その結果抗体が認識するエピトープの構造が変化したことが原因である可能性が高いと考えられた。

以上に述べた結果から、歯牙からの象牙芽細胞単離とその培養については、

- 1) Tie2 を標的として単離は可能であるが、それらは培養により形質を失う。
- 2) 歯冠と歯髄の剥離には機械的な要素が含まれるため、Tie2 や CD51 のような細胞接着分子ではなく、細胞接着に関与しない他の分子を標的とするアプローチが有効なこ

とが考えられる。

との結論を得た。

< 参考論文 >

1. Brindle N et al. *Circ. Res.* 2006.
2. Fiedler U et al. *Trends Immunol.* 2006.
3. Saharinen P et al. *J Cell Bio.* 2005.
4. Fukuhara S et al. *Nat Cell Biol.* 2009.
5. Fukuhara S et al. *Exp Mol Med.* 2009.
6. Pipsa S et al. *Nat Cell Biol.* 2009.

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. 中島和慶，柴田恭明，菱川善隆，小路武彦，澤瀬隆，池田通：Tie2/Ang1 はマウス発生期ならびに成熟歯牙象牙芽細胞に発現する。日本組織細胞化学会
平成 26 年 9 月 27～28 日
松本市中央公民館(長野県・松本市)
2. 中島和慶，柴田恭明，菱川善隆，小路武彦，澤瀬隆，池田通：Tie2/Ang1 はマウス発生期ならびに成熟歯牙象牙芽細胞に発現する。日本歯科医学会総会
平成 28 年 10 月 21～23 日(予定)
福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中島 和慶 (NAKAJIMA Kazunori)

長崎大学医歯薬学総合研究科 (歯学系) ・助教

研究者番号 : 40707246