

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390486

研究課題名（和文）

ヒト歯根膜前駆細胞クローン細胞株を用いた歯根膜再生機構の解明

研究課題名（英文） Clarification of the mechanisms of regeneration of periodontal ligament using human clonal periodontal ligament progenitor cell line

研究代表者

前田英史 (MAEDA HIDEFUMI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：10284514

研究成果の概要（和文）：

本研究課題において私たちは、2種のヒト歯根膜幹細胞/前駆細胞株を樹立し、歯根膜組織再生に必要な細胞要素としてのそれらのキャラクタリゼーションを行った。いずれも骨髄間葉系幹細胞と同様のマーカーを発現したが、歯根膜細胞株は歯根膜組織に強く発現する Periostin ならびに Scleraxis を発現していたことから歯根膜の特徴を維持していることが明らかになった。この細胞株を用いて、組織再生のための足場材にはカルシウムを成分として含む材料が、効果的にセメント芽細胞/骨芽細胞への分化を促進することがわかった。さらに歯根膜再生の形態形成因子として、Basic Fibroblast Growth Factor ならびに Transforming Growth Factor- β 1 の有効性を明らかにした。また心臓血管系の調節に重要な働きをしていることが知られている Angiotensin II が歯根膜組織再生に有益な効果をもたらす可能性があることが示唆された。そして歯根膜幹細胞は Nerve Growth Factor を分泌し、神経細胞の分化、遊走そしてアポトーシス抑制において重要な働きをしていることが判明した。以上のことから、歯根膜組織再生は、これらが複合して機能性を発揮することによって達成される可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we have developed two clonal human periodontal ligament (PDL) stem/progenitor cell lines, and characterized them as cell elements responsible for PDL regeneration. Although both of cell lines expressed the same surface markers as bone marrow-derived mesenchymal stem cells, these cell lines specifically included Periostin and Scleraxis specific for PDL tissues. As scaffold elements, the materials containing calcium components effectively induced the differentiation of these two undifferentiated cell lines into cementoblastic/osteoblastic cells. Furthermore, as signaling elements, we clarified the efficacies of Basic Fibroblast Growth Factor and Transforming Growth Factor- β 1 in PDL regeneration. And Angiotensin II that played important roles in regulating cardiovascular systems was suggested to affect tissue regeneration valuably. We also disclosed the functions of PDL stem/progenitor cells, indicating that our developed cell lines secreted Nerve Growth Factor to induce the neural differentiation, and neural migration, and inhibit apoptosis of neural cells. These results suggested that PDL tissue regeneration was accomplished by combining these three elements functionally.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	8600000	2580000	11180000
20年度	3100000	930000	4030000
21年度	3200000	960000	4160000
年度			
年度			
総計	14900000	4470000	19370000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯内治療学

1. 研究開始当初の背景

組織再生医療には、細胞、形態形成因子そして足場の3つの要素が必要であるといわれている。私たちは、この3要素の中で、歯根膜組織に存在し歯根膜組織再生能を持つことが示唆されている歯根膜幹細胞に着目した歯根膜組織再生の研究を行ってきた。通常体細胞は分裂数が進むにつれて老化し形質が変化することから、再現性のある実験を行うことが困難である。そのためまずヒト歯根膜細胞にSV40 largeT 抗原(SV40T-Ag)及び human telomerase reverse transcriptase (hTERT)の遺伝子を導入することによって不死化したヒト歯根膜細胞を樹立し、これらの細胞を用いて実験を進めることにした。これまでに3種のヒト歯根膜細胞の不死化に成功し、これらの細胞がオリジナル細胞の形質を維持していることを証明し報告した(Fujii S 他 4名 Cell Tissue Res 324 巻1号 117-125 2006)。さらにこの不死化した細胞をクローニングし、得られたクローン細胞の中から、骨芽細胞または脂肪細胞への分化能を有した歯根膜クローン細胞株(1-11細胞)を単離した。この細胞株は、歯根膜幹細胞として報告された細胞に発現が報告されているSTRO-1及びCD146を発現していた。この細胞株に加えて、他のクローン細胞株についても精査し、歯根膜組織再生について解明することが重要である。

2. 研究の目的

私たちが樹立した歯根膜様組織形成能を持つヒト歯根膜細胞前駆細胞のクローン細胞株を用いて歯根膜組織の再生機構を解明し、新規のヒト歯根膜組織再生療法の開発へと繋がる研究結果を出すことを全体の構想としている。本研究では以下のように目的を掲げた。

- ・骨髄間葉系前駆細胞のマーカーを指標にして、歯根膜組織再生能を持つ細胞の表面抗原を同定する。
- ・歯根膜幹細胞による再生に有益な足場材について検証する。
- ・組織再生の形態形成因子としてあげられる Basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF), Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1)そして WNT の中で歯根膜組織の再生を効率よく誘導できる形態形成因子を同定する。
- ・歯根膜組織再生の調整に関わる因子を検出する。
- ・歯根膜幹細胞が持つ機能について明らかにする。

3. 研究の方法

歯根膜幹細胞の表面抗原についての検討
骨髄の間質系前駆細胞マーカーである CD13, CD29, CD44, CD90, CD105, CD166 陽性の細胞が歯根膜組織に局在することが報告されており (Trubiani O 他 6名 Int J Immunopathol Pharmacol 18 巻 213-221 2005)、歯根膜幹細胞もまたこれらのマーカーを発現していることが考えられることから、1-11細胞株ならびに1-17細胞株における発現パターンについて flow cytometry を用いて検討する。

また、分化段階が異なっている1-11細胞株1-17細胞株との間で発現に差が認められる表面抗原について cDNA マイクロアレイによって検討する。

歯根膜再生に関与する形態形成因子についての検討

- ・1-11細胞株ならびに1-17細胞株に対して、FGF2, TGF, Wnt3a そして Wnt7b 刺激を行い、歯根膜関連タンパクの発現への影響について検討する。

・ 生体内で常に機械的刺激にさらされている歯根膜細胞は、歯根膜組織の恒常性の維持に重要な因子を発現していると考えられることから、実験的に適切な伸展力を与えることによって発現が促進する因子について明らかにし、その機能について明らかにする。

歯周組織欠損動物実験モデルの作製と歯根膜幹細胞の移植実験

免疫不全ラットの臼歯の歯槽骨に外科的に欠損部を作り、歯周組織にダメージを与えた実験モデルを作製し、この欠損部位に 1-11 細胞株または 1-17 細胞株を移植し、欠損部位の修復への関与について検証する。

歯根膜組織再生に重要な足場因子についての検討

歯根膜細胞に対して石灰化を誘導する材料に含まれるカルシウム成分の影響について検証し、さらにその結果を基に、歯根膜幹細胞の足場となり、またセメント芽細胞/骨芽細胞分化を促進する足場材について検討する。

4. 研究成果

歯根膜組織再生に必要な 3 要素として、歯根膜幹細胞、足場材、そして形態形成因子があげられる。私たちは、本研究においてこれら 3 要素について、歯根膜組織再生への影響についての解析を行った。

・ 歯根膜幹細胞

歯根膜組織中に含まれる幹細胞の数は極めて少なく、再現性を持って解析を行っていくことが困難であることから、クローン化したヒト歯根膜幹細胞株を樹立することにした。本研究の趣旨を理解し、同意が得られた患者より歯根膜組織を採取し、*in vitro* にて培養後、遊走してきた細胞をプライマリーのヒト歯根膜細胞 (HPLC) とした。つぎに HPLC に SV40 large T 抗原をコードする遺伝子 (SV40T-Ag) とヒトテロメラーヌ逆転写酵素をコードする遺伝子 (hTERT) とを導入し不死化した細胞を作製した。さらにこの不死化歯根膜細胞をクローニングし、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞そして神経細胞への多分化能を有した極めて未熟な細胞株 1-17 を得た。またもう一つのクローン株 1-11 は、骨芽細胞そして脂肪細胞への分化を示した。

これら 2 種のクローン細胞株は、表面抗原として、骨髄間葉系幹細胞のマーカである CD13, CD29, CD44, CD90, CD105, CD166 を、各々ほぼ同等に高い割合で発現していた。また CD146 ならびに STRO-1 陽性の歯根膜細胞には、歯根膜組織再生能があることが報告されているが、1-11 細胞株には両抗原が認めら

れたのに対し、1-17 細胞株には STRO-1 のみ観察された。さらに、これらの細胞株は、神経堤細胞のマーカである Nestin, p75, そして Slug をほぼ同等に、また極めて未分化な細胞マーカである Oct3/4 ならびに Nanog を 1-17 細胞株がより強く発現していた。このように、樹立した細胞株は骨髄間葉系幹細胞に特徴が類似していたが、相違点として、細胞株は、歯根膜組織に高い発現がみられる Periostin ならびに Scleraxis を発現していた。このことから、私たちが樹立した細胞株は歯根膜系統の細胞株であり、各々の分化能の違いから、1-17 細胞株は 1-11 細胞株よりも分化度が低い細胞であることが示唆された。そこで各々の細胞株を、免疫不全ラットの歯根膜欠損部位に移植した結果、1-11 細胞は、セメント質ならびに骨表面、そして歯根膜線維組織にホーミングしたのに対し、1-17 細胞は歯根膜線維組織内のみホーミングした。この結果から、歯根膜の 3 要素への分化には CD146 の発現が関与している可能性が示唆された。したがって、歯根膜組織再生機構について解明していくうえで、極めて有益な、2 種類の分化段階が異なる歯根膜幹細胞株を得ることができた。また分化度の違いから、私たちは、1-17 細胞株を歯根膜幹細胞株、そして 1-11 細胞株を歯根膜前駆細胞株として捉えている。

・ 足場材

上記のように樹立した細胞株を用いて、歯根膜組織再生に必要な足場材について検討した。まず β -Tricalcium phosphate (β -TCP) との相互作用について観察した。各々の細胞株を β -TCP と共に培養し、生着させた後、免疫不全マウスの背部皮下に移植した。移植後 4 週間で、いずれの細胞株も β -TCP の表面に硬組織を形成した。さらに 8 週間後には、1-11 細胞は、 β -TCP 表面に形成した硬組織に陥入した太いコラーゲン線維がみられる組織を形成しており、歯根膜組織に特徴的な Sharpey 線維を彷彿させた。またこの組織中には、歯根膜組織に見られる Periostin ならびに Osteocalcin の発現も認めることができた。

つぎに β -TCP の構成成分であるカルシウムが、歯根膜幹細胞株に及ぼす影響について検討した。5 mM の塩化カルシウムを、2 種類の歯根膜幹細胞株に添加し、骨原性細胞誘導培地は用いず、通常培地にて 4 週間培養した結果、両細胞株ともに石灰化が強く誘導された。さらに、これがセメント芽細胞/骨芽細胞への分化が誘導されたことを確認するために、骨関連タンパクの発現について調べた結果、Osteopontin, Osteocalcin そして Bone Morphogenetic Protein (BMP2) の遺伝子発現が亢進していた。以上のことから、歯根膜幹

細胞によるセメント質ならびに骨への分化にはカルシウムが重要な役割を担っていることが示唆された。

・形態形成因子

つぎに歯根膜幹細胞による歯根膜再生に必要な形態形成因子について検討した。本研究では、bFGFならびにTGF- β 1そしてWntによる影響について解析を行った。

まず bFGF は、未分化な歯根膜細胞の増殖を促進し、血管形成を誘導することによって歯根膜組織再生に有効であると考えられているが、樹立した細胞株のセメント芽細胞/骨芽細胞分化への影響について検討した結果、1-11 細胞株に対しては、石灰化を惹起し分化を誘導したが、1-17 細胞株に対しては、石灰化物は観察されなかったことから、分化を抑制する方向に働いた可能性が示唆された。以前、bFGF レセプターの発現は骨系細胞分化の指標となり、また歯根膜細胞はレセプターの濃度を変えることによって、反応性を調節している可能性が報告されていたことから、bFGF 刺激の有無に対する両細胞株におけるレセプターの発現について調べた結果、bFGF 刺激を受けた 1-17 細胞のみ FGF receptor 1 の発現が減少していた。この結果から、歯根膜幹細胞の中でも分化に応じて、FGF レセプターの発現様式が異なっており、そのため FGF に対する反応が異なっていることが示唆された。また歯根膜細胞は、FGF レセプターの発現調整を行うことによって、分化を調節していることが考えられた。

つぎに TGF- β 1 は、歯根膜細胞に対して、セメント芽細胞/骨芽細胞誘導は抑制し、一方その増殖を促進し、Type I collagen (Col I) の発現を促進することが報告されている。そこで、歯根膜組織における TGF- β 1 の発現様式について、免疫組織化学的に検討した結果、TGF- β 1 は歯根膜組織全体にわたって、発現しており、比較対象とした歯髓組織では象牙芽細胞にわずかに発現が認められる程度であった。また初代培養を行った歯根膜細胞においても TGF- β 1 の発現が確認された。さらに 2 種の歯根膜幹細胞株による TGF- β 1 レセプターの発現について検討したところ、両細胞株ともに TGF- β 1 receptor type I ならびに type II を発現していたことから、歯根膜細胞が分泌した初代培養の歯根膜細胞においても TGF- β 1 が歯根膜幹細胞に作用する可能性が推察された。そこで、1-11 細胞株ならびに 1-17 細胞株の培養系に TGF- β 1 を添加したところ、alpha-smooth muscle actin (α -SMA), Col I, そして Fibrillin 1 (FBN 1) の発現が上昇することが明らかになった。また、骨関連タンパクの発現は刺激による誘導は認められなかった。 α -SMA は機械的刺激などにさらされた機能している歯根膜細胞

に発現し、Col I は歯根膜線維の主要な線維であり、また FBN 1 は歯根膜組織中の弾性線維の主要な microfibril であることから、TGF- β 1 によって刺激を受けた歯根膜幹細胞は、セメント芽細胞/骨芽細胞への分化よりも線維芽細胞へ分化することが示唆された。

さらに今回、心筋細胞に影響を及ぼすことが知られている angiotensin II (AngII) が、機械的刺激を受けた歯根膜細胞において発現し、AngII は type I collagen, fibrillin, TGF- β 1 の発現を増大させることが明らかになった。この結果から、AngII は歯根膜組織再生に関わる形態形成因子の候補としてあげられることが示唆された。

また Wnt3a ならびに Wnt7b の影響について検討したが、歯根膜組織再生に関わる顕著な効果は検出できなかった。

・歯根膜幹細胞の機能

最後に歯根膜幹細胞が有している機能について解析を行った。

組織の再生には、目的の組織の再生のみならず、神経ならびに血管の再生も必要とされる。そこで私たちは、歯根膜幹細胞が神経細胞分化、遊走ならびにアポトーシスに及ぼす影響について検討することにした。神経細胞分化には、ラットの褐色細胞腫由来で Nerve Growth Factor (NGF) の存在下で神経細胞へ分化することが知られている PC12 細胞を用いた。

PC12 細胞を、1-17 細胞株の培養上清と共に 1 週間培養したところ、PC12 細胞が神経細胞へ分化することが明らかになった。この実験系に抗ヒト NGF 中和抗体を添加した際には、PC12 細胞の分化が抑制されたことから、1-17 細胞株が NGF を分泌していることが示唆された。

つぎに 1-17 細胞株の培養上清が PC12 細胞の遊走に及ぼす影響について検討した。その結果、1-17 細胞株の培養上清を添加した群は、NGF 添加群と同様に遊走が亢進した。また、1-17 細胞株が合成する他の神経栄養因子である NT-3 を添加し検討したが、NT-3 には PC12 細胞の遊走能を促進する効果は認められなかった。さらに 1-17 細胞株の培養上清を添加した群に抗 NGF 中和抗体を添加すると、PC12 細胞の遊走は抑制されることが明らかになった。そこで、1-17 細胞株の培養上清に含まれる NGF 量を ELISA 法を用いて解析した結果、45pg/ml の NGF が含まれていることがわかった。一方、1-11 細胞株の培養上清には 20pg/ml の NGF が含まれていた。さらに 1-17 細胞株の培養上清を、PC12 細胞のアポトーシス誘導実験系に添加すると、アポトーシスが減弱されることが分かった。この結果においても、上清中の NGF が関与していることが明らかになった。これまでの報告の中で、

ヒト、マウスそしてラットの間葉系幹細胞が生物学的活性のある NGF を分泌することが報告されている。したがって、今回の研究結果から、ヒト歯根膜幹細胞株においても生物学的活性のある NGF が分泌されており、神経細胞の分化、遊走ならびにアポトーシス抑制へ関与していることが示唆された。

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 13 件)

Maeda H, Nakano T, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Hori K, Akamine A. Mineral Trioxide Aggregate Induces Bone Morphogenetic Protein-2 Expression and Calcification in Human Periodontal Ligament Cells. 査読有り J Endod (in press)

Yasuda Y, Tatematsu Y, Fujii S, Maeda H, Akamine A, Torabinejad M, Saito T. Effect of MTAD on the differentiation of osteoblast-like cells. 査読有り J Endod 36(2):260-263, 2010.

前田英史, 友清淳, 藤井慎介, 島一也, 和田尚久, 門野内聡, 堀清美, 中野嗣久, 吉嶺嘉人, 赤峰昭文. MTA がヒト歯根膜線維芽細胞に及ぼす影響に関する研究 査読有り 日歯保存誌 52(4):355-362, 2009.

Yasuda Y, Inuyama H, Maeda H, Akamine A, Nör JE, Saito T. Cytotoxicity of one-step dentin-bonding agents toward dental pulp and odontoblast-like cells. 査読有り J Oral Rehabil 35(12):940-946 2008

Kano Y, Horie N, Doi S, Aramaki F, Maeda H, Hiragami F, Kawamura K, Motoda H, Koike Y, Akiyama J, Eguchi S, Hashimoto K. Artepillin C derived from propolis induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via ERK and p38 MAPK pathways. 査読有り Neurochem Res 33(9):1795-803 2008

Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. 査読有り J Cell Physiol 215 巻 743-749 2008

Tomokiyo A, Maeda H, Fujii S, Wada N, Shima K, Akamine A. Development of a

multipotent clonal human periodontal ligament cell line. 査読有り Differentiation 76 巻 337-347 2008

他 6 件

〔学会発表〕(計 24 件)

Maeda H, Fujii S 他 7 名: What are the characteristics of PDL stem cells? The 5th International Symposium on "Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration: A View from Stem Cell Researches". Feb.5, 2010 Centennial Hall, Kyushu University School of Medicine, Fukuoka, Japan

Monnouchi M, Maeda H 他 4 名: Angiotensin II mediates the loading signal in human periodontal ligament cells. The 5th International Symposium on "Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration: A View from Stem Cell Researches". Feb.5, 2010 Centennial Hall, Kyushu University School of Medicine, Fukuoka, Japan

Monnouchi M, Maeda H 他 4 名: Angiotensin II is involved in the loading signal in stretched human PDL cells. 3rd Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry. Nov. 7-8, 2009 International Conference Center in Peace Memorial Park, Hiroshima, Japan

前田英史: 歯根膜幹細胞はどんな特徴を持っているのだろうか? 第 51 回歯科基礎医学会サテライトシンポジウム 2009 年 9 月 9 日 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター 新潟市

友清淳, 前田英史 他 6 名: AhR シグナルがヒト歯根膜細胞のコラーゲン代謝に及ぼす影響. 第 131 回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2009.10.29-30. 仙台

藤井慎介, 前田英史 他 6 名: TGF- β 1 がヒト歯根膜細胞および前駆細胞の増殖および分化に及ぼす影響. 第 130 回日本歯科保存学会春季学術大会. 2009.6.11-12. 札幌

門野内聡, 前田英史 他 4 名: 伸展力が負荷されたヒト歯根膜細胞のシグナル伝達には Angiotensin II が関与している. 第 130 回日本歯科保存学会春季学術大会. 2009.6.11-12. 札幌

S. FUJII, H. MAEDA, 他 5 名: Expression

and effects of TGF -1 in periodontal ligament tissue. 87th General Session & Exhibition of the IADR/AADR/CADR. April 1-4, 2009 MIAMI, USA

H. MAEDA, A. TOMOKIYO 他 5 名 : MTA stimulates BMP2 expression in human PDL cells. 87th General Session & Exhibition of the IADR/AADR/CADR. April 1-4, 2009 MIAMI, USA

前田英史、友清淳他 6 名 : MTA が歯根膜細胞の分化に及ぼす影響に関する研究 . 第 21 回日本歯科医学会総会 . 2008.11.14-16. 横浜

前田英史、友清淳 他 7 名 : MTA はヒト歯根膜細胞の BMP2 発現を誘導する . 第 129 回日本歯科保存学会 . 2008.11.6-7. 富山

MAEDA H, TOMOKIYO A 他 5 名 : Calcium-releasing Agent Exhibits Bioactive Effects in Endodontic Therapy. 2nd World Conference on Magic Bullets (Ehrlich II). Oct. 4, 2008, Nurnberg, Germany

H. MAEDA, A. TOMOKIYO, 他 5 名 : MTA induces mineralization of human periodontal ligament cells. 86th General Session & Exhibition of the IADR/AADR/CADR. 2008. 7.2-5 Toronto, Canada

A. TOMOKIYO, H. MAEDA 他 4 名 : A Multipotent hPDL Cell Line Promotes Neurocytic Differentiation and Migration. 86th General Session & Exhibition of the IADR/AADR/CADR. 2008. 7.2-5 Toronto, Canada

前田英史、中野嗣久 他 5 名 : MTA はヒト歯根膜細胞の骨芽細胞様分化を誘導する . 第 128 回日本歯科保存学会 . 2008.6.5-6. 新潟

友清淳、前田英史 他 4 名 : 多分化能を有するヒト歯根膜クローン細胞株が神経細胞分化及び細胞遊走に及ぼす影響 . 第 128 回日本歯科保存学会 . 2008.6.5-6. 新潟

島一也、前田英史 他 6 名 : EDTA、クエン酸または超音波を用いた根管洗浄後の根管象牙質の SEM 観察 . 第 28 回日本歯内療法学会学術大会 . 2007.5.26-27. 広島

前田英史 : 歯根膜組織の発生とヒト歯根膜幹細胞株の樹立について 再生歯科医学シンポジウム 2007 年 4 月 12 日、福岡市

他 6 件

〔図書〕(計 1 件)

前田英史 共著 : 「保存修復学専門用語集」
日本歯科保存学会編 医歯薬出版
2009 年 3 月発行 総ページ数 118

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
該当なし

取得状況 (計 0 件)
該当なし

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

前田英史 (MAEDA HIDEFUMI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号 : 10284514

(2) 研究分担者

赤峰昭文 (AKAMINE AKIFUMI)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号 : 00117053

藤井慎介 (FUJII SHINSUKE)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 60452786

友清淳 (TOMOKIYO ATSUSHI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 20507777

(3) 連携研究者

該当なし

()

研究者番号 :