

平成21年5月25日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006～2008
課題番号：18300159
研究課題名（和文） 歯胚より樹立した歯の前駆細胞を用いた歯再生のための細胞導入治療法の開発
研究課題名（英文） Development of the cell transplantation therapy for the tooth regeneration using the committed progenitor cell of the tooth established from the tooth germ
研究代表者
杉山 俊博（SUGIYAMA TOSHIHIRO）
秋田大学・医学部・教授
研究者番号：00127242

研究成果の概要：マウス胎児の歯牙から象牙芽前駆細胞（odontoblast-lineage cell (OLC)）を樹立した。そこで、ヌードマウスの皮膚に PuraMatrix に播種した OLC を移植したところ、8 週間後に移植した OLC の約 25% に有意な石灰化したコラーゲン塊が出現した。次に、歯胚上皮組織と OLC の三次元培養系、及び *in vivo* 三次元再構成体の腎移植系において歯冠の形成を観察できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2007年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体材料学

キーワード：細胞工学, 歯胚, エナメル芽細胞, 象牙芽細胞, 歯再生

1. 研究開始当初の背景

現在までに知られている歯の再生過程には、上皮-間葉相互作用が必須である。上皮系の細胞が集積し、その周囲に存在する間葉系組織に働きかけて分化を促す。さらに、間葉系細胞が上皮系細胞に働きかけるといった相互作用の中で再生が達成されている。また、その鍵となる上皮系の細胞については、現在のところ単離された細胞か、あるいは歯胚の上皮組織そのものが利用されてきた。したがって、培養によって十分に増殖させた細胞を用いて、上皮-間葉間の相互作用を再現させ

ることは歯の再生療法の重要な課題の一つである。

これまで当研究室では、マウス新生仔歯胚から未熟なエナメル芽前駆細胞 ameloblast-lineage cell (ALC) を分離・培養し、*in vitro* で細胞外マトリックスの産生誘導・石灰化に成功した (Nakata A. et al., BBRC, 2003)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯胚より樹立した歯の前駆細胞を用い、エナメル質や象牙質の形成に必至な上皮-間葉相互作用を明らかにし、さ

らに歯の再生のための細胞導入治療法の開発を目指した。本研究の第1の目標は上皮-間葉相互作用を利用して象牙芽細胞とエナメル芽細胞を効率的に分化誘導する。第2の目標は分化誘導したエナメル芽細胞と象牙芽細胞を用いて *in vitro* で歯冠を形成させる。そして第3の目標は、この産生されたエナメルマトリックスを精製し、組織石灰化における有効性を検討し、しいては歯組織再生技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) 上皮-間葉相互作用を利用した象牙芽細胞とエナメル芽細胞の効率的な分化誘導

①エナメル芽前駆細胞と間葉系象牙芽前駆細胞の分化誘導因子を検索した。

②コラーゲン膜に接着した前駆細胞を分化誘導した。

(2) 生体内での歯牙再生

「片面培養マトリックス産生細胞」あるいは「フィーダー細胞上で培養した歯胚」をラットの皮下・腎被膜下や歯科用バーで削除したウサギの下顎大臼歯部の歯槽骨に移植した。

(3) 三次元歯胚培養法による歯牙再生

自発的に不死化された間葉系細胞系を用いた歯胚の再生機構について、*in vitro* 三次元歯胚器官培養法および *in vivo* 細胞移植法を用いて行った。

①E14.5 マウス歯胚から解剖学的に分離し、dispase II と DNase I を用いて酵素処理を行い、胚葉性上皮組織を得た。

②分離した胚葉性上皮組織と我々が樹立した OLC とをコラーゲンドロップ内で三次元的に再配置した。

③上皮組織-OLC 再配置ドロップを腎皮膜に移植し、歯芽形成を観察した。

4. 研究成果

(1) エナメル芽前駆細胞を樹立した同様な方法で、マウス胎児の歯牙の象牙芽細胞の形質を有している papilla 細胞から継代培養して、不死化細胞を樹立した (図1)。この細胞を象牙芽前駆細胞 (odontoblast-lineage cell, OLC) と命名した。象牙芽前駆細胞は、DSP や DMP1 などの象牙質の細胞外マトリックス・タンパク質を産生していた。また、高カルシウム、グリセロールリン酸の添加により、石灰化が促進された (図2)。

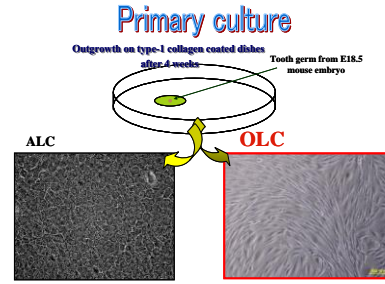


図1 OLCの樹立

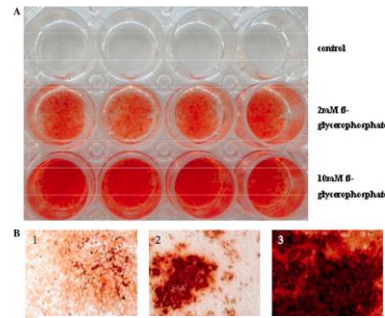


図2 OLCにおける石灰化

(2) 我々の研究室で樹立した ALC と OLC についてその機能発現に関する研究を行った。最終目的は *in vivo* で歯再生を達成するための最適な効率のよい細胞外マトリックス (足場) を開発することであった。Matrigel はよく利用されているマトリックスである。ヌードマウスの皮膚に Matrigel に包埋した ALC を移植したところ 100% 細胞に石灰化が起こった。一方、Matrigel に包埋した OLC を同様にヌードマウスに移植しても組織学的に何も観察されなかった。そこで、PuraMatrix (水溶性の人工合成低分子ペプチドの水溶性ゲル) を用いたところ、8週間後に移植した OLC の約 25% に有意な石灰化したコラーゲン塊が出現した (図3)。

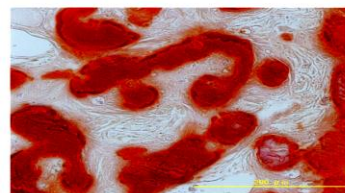
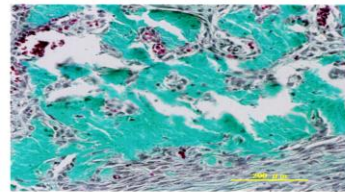


図3 PuraMatrixを用いた OLC の *in vivo* での石灰化

(3) 我々は2種類の前駆細胞の2次元共培養系を開発した。基底膜は歯根形成に必須であるので、ポリマー性膜の表面に基底膜をコートしたインサート上にPuraMatrix内に封入した細胞をサンドイッチ様に封入した培養法を考案した。細胞外マトリックスの中に石灰化が観察された。

(4) 歯胚上皮組織と OLC との三次元培養系にて歯冠再生を行った。in vitro 三次元再構成培養系の開始後3日目でも、播種した OLC は円柱状の構造を保っていたが、2週間後になると、OLC 細胞塊は外見的に上皮組織周囲で収縮した。

次に、このような三次元的に再配置した OLC-上皮組織をマウスの腎皮膜下に移植し、2週間観察した。in vivo におけるグループ VI (胎生14.5日目の上皮組織と OLC) の組織切片は、コラーゲンを含んだ青色のデンチン層と脱石灰化した赤茶色のエナメル層とが明らかに区別された。GFP 陽性の細胞は免疫組織染色法により移植部で観察でき、OLC がバイオ再生医学で形成した歯胚に存在していることが明らかになった。グループ IV の組み合わせの内3分の2で、しかしながら、不規則な組織形成を観察した。OLC の球形の再構成体内には、GFP 陽性領域に出現しており、in vitro で最もよく観察された(図4左図)。in vivo 実験では、円形をした骨芽細胞様の細胞からなる骨様形成領域に囲まれたケラチン層が観察された(図4右図)。これらの結果から、移植した3分の1が歯組織に分化した。OLC 由来 GFP 陽性の細胞は免疫組織染色法にて石灰化した歯胚に存在していることを証明できた。OLC は上皮-間葉系相互作用により機能を持った象牙芽細胞に分化したことが分かった。

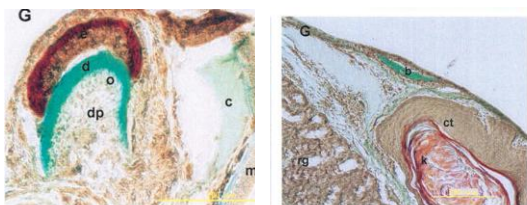


図4 in vitro 三次元培養系(左図)及び in vivo 三次元再構成系(右図)での歯冠再生

このように in vivo における実験は生理的な環境に即しているので有益な結果をも

たらした。一方、in vitro での上皮-間葉系細胞の混合実験は器官形成過程における相互作用(組織-細胞、細胞-細胞間の相互作用)を検討するために有力な手段となることが分かった。

以上のことから、我々は歯再生実験において、OLC は歯間葉系組織に充分代替できる細胞であることが判明した。従って、我々が樹立した OLC は歯の分化・再生過程において有用な研究材料になると思われる。

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18件)

- ① Arany S, Kawagoe M. and Sugiyama T. Application of spontaneously immortalized odontoblast cells in tooth regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 381,84-89, (2009) 査読有
- ② Arany S, Koyota S., Sugiyama T. Nerve growth factor promotes differentiation of odontoblast-like cells. *J Cell Biochem.*, 106, 539-545, (2009) 査読有
- ③ Wang JS, Koyota S., Zhou XP, Ueno Y., Ma L, Kawagoe M, Koizumi Y., Hiroshi Okamoto H, Sugiyama T. Expression and localization of regenerating gene I in a rat liver regeneration model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380, 472-477, (2009) 査読有
- ④ Koizumi Y., Tomoda H, Kumagai A, Zhou XP, Koyota S., Sugiyama T. Simaomicin α , a polycyclic xanthone, induces G1 arrest with suppression of pRb phosphorylation. *Cancer Sci.* 100, 322-326, (2009) 査読有
- ⑤ Steffl M., Schweiger M., Sugiyama T., Amselgruber W.M. Review of apoptotic and non-apoptotic events in non-ciliated cells of the mammalian oviduct. *Ann. Anat.*, 190, 46-52, (2008) 査読有
- ⑥ Hayashi K, Motoyama S, Sugiyama T., Izumi JI, Anbai A, Nanjo H, Watanabe H, Maruyama K, Minamiya Y, Koyota S., Koizumi Y., Takasawa S, Murata K, Ogawa J I. REG Ia is a reliable marker of chemoradiosensitivity in squamous cell esophageal cancer patients. *Ann. Surg. Oncol.*, 15, 1224-1231, (2008) 査読有

- ⑦ Saheki T., Ito H., Sekiguchi A., Nishina A., Sugiyama T., Izumi T., Kojima I. Proteomic analysis identifies proteins that continue to grow hepatic stem-like cells without differentiation. *Cytotech.*, 57, 137-143, (2008) 査読有
- ⑧ Kawagoe M, Ishikawa K, Wang S.-C, Yoshikawa K, Arany S, Zhou XP, Wang J.-S, Ueno Y. Koizumi Y., Kameda T, Koyota S. Sugiyama T. Acute effects on the lung and the liver of oral administration of cerium chloride on adult, neonatal and fetal mice. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 22, 59-65, (2008) 査読有
- ⑨ Koizumi Y., Tomoda H, Kumagai A, Zhou XP, Koyota S. Sugiyama T., Simaomicin α , a polycyclic xanthone, induces G1 arrest with suppression of pRb phosphorylation. *Cancer Sci.*, 100, 322-326, (2008) 査読有
- ⑩ Harada M, Kumemura H, Koga H, Kawaguchi T, Terada K, Hanada S, Taniguchi E, Koizumi Y, Koyota S. Nino miya H, Ueno K, Sugiyama T., Sata M. Niemann-Pick C1 protein transports copper to the secretory compartment from late endosomes where ATP7B resides. *Exp. Cell Res.*, 315, 119-126, (2008) 査読有
- ⑪ Takahashi S., Kawashima N., Sakamoto K, Nakata A., Kameda T., Sugiyama T., Katsube K., Suda H. Differentiation of an ameloblast-lineage cell line (ALC) is induced by Sonic hedgehog signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353, 405-411, (2007) 査読有
- ⑫ Arany S, Ohtani S, Yamamoto T, Sugiyama T. Comparison of aspartic acid racemization between mammoth and human dentinal tissues. *Arch. Oral Biol.*, 52, 20-25, (2007) 査読有
- ⑬ Hirasawa F, Kawagoe M, Wang JS, Arany S, Zhou XP, Kumagai A, Koizumi Y. Koyota S. Sugiyama T. Gadolinium chloride suppresses styrene-induced cytochrome P450s expression in rat liver. *Biomed. Res.*, 28, 323-330, (2007) 査読有
- ⑭ Suruga K, Akiyama Y, Kadokura K, Sekino Y, Kawagoe M, Komatsu Y, Sugiyama T. Synergistic effect on reactive oxygen scavenging activity of fermented okara and banana by XYZ system. *Food Sci. Technol. Res.*, 13, 139-144, (2007) 査読有
- ⑮ Arany S., Nakata A., Kameda T., Koyota S., Ueno Y., Sugiyama T. Phenotype properties of a novel spontaneously immortalized odontoblast-lineage cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342, 718-724, (2006) 査読有
- ⑯ Takahashi S., Ogasawara H., Hiwatashi K., Hori K., Hata K., Tachibana T., Itoh Y., Sugiyama T. Paenidase, A novel D-aspartyl endopeptidase from *Paenibacillus* sp. B38: Purification and substrate specificity. *J. Biochem.*, (Tokyo) 139, 197-202, (2006) 査読有
- ⑰ Takahashi S, Hori K, Ogasawara H, Hiwatashi K, Sugiyama T. Effects of nucleotides on the interaction of renin with GlcNAc 2-epimerase (renin binding protein, RnBP). *J Biochem.*, (Tokyo), 140, 725-730, (2006) 査読有
- ⑱ Motoyama S, Sugiyama T., Ueno Y., Okamoto H, Takasawa S, Nanjo H, Watanabe H, Maruyama K, Okuyama M, Ogawa J. REG I expression predicts long-term survival among locally advanced thoracic squamous cell esophageal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy followed by esophagectomy. *Ann. Surg. Oncol.*, 13, 1724-1731 (2006) 査読有
- [学会発表] (計4件)
- ① 杉山俊博, Szilvia Arany, 川越政美, 馬莉, 小代田宗一. 象牙芽前駆細胞を用いた歯再生. 第8回日本再生医療学会総会, 平成21年3月, 東京
- ② Saheki T, Mukai Y, Saito K, Tajima E, Katakura K, Nishina A, Kishi M, Izumi T, Sugiyama T. Kojima I. Study of butyrate signal transduction pathways in rat hepatic stem-like cells. *Animal Cell Technology in Bioscience, Bioengineering and Bioindustries*, 2008 November, Fukuoka
- ③ 王静舒, 馬莉, 小代田宗一. 杉山俊博. ラット肝再生モデルにおける Reg I の発現と局在. BMB 2008 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会, 平成20年12月, 神戸
- ④ 佐伯俊彦, 和泉孝志, 杉山俊博, 小島至. ラット肝臓幹様 (HSL) 細胞を酪酸処理したときの Prohibitin の応答. BMB 2007 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会, 平成19年12月, 横浜

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

①「象牙芽前駆細胞を用いた歯組織再生方法」

出願番号：特開 2007-209244, 出願人：秋田大学, 発明者：杉山俊博、アラニー・シルビア, 出願日：平成18年2月9日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 俊博 (SUGIYAMA TOSHIHIRO)

秋田大学・医学部・教授

00127242

(2) 研究分担者

小代田 宗一 (KOYOTA SOUICHI)

秋田大学・医学部・講師

80400480

上野 康晴 (UENO YASUHARU)

横浜市立大学・医学部・助教

60375235

宮本 洋二 (MIYAMOTO YOUZI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

20200214

永井 宏和 (NAGAI HIROKAZU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

50282190

中田 憲 (NAKATA AKIRA)

秋田大学・医学部・助教

50400510

小泉 幸央 (KOIZUMI YUKIO)

秋田大学・医学部・助教

80353465