

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11377

研究課題名(和文)硬組織再生におけるヒト歯髄細胞の有用性に関する研究

研究課題名(英文)A study on the usefulness of human dental pulp cells in hard tissue regeneration

研究代表者

中村 美どり(Nakamura, Midori)

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：90278177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄は正常な組織では石灰化しない。しかし、歯髄線維芽細胞は、生体から取り出して培養すると、骨芽細胞や骨髄間葉細胞よりも自身の産生する細胞外基質を石灰化する能力が高いことがわかった。培養歯髄線維芽細胞は破骨細胞形成支持能を有し、遺伝子発現プロファイルも骨芽細胞や骨髄間葉細胞と酷似していた。また、歯髄線維芽細胞を免疫不全マウスに移植すると骨髄を伴った骨を形成した。本研究成果から、歯髄線維芽細胞の分子生物学的性状解析結果を基にした硬組織再生医療における材料としての歯髄線維芽細胞の有用性を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Dental pulp does not calcify in normal tissues. However, when dental pulp fibroblasts were removed from the body and cultured, it was found that the ability to calcify extracellular matrix produced by themselves is higher than that of osteoblasts and bone marrow mesenchymal cells. Cultured pulp fibroblasts possess osteoclastogenesis supporting ability, and the gene expression profile was very similar to osteoblasts and bone marrow mesenchymal cells. In addition, dental pulp fibroblasts were transplanted into immunodeficient mice to form bone with bone marrow. Based on the results of this research, it was possible to clarify the usefulness of pulp fibroblasts as a material in hard tissue regenerative medicine based on the molecular biological characteristics analysis result of pulp fibroblasts.

研究分野：小児歯科学

キーワード：歯髄細胞 石灰化 骨形成 破骨細胞 骨芽細胞 骨髄細胞

1. 研究開始当初の背景

歯髄および歯根膜は *in vivo* において石灰化しない組織である。しかし、これらの組織から培養細胞を調製すると、骨芽細胞のような骨形成活性を獲得することが知られている。この理由としては、生体における歯髄・歯根膜には石灰化阻害因子が存在する可能性も提唱されている。現在まで多くの研究者が歯髄細胞や歯根膜細胞に関する細胞生物学的研究を遂行してきた。我々は今までに、マウス切歯およびヒト小臼歯から採取した歯髄組織から歯髄細胞の調製を行い、その特異的形質発現の解析を行ってきた。その結果、歯髄細胞は骨芽細胞や骨髄間葉細胞と比較して、高いアルカリホスファターゼ活性を有し、骨誘導因子 (BMP) の非存在下において石灰化可能であることを見出した。また、我々はマウス由来の歯髄細胞、骨芽細胞および骨髄間質細胞から RNA を調製し、マイクロアレイ解析を行うことにより、骨形成促進および阻害因子候補をスクリーニングしてきた。その実験結果から、歯髄細胞の有する高い石灰化能力は、カルシウムチャネル (Anxa8) やリン酸トランスポーター (Slc20a2) の高発現、一方、MGP やピロリン酸合成酵素 (ENPP1) の低発現などに起因する可能性が示された。アルカリホスファターゼ、リン酸トランスポーター (Slc20a2)、カルシウムチャネル (Anxa8) の機能発現は、局所におけるカルシウムとリン酸の集積を惹起し、ヒドロキシアパタイト結晶を形成させると推測される。

今回我々が計画した研究においては、本来は石灰化しない組織を構成する歯髄細胞が *in vitro* で獲得する高い石灰化活性の制御機構を解明する。この研究で得られた実験結果は、未だ全容が明らかになっていない石灰化の分子機構の解明に寄与できると考えている。さらに、これらの基礎的研究成果を基にして、歯槽骨吸収の予防及び残存する歯槽骨の増生に関与する薬剤の開発を目指す。現在行われている iPS 研究やヒト骨髄細胞由来の間質細胞移植などの研究と並行して進行させることにより、口蓋裂における骨欠損や歯周病をはじめとする歯槽骨吸収患者に対する新しい治療法の開発にも直結すると信じている。

2. 研究の目的

骨のリモデリングとは、骨吸収と骨形成が絶え間なく繰り返されることにより、古い骨が新しい骨に置換されていくことである。この骨吸収と骨形成の量は、動的に均衡した共役状態に保たれたカップリング現象を示す。一方、形成後の歯質に関しては、生理的代謝の一環として吸収されることはない。我々は、通常状態では石灰化することがない歯髄細胞を細胞培養系に移すと、著しく強い石灰化能を獲得し、この石灰化亢進の原因となる候補遺伝子を複数見出した。本研究は、ヒト由

来の歯髄細胞を用いて、未だ不明である硬組織石灰化の分子メカニズムを検討し、硬組織再生におけるヒト歯髄細胞の有用性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髄細胞を用いた石灰化メカニズムの解析

前述のように、マウスを用いた歯髄細胞と骨芽細胞・骨髄間葉細胞を用いたマイクロアレイ解析の結果、歯髄細胞において強い活性を示すリン酸トランスポーター (Slc20a2) やカルシウムチャネル (Anxa8) 遺伝子を明らかにした。これらのトランスポーター遺伝子をマウス骨芽細胞に導入すると、高い石灰化能力を獲得するという実験結果も得ている。

歯髄および歯根膜は *in vivo* において石灰化しない組織であることから、これらの組織には石灰化阻害因子が存在する可能性がある。そこで、ヒト由来の歯髄・歯根膜・歯槽骨から RNA を調製し、マイクロアレイ解析を行うことにより、骨形成促進および阻害因子候補をスクリーニングする。予備実験結果から、ヒト歯髄細胞においてマウスと同様に、アルカリホスファターゼ (ALP) や骨誘導因子 (BMP-2) 発現が著しく高かった。また興味深いことに、ヒトおよびマウス由来歯髄細胞において特異的に高発現している3種類の転写調節因子を見出した。これらの転写調節因子の石灰化における機能解析を分子生物学的に行う。

(2) 歯髄細胞の硬組織形成能の組織学的解析

ヒト歯髄細胞の硬組織形成能について解析する。すなわち、免疫不全マウス (NOD/SCID-IL-2R KO マウス) にヒト歯髄細胞を移植し、経時的に硬組織形成能を解析する。また、免疫組織化学的に骨組織および象牙質の特異形質発現についても検討する。また、これらの硬組織様組織の基質小胞の存在については、電子顕微鏡を用いた解析を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト歯髄細胞を用いた石灰化メカニズムの解析

ヒトおよびマウスの培養歯髄線維芽細胞について、硬組織形成能の本質である細胞外基質を石灰化させる能力を調べた。比較のために骨髄間葉細胞または骨芽細胞の培養も併行して行った。骨芽細胞の細胞外基質石灰化は、骨形成タンパク 2 (BMP-2)、 α -グリセロリン酸 (α -GP) およびアスコルビン酸 (AA) の3者を培地に添加しないと効率的には起こらない。BMP-2 シグナルは、骨芽細胞や骨髄間葉細胞において TNAP の発現を上昇させる。次いで TNAP が α -グリセロリン酸を加水分解して Pi を生成し、ヒドロキシアパタイト結晶が成長する。一方 AA は、コラーゲン分子中のプロリン残基の水酸化酵素 (プロリルヒ

ドロキシラーゼ)とリジン残基の水酸化酵素(リシルヒドロキシラーゼ)の補酵素である。プロリン残基とリジン残基の水酸化はコラーゲンの成熟化および安定化に必須であり、AAはコラーゲンの成熟化をもたらす。このようにして、BMP-2、 α -GPおよびAAはそれぞれTNAP発現上昇、Piの供給物質、コラーゲンマトリックスの成熟という役割を担って、基質石灰化を促進する。ヒトおよびマウスの培養歯髄線維芽細胞はBMP-2非添加条件化においてもTNAPの活性が高く、 α -GPおよびAAの添加のみで著明な基質石灰化が認められた。リアルタイムRT-PCRにて発現レベルを解析すると、ヒトおよびマウスの培養歯髄線維芽細胞は、ともにTNAPの発現が骨髄間葉細胞および骨芽細胞より数10倍高かった。さらに、マイクロアレイにてヒトおよびマウスの培養歯髄線維芽細胞と骨髄間葉細胞および骨芽細胞の遺伝子発現プロファイルを作製した。ヒトおよびマウスの双方において培養歯髄線維芽細胞、骨髄間葉細胞および骨芽細胞の総括的な遺伝子発現パターンは、酷似していた。すなわち、骨髄間葉細胞および骨芽細胞のマーカーであるI型コラーゲン、オステオカルシン、Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)などは上記3種の細胞間において同レベルで発現していた。象牙質および骨細胞の基質タンパク質である象牙質マトリックスタンパク-1 (DMP-1)の発現レベルは歯髄線維芽細胞のほうが高かった。特に、歯髄線維芽細胞は骨髄間葉細胞などと比べ、複数のBMPファミリーメンバーの発現が数~数十倍レベルで高かった。したがって、内在性の高いBMP2発現が高いTNAPの活性に寄与しているものと思われる。マウスの歯髄線維芽細胞は骨髄間葉細胞などに比べ、アネキシンファミリーのカルシウムチャンネルが高い発現を示したが、ヒトの歯髄線維芽細胞では骨髄間葉細胞と同レベルの発現であった。PPiの合成酵素NPP1については、マウスの歯髄線維芽細胞のみで著しく低い発現レベルを示した。以上のように、ヒトおよびマウスの歯髄線維芽細胞は、骨髄間葉細胞および骨芽細胞と大部分の遺伝子について発現レベルが同等であることに加え、BMPファミリーメンバーの発現が著しく高いことから、硬組織再生において歯髄線維芽細胞の優位性が予想された。

(2) 歯髄細胞の硬組織形成能の組織学的解析

ヒトおよびマウスの培養歯髄線維芽細胞をT細胞およびB細胞を欠損する重度免疫不全マウスの筋膜下に移植した。1週間平面培養した歯髄線維芽細胞 10^5 cellsを 10 mm^3 のゼルフォーム(吸収性タイプIコラーゲンスポンジ)とともにコラーゲンゲルに埋め込み、さらに1週間高密度3次元培養し、歯髄線維芽細胞+コラーゲンゲル+ゼルフォームの混合ペレットを作製して、移植に用いた。移植2ヶ月後において、歯髄線維芽細胞移植群で

は同様の方法で移植した骨芽細胞や骨髄細胞移植群よりも高度に石灰化した硬組織が認められた。再生硬組織には、2種類の組織が同時に誘導され、細胞成分が少ない密な硬組織と、骨髄を伴った骨組織が誘導された。したがって、歯髄線維芽細胞は適当な方法が開発されれば、造血機能を伴った完全な骨を再生出来ることが示唆された。

歯髄線維芽細胞が骨芽細胞や骨髄間葉細胞と同様に破骨細胞支持能をもち、さらにその発現プロファイルも骨芽細胞や骨髄間葉細胞と酷似していた。実際に筋膜内に移植すると、効率的に硬組織を再生した。以上の結果は、培養歯髄線維芽細胞が、硬組織石灰化のメカニズム解明のためのモデル系として、また、骨再生の材料として特に優れていることを示す。一方で、硬組織の細胞外基質の石灰化の最前線においてCaやPiの濃縮に関与していると想定されるCaチャンネルやPiトランスポーターについては、不明な点が多い。培養歯髄細胞を石灰化機構解析モデルとして用いることで、Ca、Pi濃縮に関わる分子機構の解明とこれを標的とした薬剤の開発がもたらされることを期待したい。

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3件)

Nakamura M, Nakamichi Y, Mizoguchi T, Koide M, Yamashita T, Ara T, Nakamura H, Penninger JM, Furuya Y, Yasuda H and Udagawa N.

The W9 peptide directly stimulates osteoblast differentiation via RANKL signaling.

J Oral Biosciences, 146-151, 2017

Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, Uehara S, Nakamura M, Hiraoka BY, Ozaki Y, Iimura T, Yasuda H, Takahashi N and Udagawa N

Bone Formation is coupled to resorption via suppression of sclerostin expression by osteoclasts.

J Bone Mineral Res, 2074-2086, 2017

Murakami K, Kobayashi Y, Uehara S, Suzuki T, Koide M, Yamashita T, Nakamura M, Takahashi N, Kato H, Udagawa N and Nakamura Y

A Jak1/2 inhibitor, baricitinib, inhibits osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression in osteoblasts in vitro.

PLoS One, e0181126, 2017

〔学会発表〕(計1件)

中村美どり, 中道裕子, 溝口利英, 小林泰浩, 高橋直之, 宇田川信之
カテプシンK阻害剤投与は、オステオプロテゲリン欠損マウスにおいて、骨吸収抑制と共に骨形成促進作用を示す
第59回歯科基礎医学会学術大会, 2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 美どり (NAKAMURA, Midori)
松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 90278177

(2) 研究分担者

中村 浩志 (NAKAMURA, Hiroshi)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 00278178

大須賀 直人 (OSUGA, Naoto)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 80247535

中道 裕子 (NAKAMICHI, Yuko)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号: 20350829

溝口 利英 (MIZOGUCHI, Toshihide)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号: 90329475

宇田川 信之 (UDAGAWA, Nobuyuki)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70245801