

平成30年6月13日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20418

研究課題名(和文)高純度象牙質細胞を用いた新規MMP-3分解基質の同定と細胞増殖能の検討

研究課題名(英文) Identification of novel MMP-3 degrading products and investigation of cell proliferation using high purity odontoblast-like cells

研究代表者

長谷 奈央子 (Hase, Naoko)

愛知学院大学・歯学部・非常勤助教

研究者番号：30742738

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)：本研究では、DMP-1とMMP-3の分解産物と、マウス人工多能性幹細胞由来象牙芽細胞様細胞の増殖の関連性を検討した。その結果、IL-1 添加によりDMP-1および Emmprin の発現が認められ、MMP-3とDMP-1の分解産物は象牙芽細胞様細胞の増殖を増加させた。また、siRNA処理により、IL-1 誘導のDMP-1発現と細胞増殖が抑制された。本研究により、iPS細胞由来象牙芽細胞様細胞において、IL-1 誘導の細胞増殖にEmmprin、MMP-3、DMP-1発現、さらに、MMP-3とDMP-1の分解産物の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Because odontoblasts produce dentin matrix protein-1 (DMP-1), we examined whether the degraded products of DMP-1 by MMP-3 contribute to enhanced proliferation in mouse induced pluripotent stem (iPS) cells-derived odontoblast-like cells. IL-1 increased mRNA and protein levels of DMP-1 and extracellular matrix metalloproteinase inducer (Emmprin). The exogenous degraded products of DMP-1 by MMP-3 resulted in increased proliferation of odontoblast-like cells in a dose-dependent manner. Treatment with siRNA against MMP-3 and/or Emmprin potently suppressed the IL-1 -induced increase in DMP-1 expression and suppressed cell proliferation. Taken together, our current study demonstrates the sequential involvement of Emmprin, MMP-3, DMP-1 expression, and DMP-1 degradation products by MMP-3, in effecting IL-1 -induced proliferation of iPS cell-derived odontoblast-like cells.

研究分野：歯内治療学

キーワード：iPS細胞 MMP-3 象牙芽細胞 象牙質・歯髄複合体

1. 研究開始当初の背景

歯髄細胞群は象牙芽細胞，線維芽細胞，血管細胞，神経細胞などから構成される。その中でも象牙芽細胞は，歯髄がさまざまな外来侵襲に曝されると修復象牙質の形成を有する重要な組織である。しかし，臨床応用上の問題点は，象牙芽細胞の生体内での存在量は極めて微量であり，現在，入手可能な培養細胞系がほとんどないことである。さらに，象牙芽細胞の分化あるいは性状に着目した研究の大半は，組織レベルのアプローチであり，象牙芽細胞（象牙質）再生のメカニズムに着目した研究は未だ少なく，その結果，幹細胞から象牙芽細胞への安全かつ効率的な分化誘導法が確立されていないのが現状であった。

申請者らはこれまでにマウス胚性幹細胞（ES 細胞），マウス人工多能性幹細胞（iPS 細胞）およびヒト骨格筋幹細胞（組織性幹細胞）を用いて，上皮-間葉相互作用を介することなく，効率的に象牙芽細胞へ分化させる誘導法を初めて確立した。さらに，このマウス iPS 細胞由来象牙芽細胞を高純度化し，炎症性サイトカインを用いた炎症モデルを用いて，本細胞に存在するマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-3 が Wingless/int1 (Wnt) シグナルを介して象牙芽細胞の細胞増殖と抗アポトーシス制御作用を示すことを初めて明らかにした。この結果は，MMP-3 による細胞増殖制御機構が歯髄炎初期における歯髄創傷治癒に関与する可能性を示唆している。しかし，MMP-3 から細胞増殖にいたる下流のカスケード，とくに基質の同定は未解明であった。

そこで本研究では，これまでに得られたマウス iPS 細胞での実験結果をふまえて，申請者らが新規に確立したマウス iPS 細胞由来象牙芽細胞をセルソーターを用いて 98%以上に高純度化し，炎症性サイトカインを添加することで *in vitro* 歯髄炎病態モデルを作製し，未だ明らかにされていない細胞増殖に関わ

る MMP-3 の新規な生体内基質の同定を目的とした。本研究結果を発展させることで，従来法とは大きく異なる生体親和性と精度が高い新規な象牙質・歯髄複合体再生治療法モデルの確立を目的とする。

2. 研究の目的

本研究では，申請者らが新規に確立したマウス iPS 細胞由来高純度象牙芽細胞を用いて，これまでに報告してきた炎症性サイトカイン誘導マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -3 による細胞増殖機構の詳細なメカニズム，つまり新規な細胞増殖に関わる MMP-3 分解基質の解明を生化学的手法 (siRNA による特定タンパク質合成阻害，BrdU-ELISA による細胞増殖能とアポトーシス細胞死の評価，MMP-3 活性測定，遺伝子解析，ウエスタンブロット法など) を用いて解析し，既存の歯髄保存療法に代わる新規な象牙質・歯髄複合体再生治療法のモデルの確立を研究目的とする。

3. 研究の方法

マウス iPS 細胞由来高純度象牙芽細胞と細胞増殖・抗アポトーシス制御作用を有した MMP-3 の新規な分解基質の同定を生化学的手法を用いて解析する。

4. 研究成果

(1) マウス iPS 細胞由来高純度象牙芽細胞を用いた炎症性サイトカイン誘導 MMP-3 分解基質の解析

マウス iPS 細胞由来高純度象牙芽細胞において，象牙質特異的タンパク (DMP-1) が炎症性サイトカイン誘導 MMP-3 の細胞増殖を誘導する基質であることが明示された。

(2) マウス iPS 細胞由来高純度象牙芽細胞を用いた，炎症性サイトカイン誘導 MMP-3 分解基質の細胞増殖シグナルの検討

MMP-3 siRNA を用いて細胞増殖能を評価した結果、統計学的有意な細胞増殖の抑制が認められ、炎症下における象牙芽細胞の細胞増殖に MMP-3 が関与することが明らかとなった。

(3) マウス iPS 細胞由来高純度象牙芽細胞を用いた炎症性サイトカイン誘導 MMP-3 と Emmprin のシグナルカスケードの解析

マウス iPS 細胞由来高純度象牙芽細胞において、炎症性サイトカイン誘導の MMP-3 と Emmprin の遺伝子発現が明らかとなった。

(4) マウス iPS 細胞から象牙芽細胞への分化誘導における MMP-3 と Emmprin の関連性とシグナルカスケードの検討。

マウス iPS 細胞から象牙芽細胞への分化過程において、統計学的有意な MMP-3 と Emmprin の遺伝子発現が観察された。さらに、siRNA を用いたシグナルカスケードの解析により、象牙芽細胞への分化過程において Emmprin シグナル伝達経路の存在が明らかとなった。また、マウス iPS 細胞由来象牙芽細胞において炎症性サイトカイン添加により、統計学的有意な Emmprin の遺伝子発現が観察された。

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 Hase N, Ozeki N, Hiyama T, Yamaguchi H, Kawai R, Kondo A, Nakata K, Mogi M. Products of dentin matrix protein-1 degradation by interleukin-1 β -induced matrixmetalloproteinase-3 promote proliferation of odontoblastic cells. BioSci Trends, 査読有, 2015; 9(4): 228-236. DOI: 10.5582/bst.2015.01092.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 長谷 奈央子, 尾関伸明, 山口秀幸, 檜山太希, 川合里絵, 茂木眞希雄, 中田和彦. ポリリン酸誘導マトリックスメタロプロテアーゼ-13 はヒト骨髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を制御する. 日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会 (第 145 回), 2016.
- ② 長谷 奈央子, 川合里絵, 山口秀幸, 檜山太希, 尾関伸明, 中田和彦. マウス高純度象牙芽細胞を用いた新規 MMP-3 分解基質の細胞増殖メカニズムの検討. 第 23 回日本歯科医学会総会, 2016.
- ③ 長谷 奈央子, 尾関伸明, 山口秀幸, 檜山太希, 川合里絵, 茂木 眞希雄, 中田和彦. ポリリン酸誘導 MMP-3 はマウス iPS 細胞由来象牙芽細胞の細胞増殖を制御する. 日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会 (第 142 回), 2015.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷 奈央子 (HASE Naoko)

愛知学院大学・歯学部・非常勤助教

研究者番号：30742738

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし