

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861790

研究課題名(和文) 歯髄細胞による組織修復・恒常性維持における細胞間ネットワーク機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of intercellular network mechanism in tissue repair and homeostatic maintenance by dental pulp cells

研究代表者

赤澤 友基 (AKAZAWA, Yuki)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：10646152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄にはう蝕や外傷などの様々な外的刺激に対して、象牙質を形成し、自己修復を行う能力がある。歯髄の恒常性維持や再生には、様々な細胞が関与し、間葉系幹細胞や血管内皮細胞の誘導機構が関与していると考えられている。われわれが注目した分子stromal cell derived factor 1 (SDF-1)は、間葉系幹細胞や血管内皮前駆細胞に作用することが知られている。今回の研究で我々はSDF-1がFGF-2やTGF- β 、ALK5などの分子を介した細胞間のシグナル伝達を用いて歯髄の修復や恒常性の維持に関与している可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dental pulp has the ability to form dentin and self-repair against various external stimuli such as dental caries and trauma. Various cells are involved in maintaining and regenerating the homeostasis of the pulp, and it is thought that the induction mechanism of mesenchymal stem cells and vascular endothelial cells is involved. Molecular stromal cell derived factor 1 (SDF-1) which we have noted is known to act on mesenchymal stem cells and vascular endothelial precursor cells. In this study, we clarified the possibility that SDF-1 is involved in pulp repair and maintenance of homeostasis using intercellular signal transduction through molecules such as FGF-2, TGF- β , ALK 5.

研究分野：小児歯科

キーワード：乳歯 歯髄細胞

1. 研究開始当初の背景

永久歯の萌出によって自然脱離し廃棄される乳歯の歯髄には間葉系幹細胞が存在し、in vivo では神経細胞のマーカーを発現することが示されている。また in vitro においても骨様組織、象牙質を形成することが知られている(Miura, et al., PNAS 2003)。これらの報告が引金となり、歯由来の歯髄・歯根膜細胞に含まれる間葉系幹細胞による再生医療への応用に関心が高まった。しかし歯由来の間葉系幹細胞から各種細胞への分化制御機構については詳しく知られていない。

申請者の研究グループでは、乳歯の歯根膜において stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) の高発現を認めた。SDF-1 は、その受容体である CXCR4 を発現する間葉系幹細胞や血管内皮前駆細胞の遊走を誘導する。このことから SDF-1 により幹細胞の遊走誘導をコントロールされ、局所の再生・修復だけでなく恒常性維持に関与させている可能性が考えられた。すなわち遠隔地の幹細胞を引き寄せ、細胞間で各種成熟細胞への分化誘導を行い、再生に関与させている可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究計画では我々が樹立中の不死化ヒト歯髄細胞株を使用して、組織修復機構および恒常性維持機構の解析を行う。さらに歯髄細胞単独ではなく、局所への幹細胞遊走誘導機構およびこれによる分化調節・修復機構の解析を行う。

今までの多くの報告では、歯髄細胞に含まれる間葉系幹細胞による分化誘導能の報告や、in vivo における同所性の修復の報告がされてきた。しかし歯髄細胞において発現している mRNA の発現プロファイルを行うと SDF-1 の高発現が認められた。このことから SDF-1 のレセプターである CXCR4 を発現する間葉系幹細胞や血管内皮前駆細胞の遊走を誘導し、局所

の再生に関与させている可能性が考えられた。以上のことから本研究計画の目的は (1) 不死化ヒト歯髄細胞株の完成、(2) この株化細胞からの各種細胞への分化誘導、(3) 再生および恒常性維持における、歯髄由来幹細胞と各種幹細胞との細胞間ネットワークの解明である。

3. 研究の方法

(1) 歯髄細胞株の樹立および分化誘導能の解析

徳島大学病院小児歯科外来で治療のために抜歯された乳歯より分離した歯髄細胞から、不死化細胞株の樹立を行う。この細胞株は骨芽細胞と脂肪細胞への分化能を持つことを確認する。

(2) 歯髄細胞における幹細胞遊走誘導能および機能調節機構の解析

歯髄細胞における幹細胞誘導能の解析
歯髄細胞の培養上清を用いて、SDF-1 を介した間葉系幹細胞の誘導能を解析する。

歯髄細胞における SDF-1 発現調節機構の解析

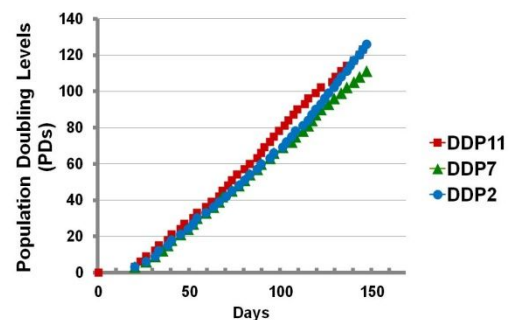
不死化した乳歯歯髄細胞を用いて、SDF-1 発現機構に関与するタンパク質を網羅的に解析し、それぞれのタンパク質において loss of function, gain of function, inhibitors により、調節機構の詳細な解析を行う予定である。

4. 研究成果

(1) 歯髄細胞株の樹立および分化誘導能の解析

徳島大学病院小児歯科外来で治療のために抜歯された乳歯より分離した歯髄細胞を用いた。分離した歯髄細胞に対して neomycin 耐性遺伝子を持つ pBabe-neo-hTERT plasmid (Addgene plasmid 1774, provided by Addgene Inc. Cambridge, MA, USA) の遺伝子導入を行い、不死化細胞株の樹立を行った。

hTERT 遺伝子安定的発現細胞の single cell cloning 後、26 clone の分離に成功した。そのうち3つの細胞株に DDP2, 7, 11 と名付け、細胞倍加指数の検討を行った。Hayflic limit の50回を越えて細胞分裂していることから、DDP2, 7, 11 細胞株は不死化していることが



考えられた (図1)。

図1 hTERT 遺伝子導入後の乳歯歯髄細胞の細胞倍加指数の確認

また、これらの細胞株の細胞は、間葉系幹細胞マーカーである CD146 および Abcg2 の発現がみられた。また、培養後、象牙芽細胞マーカーである DSPP および DMP-1 の遺伝子発現を確認したところ、すべての細胞で遺伝子発現を認めた (図2)。

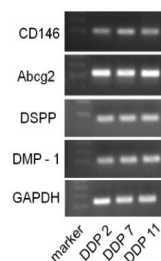
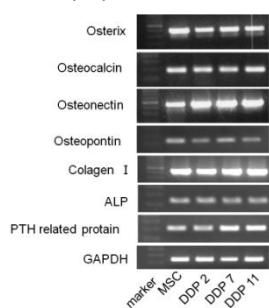


図2 歯髄マーカーの確認

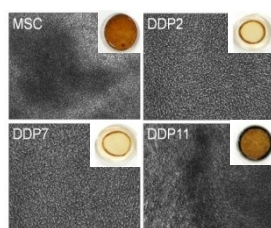
上記の結果より、これらの細胞株を骨芽細胞、脂肪細胞に分化させ、分化能の確認を行った。DDP2, 7, 11 細胞株を骨芽細胞へ分化誘導し、



RT-PCR 法にて、骨芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現確認を行ったところ、すべての細胞で骨芽細胞分化マーカーの発現がみられた(図3)。

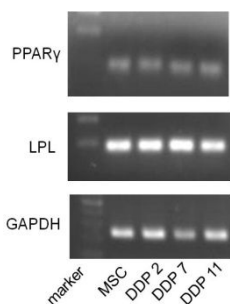
図3 骨芽細胞分化マーカー遺伝子の確認

石灰化能を確認するために、培養4週間後の von Kossa 染色を行ったところ、DDP2, DDP7



は結節を形成するが、石灰化は認められなかった。DDP11 は染色陽性であり、石灰化結節を形成すると考えられた(図4)。

図4 von Kossa 染色による石灰化の確認



DDP2, 7, 11 細胞株を脂肪細胞へ分化誘導し、RT-PCR 法により、脂肪細胞の分化マーカー遺伝子の発現確認を行ったところ、すべての細胞で脂肪細胞分化マーカーの発現がみられた(図5)。

図5 脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現確認

培養4週間後に Oil Red O 染色を行ったところ、すべての細胞株で陽性細胞を確認したが、DDP11 > DDP7 > DDP2 の順であった(図6)。

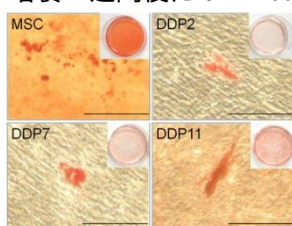


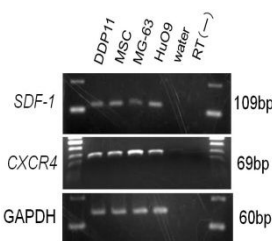
図6 Oil Red O 染色による脂肪細胞の確認

以上より、本細胞は象牙芽細胞、骨芽細胞、脂肪細胞へと分化し、多分化能をもつことが示唆された。

これ以降は DDP11 を用いて実験を行った。

(2) 歯髄細胞における幹細胞遊走誘導能および機能調節機構の解析

歯髄細胞における幹細胞誘導能の解析
DDP11 における SDF-1、CXCR4 の発現を確認した。



RT-PCR 法にて、DDP11 において SDF-1 と CXCR4 の発現が見られた(図7)。

図7 DDP11 における SDF-1、CXCR4 の mRNA の確認

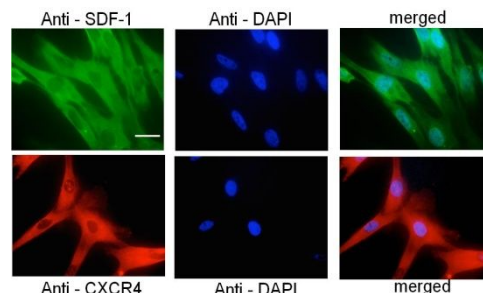


図8 DDP11 における SDF-1、CXCR4 タンパク質の確認

免疫染色法において、DDP11 に Anti - SDF-1 と Anti - CXCR4 にて染色された細胞が確認された(図8)。

また、SDF-1 は、その受容体である CXCR4 を発現する間葉系幹細胞や血管内皮前駆細胞の遊走を誘導することが知られている。そこで、SDF-1 を発現する DDP11 の conditioned medium によって、間葉系幹細胞(MSC)が遊走誘導されるかを transwell migration assay にて確認した。CXCR4 を阻害した群(AMD 群)では、MSC の誘導・誘導が減少した(図9)。

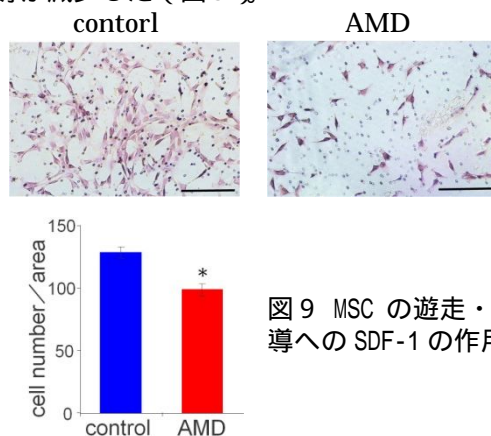


図9 MSC の遊走・誘導への SDF-1 の作用

以前の研究から、FGF-2 を投与すると SDF-1 の発現が低下することが分かっている。そこで、FGF 受容体の阻害剤である AZD4547 (calbichem) を投与し FGF-2 の量による SDF-1 の変化を RT-PCR を用いて調べた。control 群と比較して、FGF-2 を投与した群は、SDF-1 の発現が有意に減少した。FGF-2 と AZD を投与すると、FGF-2 による SDF-1 の発現抑制がキャンセルされた。(図10)

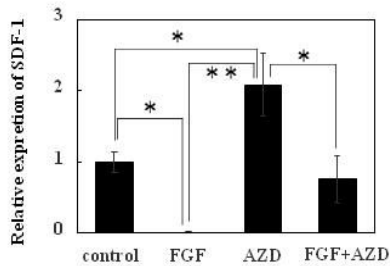


図 1 0 FGF-2 による SDF-1 の発現量の変化

以上より、DDP11 の発現する SDF-1 は FGF-2 により制御されている可能性が示唆された。しかし、SDF-1 の発現が低下するのは FGF-2 を投与後 48h 以降であり、何かの分子を介している可能性が考えられ、網羅的に解析するために PrimerArray を行った。そこで、TGF- の関与が疑われた (図 1 1)。

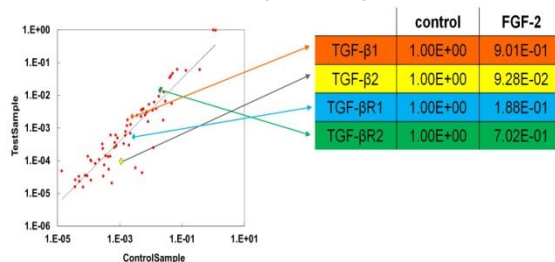


図 1 1 FGF-2 投与時の PrimerArray

今後は SDF-1 の発現への TGF- の制御を解析する予定である。

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)

YUKI AKAZAWA, TOMOKAZU HASEGAWA, YOSHITAKA YOSHIMURA, NAOYUKI CHOSA, TAKEYOSHI ASAKAWA, KIMIKO UEDA, ASUNA SUGIMOTO, TAKAMASA KITAMURA, HIROSHI NAKAGAWA, AKIRA ISHISAKI and TSUTOMU IWAMOTO, Recruitment of mesenchymal stem cells by stromal cell-derived factor 1 in pulp cells from deciduous teeth, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE、査読有、36、2015、442-448

[学会発表](計 2 件)

Yuki Akazawa, Tomokazu Hasegawa, Yoshitaka Yoshimura, Naoyuki Chosa, Takeyoshi Asakawa, Asuna Sugimoto, Takamasa Kitamura, Kimiko Ueda, Keita Kawarabayashi, Akira Ishisaki, Riku Takahashi, Yuto Suehiro, Tsutomu Iwamoto, Molecular mechanisms of SDF-1 suppression by FGF2 in dental pulp cells, 第 10 回アジア小児歯科学会大会 / 第 54 回日本小児歯科学会大会、2016.5.26-28、東京ドームホテル(東京

都、文京区)

赤澤 友基、長谷川 智一、岩本 勉、象牙質修復に関わる間葉系幹細胞の乳歯歯髄細胞由来 SDF-1 による制御、小児歯科学会、2015.5.21-22、広島国際会議場(広島県、広島市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

赤澤 友基 (AKAZAWA, Yuki)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：10646152