

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 ~ 2008
 課題番号：19791543
 研究課題名（和文）不死化させた歯胚細胞を用いた歯再生に関する基礎的研究

研究課題名（英文）
 Tooth regeneration by immortalized dental cells

研究代表者 吉澤 泰昌
 昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90433812

研究成果の概要：歯はエナメル芽細胞、象牙芽細胞、歯髄細胞、歯根膜細胞などが相互作用を及ぼして形成されていくものと考えられる。したがって、歯の再生を考える上ではまず始めに、歯胚からこれらの性質を備えた細胞を分離し、その細胞間相互作用を明らかにすることが重要である。そこで、私たちは細胞の不死化に着目し、それらの性質を有する細胞間の相互作用について分子生物学的に解析した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3200000	0	3200000

研究分野：

科研費の分科・細目：医歯薬学・歯学・外科系歯学

キーワード：歯牙再生

エナメル芽細胞
 象牙芽細胞
 歯根膜細胞
 共存培養

1. 研究開始当初の背景

歯の再生を考える上ではまず始めに、歯胚からエナメル芽細胞、象牙芽細胞、歯髄細胞、歯根膜細胞の性質を備えた

細胞を分離し、その細胞間相互作用を明らかにすることが重要である。しかし、これら細胞間相互関係を解明するには再現性のある細胞が必要となる。また、歯胚細

胞は癌細胞とは異なり正常細胞であるため、増殖能力に限界があり継代しても、半永久的に使用すること不可能である。そこで、私たちは細胞の不活化に着目し、樹立した不活化歯胚細胞の篩い分けを行い、それぞれの細胞群間の相互作用について解析することとなった。

2. 研究の目的

- (1) 歯胚細胞の不活化と分化した細胞の篩い分け
- (2) 篩い分けられた細胞のサイトカインによる細胞分化、増殖への影響
- (3) 篩い分けられた細胞群間での相互作用の解析

3. 研究の方法

- (1) 不活化ヒト歯胚細胞の樹立と分化した細胞の篩い分け

矯正治療にて根末完成智歯の抜歯が必要となった患者からヒト歯胚細胞を type I collagenase および Dispase I を用いて single cell とする。

それぞれの single cell に DNA 腫瘍ウイルス (SV40) を導入し不活化ヒト歯胚細胞を樹立する。

樹立した不活化ヒト歯胚細胞を single cell にして、培養 dish 上に播種。

single cell colony 形成後、それぞれの細胞集団の mRNA を回収しエナメルイン、ホスホホリンの発現を RT-PCR 法にて解析しアメロゲニンを発現している細胞群をエナメル芽細胞様細胞、ホスホホリンを発現している細胞群を象牙芽細胞様細胞とした。

- (2) 篩い分けた細胞群に FGF-2、BMP-2、BMP-4、ectodin を連日投与し、培養 1、3、7、14、21、28 日目まで細胞を回収して mRNA およびタンパク質を抽出し、アメロゲニン、ホスホホリン、I 型コラーゲン、アルカリフォスファターゼのウエスタンブロット法および RT-PCR 法にて解析した。
- (3) single cell colony を用いて、それぞれの細胞群をコラーゲン膜を介して共存培養を行い、BMP-2、BMP-4、ectodin、FGF-2、をそれぞれ添加して、遺伝子発現について解析した。

4. 研究成果

- (1) 矯正治療のため便宜抜歯が必要と診断された患者から歯胚を取り出し、single cell として分離し、DNA 腫

瘍ウイルス (SV40) を導入し不活化ヒト歯胚細胞を樹立した。

- (2) single cell より colony を形成し篩い分けられた、それぞれの細胞群に BMP-2、BMP-4、FGF-2、ectodin を添加した結果、BMP-2 および BMP-4 添加により、エナメル芽細胞様細胞および象牙芽細胞様細胞のアメロゲニンおよびホスホホリンのタンパク質の発現の増強が認められた。

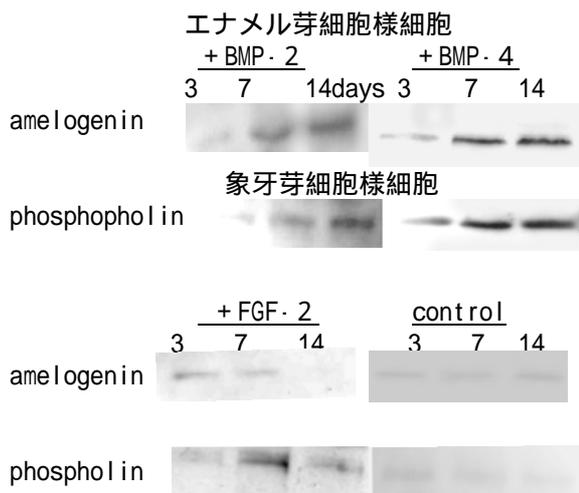


図1 BMP-2 および BMP-4 添加によるエナメル芽細胞様、象牙芽細胞様細胞のアメロゲニンおよびホスホホリンのタンパク質発現変化

- (3) FGF-2 はエナメル芽細胞様細胞および象牙芽細胞様細胞の分化促進には影響を与えないが、BMP-2 や BMP-4 に比べて増殖を促進した。

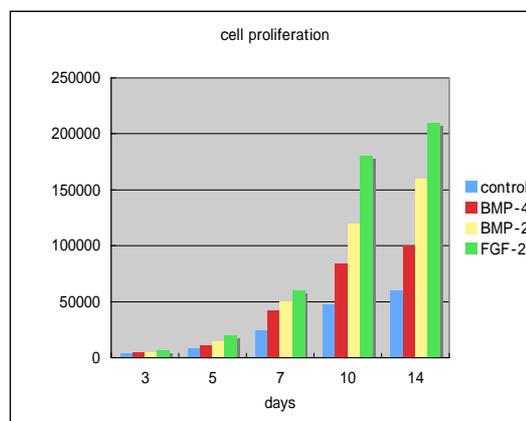


図2 BMP-2、BMP-4、FGF-2 添加によるエナメル芽細胞および象牙芽細胞の細胞増殖について

(4) 今回の実験において ectodin は細胞増殖およびエナメル芽細胞様、象牙芽細胞様細胞の成熟・分化に影響を及ぼさなかった。

(5) エナメル芽細胞様および象牙芽細胞様細胞に、FGF-2, BMP-2, BMP-4 をそれぞれ添加し、アルカリフォスファターゼ活性を測定したところそれぞれの細胞群で BMP-2 および BMP-4 添加にてその活性の促進が認められた。

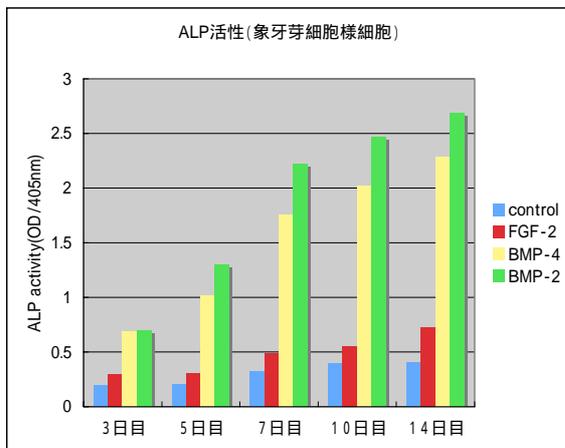
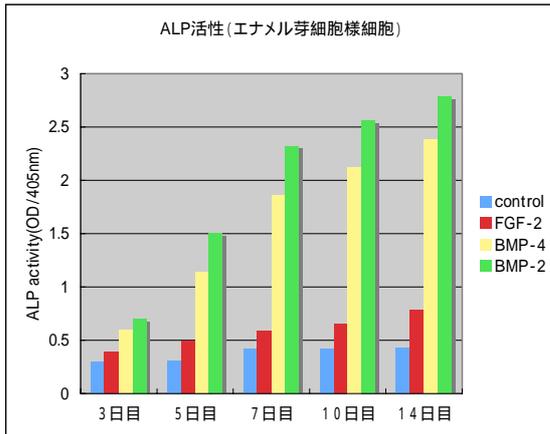


図3 BMP-2、BMP-4、FGF-2添加によるエナメル芽細胞および象牙芽細胞のALP活性

(6) エナメル芽細胞様および象牙芽細胞様細胞の single cell colony を用いて、それぞれの細胞群をコラーゲン膜を介して共存培養を行い、BMP-2, BMP-4, ectodin, FGF-2, をそれぞれ添加して、遺伝子発現について解析したところそれぞれ単独の細胞群では、BMP-2 および BMP-4 の存在下でなければ、それぞれの細胞への成熟が促進されなかったが、共存培養することにより、BMP

-2、BMP-4 非存在下でも amelogenin および phosphopholin の遺伝子発現が增強された。

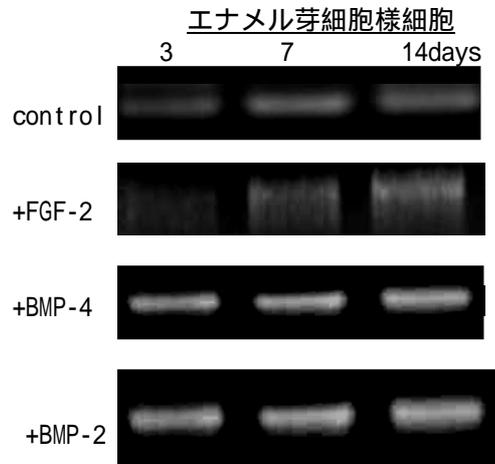


図4 共存培養時に FGF-2、BMP-2、BMP-4 を添加した時の amelogenin の遺伝子発現変化

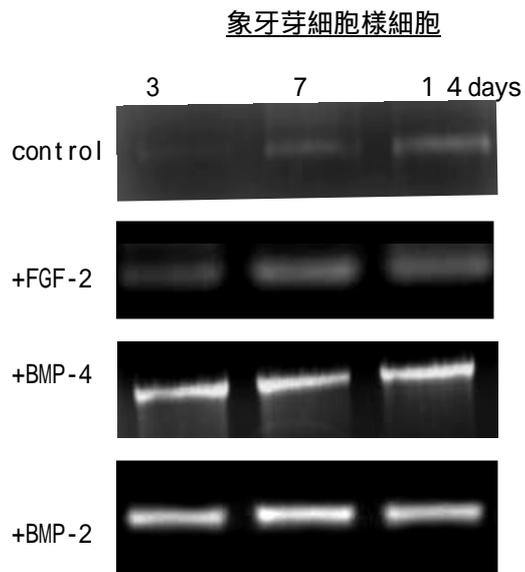


図5 共存培養時に FGF-2、BMP-2、BMP-4 を添加した時の Phosphopholin の遺伝子発現変化

(7) 以上より、篩い分けられた、エナメル芽細胞様細胞、象牙芽細胞様細胞は単独では BMP-2 および BMP-4 にて成熟・分化が促進されるが、コラーゲン膜を介した共存培養では、BMP-2 または、

BMP-4 を添加しなくても分化が促進され、共存培養中に BMP-2 および BMP-4 を添加することによりさらに分化が促進された。

(3)連携研究者

(8) 今後は、エナメル芽細胞様細胞および象牙芽細胞様細胞の間でのシグナル伝達経路を解析していく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉澤 泰昌 (YOSHIZAWA YASUMASA)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90433812

(2)研究分担者