

機関番号：33902

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592244

研究課題名 (和文) ヒト骨格筋幹細胞を用いた象牙質再生と新規な幹細胞導入治療法の開発

研究課題名 (英文) Regeneration of dentin by human skeletal muscle stem cells and developments of new therapies using stem cell injections.

研究代表者

中田 和彦 (NAKATA KAZUHIKO)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：70261013

研究成果の概要 (和文)：ヒト骨格筋幹細胞を用いた象牙質再生を目的に、象牙芽細胞分化誘導メカニズムについて基礎的検討を行った。その結果、レチノイン酸 (RA) と BMP (bone morphogenetic protein) -4 による象牙芽細胞分化誘導法により、長楕円型への明瞭な形態学的変化と象牙質分化マーカーである象牙質シアロリントタンパク質 (DSPP) と Enamelysin が観察された。また、細胞表面タンパク integrin  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 1$  と  $\alpha V\beta 3$  の発現が観察され、歯髄創傷治癒過程に関与するコラーゲンタイプ I に対して強い接着能と運動能を有することが明らかとなった。さらに、象牙芽細胞に分化誘導した細胞のラット移植実験において、象牙質シアロタンパク質 (DSP) 陽性細胞と骨様象牙質が観察された。

研究成果の概要 (英文)：We have examined the mechanism of human skeletal muscle stem cells differentiation to odontoblasts for the purpose of dentin regeneration. Morphological analysis indicated that retinoic acid (RA) and bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) induced differentiation to the odontogenic pathway. Differentiated cells showed DSPP and Enamelysin; both markers of odontoblast differentiation. We also found significant integrin  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 1$  and  $\alpha V\beta 3$  expression with increased adhesion and motility on collagen type-I substrates. These interactions with the extracellular matrix (ECM) are indicative of dental pulp wound healing. Moreover, differentiated cells was injected showed DSP and osteo-dentin in rats.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2009 年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 2010 年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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：体性幹細胞, ヒト骨格筋幹細胞 (h-SMSCs), 象牙芽細胞, 象牙質再生

## 1. 研究開始当初の背景

う蝕によって失われた歯の形態・機能・審美性を回復するためにメタル、ガラスイオノマーセメント、コンポジットレジン、セラミックなどの人工材料を使用するのが一般的であるが、近年、これらの人工材料に代わ

り、失われたエナメル質や象牙質などの歯質や歯そのものの再生を治療目的とする再生療法の研究開発が進んでいる。興味深いことに、歯髄組織はう蝕や修復処置などの物理的・化学的な刺激により象牙質を再生することができる潜在能力を有し、さらに歯髄前駆

体細胞あるいは歯髄幹細胞などが象牙質の再生に関与することが示唆された。

このような背景から幹細胞、特に移植時の免疫性の問題や、ES細胞の使用に比べ倫理的問題が少ないとされる自身の体性幹細胞を用いた細胞導入治療法が、将来のう蝕治療法や覆髄法に有効な手段となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

ヒト骨格筋幹細胞 (h-SMSCs) を用いた細胞導入治療法が、将来のう蝕治療法や覆髄法に有効な手段となる可能性があると考え、ヒト骨格筋幹細胞を用いた象牙質再生のメカニズムについて詳細な基礎的検討を行う。

本研究の具体的到達目標は、(1) h-SMSCs を用いた象牙芽細胞分化へのメカニズムについて検討を行うこと。(2) マウスを用いた *in vivo* の実験系において、大腿骨表層と切歯生活歯髄切断面に象牙質の再生を観察することである。以上2項目に関して詳細な基礎的検討を行い、将来的には新規な治療戦略、特に非侵襲的な治療法の構築を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) h-SMSCs の象牙芽細胞分化誘導

抗  $\alpha 7$  integrin 抗体と FACS を用いて分取した  $\alpha 7$  integrin 陽性細胞 (カリフォルニア大学サンフランシスコ校から供与) に hanging drop 法を施した後、RA (レチノイン酸) 存在下で3日間、浮遊培養させ、その後、コラーゲン上に細胞を播種し、BMP-4 存在下で7日間培養を行い、象牙芽細胞分化誘導を行う。

### (2) h-SMSCs の象牙芽細胞分化誘導の評価

① 分化誘導した h-SMSCs の 1、3、5、7 日目での形態学的変化を光学顕微鏡下で観察を行う。

② 分化誘導した h-SMSCs から total RNA 抽出し、象牙芽細胞分化マーカーである DSPP (象牙質シアロリタンパク質)、Enamelysin の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて観察を行う。

③ 象牙芽細胞分化マーカーである DSP (象牙質シアロタンパク質) の発現を蛍光免疫染色法を用いて観察を行う。

④ 分化誘導した h-SMSCs の石灰化能を ALP 染色と Alizarin Red-S 染色により観察を行う。

(3) 象牙芽細胞分化誘導前後の細胞表面タンパク integrin の発現変化を FACS を用いて観察を行う。さらに、integrin の発現変化が遺伝子レベルで制御されているか否かをプロモーター assay で評価する。

(4) 歯髄創傷治癒に関与する細胞外マトリックス (ラミニン、コラーゲンタイプ I) に対する細胞接着能と運動能の検討を行う。

(5) *in vivo* において、分化誘導した h-SMSCs を用いた象牙質再生の観察を行う。分化誘導した7日目の象牙芽細胞を、8週齢の雄性ウイスターラット ST の上顎切歯生活歯髄切断面に移植する。移植2週後に上顎切歯を摘出し、通法に従い4% パラホルムアルデヒド固定と10% ギ酸による脱灰を行い、パラフィン切片を作成する。HE染色による形態学的観察と象牙質に特異的なマーカーである DSP の発現を免疫染色法を用いて観察する。

## 4. 研究成果

### (1) h-SMSCs の象牙芽細胞分化誘導の評価

#### ① 形態学的変化について

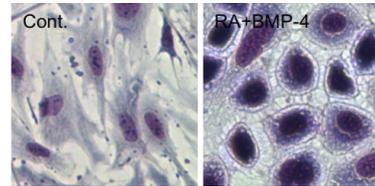


図1 象牙芽細胞分化誘導における形態学的変化

RA と BMP-4 による象牙芽細胞分化誘導により紡錘型から長楕円型への明瞭な形態学的変化が観察された。

#### ② 象牙芽細胞分化マーカー DSPP、Enamelysin 遺伝子の発現について

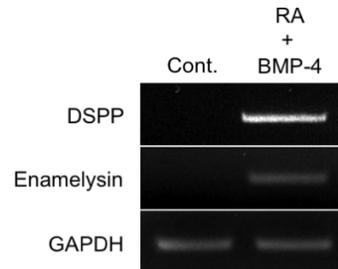


図2 象牙芽細胞分化マーカーの mRNA 発現

RA と BMP-4 による象牙芽細胞分化誘導により著明な DSPP と Enamelysin の遺伝子発現が観察された。

#### ③ 象牙芽細胞分化マーカー DSP タンパクの発現について

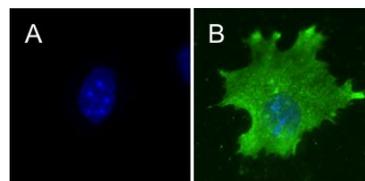


図3 象牙芽細胞分化マーカーのタンパク質発現  
(A: cont., B: RA+BMP-4)

RA と BMP-4 による象牙芽細胞分化誘導により長楕円型の DSP 陽性細胞が観察された。

④石灰化能について

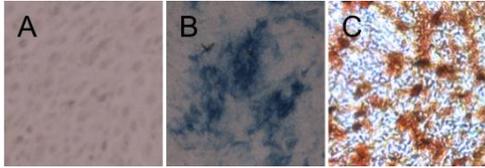


図4 石灰化能の解析  
(A: cont., B: ALP 染色, C: Alizarin Red-S 染色)

RA と BMP-4 による象牙芽細胞分化誘導により、ALP 染色と Alizarin Red-S 染色陽性細胞が観察され、さらに石灰化結節の形成が認められた。

(2) Integrin の発現について

①象牙芽細胞分化誘導前後の細胞表層タンパク integrin の発現変化について

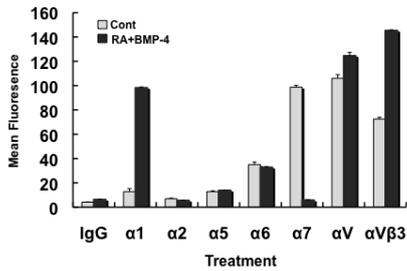


図5 FACS による細胞表層 integrin の発現解析  
(縦軸: Mean Fluorescence, gray bar: cont., black bar: RA+BMP-4)

h-SMSCs には細胞表層タンパク α7 integrin に加え、α6、αV と αVβ3 integrin の恒常的な発現が観察された。さらに、RA と BMP-4 による象牙芽細胞への分化誘導により、α7 integrin の著明な発現減少と α1 integrin に加え、αV と αVβ3 integrin の発現増加が観察された。

②Integrin 発現の制御機構について

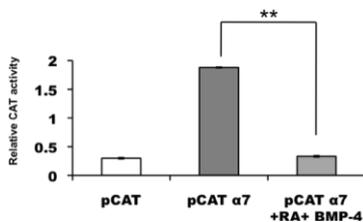


図6 プロモーターアッセイによる integrin 制御解析

多分化能を有したマウス C2C12 細胞と α7 integrin プロモーターを使用したプロモーター assay において、RA と BMP-4 による integrin の発現変化が遺伝子転写レベルで制御されていることが推測され、象牙芽細胞分化に integrin を介したシグナルカスケードの存在の可能性が示唆された。

(3) 細胞外マトリックス (ラミニン、コラーゲンタイプ I) に対する細胞接着能と運動能について

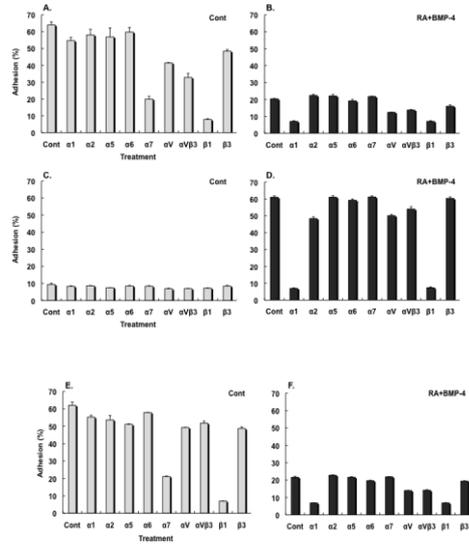


図7 細胞接着能

h-SMSCs は細胞外マトリックスであるラミニン-1 (A. cont., B. RA+BMP-4)、-2 (E. cont., F. RA+BMP-4) に対して約 60%の接着能を示し、象牙芽細胞への分化誘導により、その接着能は 20%にまで減少した。コラーゲンタイプ I (C. cont., D. RA+BMP-4) に対しては、約 10%の接着能しか示さなかったが、象牙芽細胞への分化誘導により、その接着能は 60%にまで増加することが明らかになった。

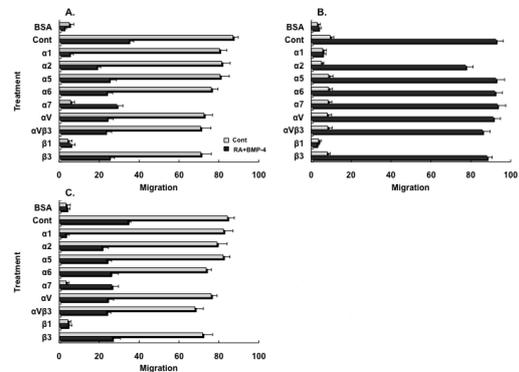


図8 細胞接着能

h-SMSCs の細胞外マトリックスに対する運動能の解析において、ラミニン-1 (A. gray bar: cont., black bar: RA+BMP-4)、-2(C. gray bar: cont., black bar: RA+BMP-4) に対して高い運動能を示し、象牙芽細胞への分化誘導により、その運動能は約 40%にまで減少した。また、コラーゲンタイプ I (B. gray bar: cont., black bar: RA+BMP-4) に対してほとんど運動能を示さなかったが、象牙芽細胞への分化誘導により、その運動能は約 9 倍にまで増加することが明らかになった。

(4) in vivo における象牙質再生について



図 9 in vivo における象牙質再生

象牙芽細胞に分化誘導した h-SMSCs の移植群では、著明な DSP 陽性細胞と骨様象牙質が観察された。

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)

尾関伸明、川合里絵、田中 毅、石塚恭子、中田和彦、中村 洋、 $\alpha 7$  integrin 陽性骨格筋幹細胞の象牙質分化能、日本歯科保存学雑誌、査読有、52 巻 (4)、2009、319~329

[学会発表] (計 2 件)

- ① 尾関伸明 他、 $\alpha 7$  integrin 陽性ヒト骨格筋幹細胞の象牙質分化能、第 75 回 愛知学院大学歯学会、2009.12.6, 名古屋
- ② N.Ozeki et al., Odontogenic potential of  $\alpha 7$  integrin-positive human skeletal muscle stem cells, International Association for Dental Research, 2010.7.17, Barcelona, Spain

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 和彦 (NAKATA KAZUHIKO)  
愛知学院大学・歯学部・講師  
研究者番号：70261013

(2) 研究分担者

中村 洋 (NAKAMURA HIROSHI)  
愛知学院大学・歯学部・教授  
研究者番号：40064878  
尾関 伸明 (OZEKI NOBUAKI)  
愛知学院大学・歯学部・講師  
研究者番号：70469005

(3) 連携研究者

なし