

令和元年6月21日現在

機関番号：82729

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20631

研究課題名(和文)小分子化合物を利用した再生歯胚構築の為に細胞分化制御法の開発

研究課題名(英文)Development of the dental epithelial cell differentiation for tooth regeneration using novel small molecule compounds

研究代表者

成瀬 正啓(Naruse, Masahiro)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・医師

研究者番号：00756273

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文): TrkB受容体は細胞増殖、分化を含む歯の発生に重要な役割があると考えられている。LM22A-4はTrkB受容体に選択的作用を持つ合成小分子化合物である。本研究では、歯原性上皮細胞におけるLM22A-4の分子生物学的作用について解析した。LM22A-4はAmeloblastin、Amelogenin、MMP-20等のエナメル芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を誘導した。歯原性上皮細胞では、エナメル芽細胞分化はERK1/2のリン酸化によって誘導される。LM22A-4で刺激後10分でERK1/2のリン酸化がピークを示した。以上からLM22A-4は歯原性上皮細胞の細胞分化誘導を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではXeno-free培養下での歯原性細胞の安定的供給とエナメル芽細胞分化誘導を目的とし、細胞増殖および分化誘導作用を保持する複数の小分子化合物を組み合わせた、新規の細胞増殖・分化制御ハイブリッド培養法の開発を目指した。本研究で着目したLM22A-4という小分子化合物は歯の細胞の分化誘導に有効であることが示唆され、分化誘導培養法の開発へ有効な知見となったと考えられた。

研究成果の概要(英文): TrkB receptor is considered to have important roles during tooth development including cell proliferation and differentiation. LM22A-4 is a synthetic, selective small-molecule partial agonist of TrkB.

In this study, we demonstrated the biological activities of LM22A-4, in dental epithelial cells. LM22A-4 induced the expression of early marker genes of ameloblasts such as Ameloblastin, Amelogenin, and MMP-20. In dental epithelial cells, ameloblast differentiation is induced by activating ERK1/2 signaling. Time course experiments showed that the peak of phosphorylation of ERK1/2 was observed 10 minutes after LM22A-4 stimulation. These results suggested that LM22A-4 promotes dental epithelial cells differentiation into ameloblasts.

研究分野：歯の再生

キーワード：歯の再生 細胞分化 小分子化合物

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

再生医学の進展により様々な組織や器官の再生が可能となっており、器官原基法と呼ばれる新たな培養技術の開発により、歯科領域においては、マウスなどの小型動物の歯の再生が可能になった(Nakao K. et al. Nature Methods 2007)。しかしながら、器官原基法による歯の再生には、複数の胎仔から細胞を調整する必要があることから、臨床応用には倫理面での問題が存在しており、これらの問題を伴わない細胞ソースを確保する新たな培養法の実現が必要である。

歯のエナメル質と象牙質はそれぞれエナメル芽細胞(歯原性上皮細胞)および象牙芽細胞(神経堤由来の歯原性間葉細胞)によって形成される。細胞のソースの確保に関しては、iPS細胞から分化誘導するシステムを応用することで、エナメル芽細胞の人工誘導に成功した(Arakaki M et al. J Biol Chem 2012)ことや、象牙芽細胞については、乳歯由来歯髄細胞から小分子化合物を用いることで、歯髄幹細胞を人工誘導に成功したという報告があり、これらの成果により、危惧されていた上記の細胞ソースの問題は解決に近づいたが、個別の細胞に誘導するためには、他の細胞との共培養や異種生物から作成した増殖因子等の蛋白成分を用いる必要があり、これらの分化誘導過程において異種由来の成分の混在についても解決すべき問題が残っている。

また、エナメル芽細胞の分化誘導過程に着目すると、神経栄養因子の一つである Neurotrophin 4(NT-4)が歯原性上皮細胞において TrkB 受容体を介してその増殖を抑制、分化を促進し、NT-4 欠損マウスにおいて、エナメル質形成に遅延がみられるという報告があり(Yoshizaki et al., J Biol Chem 2009) iPS細胞からエナメル芽細胞に分化誘導させる際にも、NT-4 が必須の分子であることが報告されている。

そこで我々は、NT-4の細胞受容体である TrkB に特異的に作用する小分子化合物である LM22A-4(S.M. Massa et al., J Clin Invest 2010)、さらに TrkB 受容体シグナルの阻害剤である ANA-12をはじめとする小分子化合物を用いることで、歯原性上皮細胞の分化を異種成分を含まない状態(Xeno-free)で制御できるのではないかと考え、研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では Xeno-free 培養下での歯原性細胞の安定的供給とエナメル芽細胞分化誘導を目標とし、細胞増殖および分化誘導作用を保持する複数の小分子化合物の作用を評価し、それぞれを組み合わせた、新規の細胞増殖・分化制御ハイブリッド培養法の実現を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) LM22A-4による歯原性上皮由来細胞の分化誘導能の評価

ラット歯原性上皮由来細胞株 SF2 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 に 10% Fetal Bovine Serum を添加したものを培養培地として用い、37℃、5%の CO<sub>2</sub> 下で培養した。その後、LM22A-4 を 1、10、100、500 nM および、NT-4 を 200 nM の濃度で培養した。コントロールとして Dimethyl sulfoxide(DMSO)で処理したサンプルを用いた。RT-PCR 法を用いて歯原性上皮由来細胞の分化マーカーとして Ameloblastin、Amelogenin、MMP-20 の mRNA の発現を評価した。コントロールとして、DMSO で処理したサンプルを用い、内因性遺伝子コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)を用いて補正を行った。

### (2) WST-8の代謝を用いた細胞増殖能の評価

小分子化合物 LM22A-4 がラット歯原性上皮由来細胞株 SF2 細胞の細胞増殖に与える影響を細胞増殖試験で評価した。ラット歯原性上皮由来細胞株 SF2 細胞は LM22A-4 を 5、10、100、500、1000 nM および NT-4 を 100、200 nM で刺激し、24 時間培養後に Cell counting kit8 を用いて解析した。

### (3) LM22A-4による歯原性上皮由来細胞の石灰化誘導能の評価

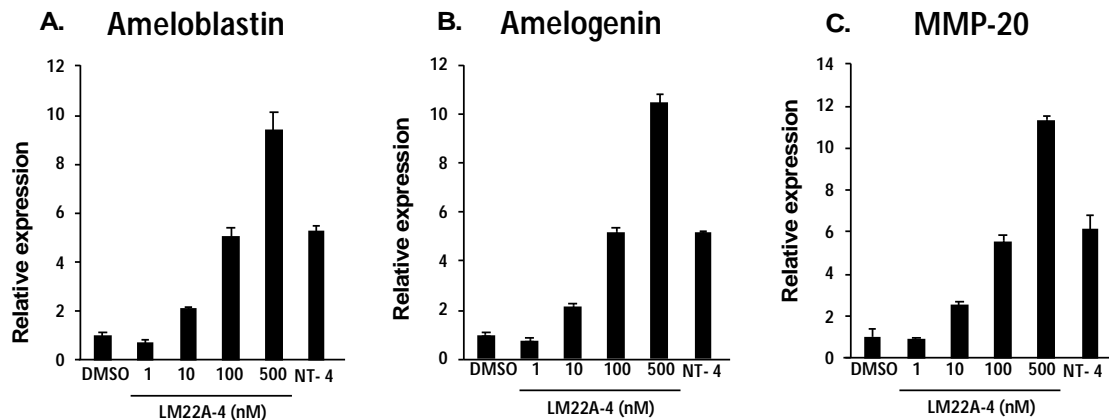
in vivo でのエナメル質形成において、エナメル基質の石灰化が重要となる。そこで、in vitro 環境下における LM22A-4 による石灰化誘導能を検討した。Alpha modification of Eagle's minimal essential medium に、アスコルビン酸(50 µg/ml)および β-Glycerophosphate (10mM)を加えた石灰化誘導培地で培養した細胞に LM22A-4、または LM22A-4 および塩化カルシウム 2mM で刺激後、細胞外に沈着したカルシウム沈着を染色するため、アリザリンレッド染色および von Kossa 染色を行い、石灰化をエナメル芽細胞の成熟の指標として評価した。37℃、5%の CO<sub>2</sub> 条件下で 7 日間培養した細胞を PBS で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で 5 分間固定した。アリザリンレッド染色は、蒸留水で洗浄後、アリザリンレッド溶液を加え、10 分静置後、蒸留水で洗浄した。von Kossa 染色は、蒸留水で洗浄し、5%硝酸銀溶液で直射日光下に 10 分静置した。蒸留水で洗浄したのち 5%チオ硫酸ナトリウム溶液を加え 3 分静置後水洗した。

### (4) 細胞内シグナル伝達経路の解析

神経栄養因子ファミリー分子である NT-4 は、TrkB-ERK1/2 シグナルを介し、SF2 細胞の増殖を抑制し、エナメル芽細胞への分化を促進することが報告されている(Yoshizaki, et al. 2008)。そこで、LM22A-4 による分化誘導が ERK1/2、p38、Akt などのリン酸化を介して行われているかどうかを、ウエスタンブロッティング法を用いて評価した。

#### 4. 研究成果

(1) ラット歯原性上皮由来細胞株 SF2 細胞に LM22A-4 で刺激後 24 時間後に Ameloblastin、Amelogenin、MMP-20 といったエナメル芽細胞分化マーカー遺伝子の発現が誘導された(図 1)。LM22A-4 を 100nM で刺激した際に NT-4 で刺激した際と同程度の誘導能があることが示唆された。

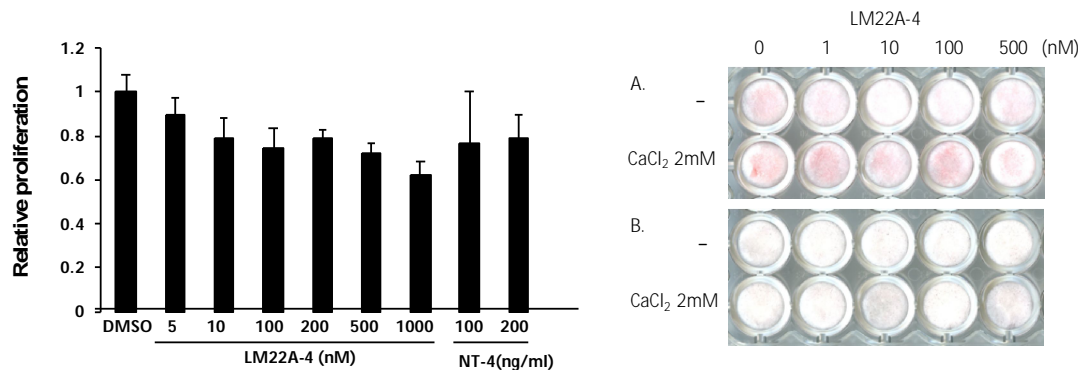


**図 1 LM22A-4 による SF2 細胞のエナメル芽細胞分化マーカー遺伝子の発現**

SF2 細胞を LM22A-4 存在下で 24 時間培養し、リアルタイム PCR 法にて (A)Ameloblastin, (B)Amelogenin, (C)MMP-20, といったエナメル芽細胞分化マーカー遺伝子の発現変化を指標として評価した。コントロールとして, DMSO を使用した。LM22A-4 は濃度依存的にこれらの遺伝子発現を亢進させた。

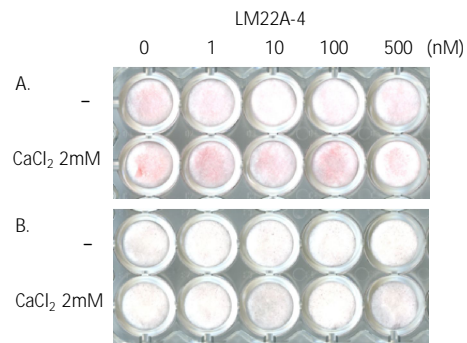
(2) LM22A-4 の SF2 細胞の増殖におよぼす影響を解析するために、LM22A-4 で刺激後 24 時間後に Cell Counting Kit-8 を用いて吸光度測定を行った。コントロールとして DMSO を使用した。LM22A-4 は濃度依存的に細胞増殖を抑制した。LM22A-4 を 100nM から 500nM で刺激した際に NT-4 で刺激した際と同程度の細胞増殖抑制が見られた (図 2)。

(3) LM22A-4 による石灰化誘導能を検討した。LM22A-4 を添加した石灰化誘導培地を用いて、SF2 細胞を 7 日間培養後カルシウム染色を行った。アリザリンレッド染色および von Kossa 染色で石灰化基質分泌を評価したが、SF2 細胞の石灰化基質分泌の誘導は認められなかった (図 3)。



**図 2 LM22A-4 の SF2 細胞増殖への作用**

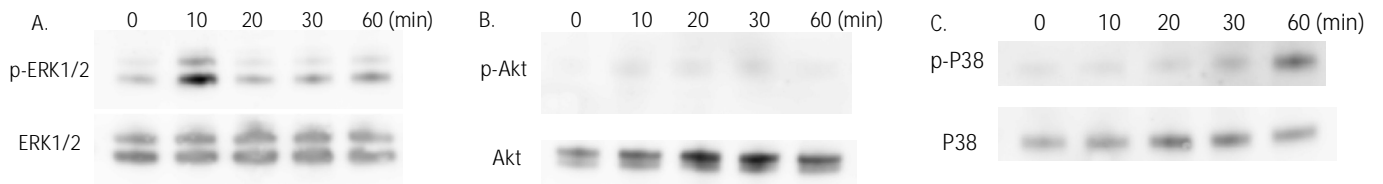
SF2 細胞を LM22A-4 存在下で 24 時間培養後、Cell Counting Kit-8 を用いて吸光度測定を行った。LM22A-4 は濃度依存的に SF2 細胞の増殖を抑制した。



**図 3 LM22A-4 による SF2 細胞の石灰化の有無の検討**

SF2 細胞を LM22A-4 存在下で 7 日間培養後、(A) アリザリンレッド染色および (B) von Kossa 染色を行った。塩化カルシウムの有無にかかわらず、LM22A-4 による SF2 細胞の石灰化誘導、石灰化基質の分泌誘導は認められなかった。

(4) 歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞分化には TrkB-ERK1/2 シグナル伝達経路が関わっていることが報告されている。TrkB 受容体作動薬である LM22A-4 も同様の経路が関与しているか、ウエスタンブロッティングで解析したところ、刺激後 10 分で ERK1/2 (図 4, A)、60 分で P38 (図 4, C) のリン酸化のピークがみられた (図 4)。LM22A-4 のエナメル芽細胞分化にも TrkB-ERK1/2 シグナル伝達経路が関わっていることが示唆された。



**図4 SF2細胞におけるLM22A-4のTrkB-ERK1/2シグナル伝達経路への作用**

SF2細胞においてLM22A-4刺激による(A)ERK1/2(B)Akt(C)P38のリン酸化について、ウエスタンブロッティング法にて解析を行った。ERK1/2は刺激10分後でリン酸化がピークを迎え、P38は60分に向けて徐々にリン酸化が増強した。

5. 主な発表論文等  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。