

機関番号：30110

研究種目：基盤研究（c）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592341

研究課題名（和文）ヒト歯髄の神経・硬組織関連因子の解析と組織工学

研究課題名（英文）analyses of nerve- and hard tissues-related factors in human dental pulp and tissue engineering using pulp tissues.

研究代表者

有末 眞 (ARISUE MAKOTO)

北海道医療大学歯学部・教授

研究者番号：20091407

研究成果の概要（和文）：

1. 歯を開発した電動粉碎装置に入れると 3 秒で歯が割れ、歯髄の採取が可能な状態になった。本法は数歯から一度に歯髄を採取できる革新的歯髄採取技術である。
2. ヒト歯髄の全 RNA を用いて RT-PCR をおこなった結果、BMP-2, -4, -6, -7 mRNA の発現が認められた。
3. 歯髄由来タンパク質の SDS 還元溶解液に対して、抗 BMP-2 抗体で免疫ブロット解析した結果、分子量 50 kDa にメインバンドが現れた。NGF と HGF も免疫ブロットで同定した。
4. 抗菌処理したヒト歯髄はヌードマウス背部皮下組織内で移植 8 週後に骨を誘導した。

研究成果の概要（英文）：

1. Using our developed, electric tooth-mill, teeth were crushed for 3 seconds, and we could obtain dental pulps quickly. This novel method is an innovative technique to be able to obtain pulps at once from several teeth.
2. The expressions of BMP-2, -4, -6, and -7 mRNAs were detected in human dental pulps by RT-PCR.
3. In the reduced condition, human dental pulp-derived proteins revealed a main band at 50 kDa. NGF and HGF were also detected by immunoblotting.
4. Human pulp after treatment of antibiotics induced bone in the back skin of nude mice at 8 weeks after transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ヒト、歯髄、神経、遺伝子、BMP

## 1. 研究開始当初の背景

近年、骨髄幹細胞を使用した組織再生研究が急速に発展しつつある。2003 年ヒト成人歯髄組織に多分化能を有する幹細胞の存在

が発見された。歯髄組織は骨髄同様に骨欠損の再生治療などにその応用が期待されている。さらに歯髄組織は現実的な幹細胞供給源として、脊椎・脳神経外科領域における神

経再生研究や再生医療においても注目されるようになった。歯髄の BMPs 研究では、1994 年ヒト歯髄由来の培養細胞に BMP-2, BMP-4, BMP-6 の mRNA 発現がはじめて報告された。1996 年培養していないヒト歯髄組織においても BMP-2, BMP-4, BMP-7(OP-1) の mRNA 発現が確認された。現在まで、ヒト歯髄に対する遺伝子レベルの研究報告はみられるものの、タンパク質レベルの基礎研究はなされていない。

## 2. 研究の目的

ヒト歯髄組織中の BMPs および硬組織関連遺伝子の解析とヒト歯髄による骨誘導の組織学的観察

## 3. 研究の方法

### (1) total RNA の抽出および reverse transcription (RT)

ヒト歯髄組織から、TRIzol Reagent を用い、AGPC 法により total RNA を抽出した。TRIzol Reagent 1ml を歯髄組織に加え、ダウンスホモジナイザーを用いてホモジナイズした。液を 1.5 ml チューブに移しクロロホルム 200  $\mu$ l を加え遠心し (12000 rpm, 4°C で 30 分間), 3 層に分離した。3 層の中で最も上層の RNA 層を RNAase Free のチューブに移した後、2-プロパノールを 500  $\mu$ l 加え、室温で 10 分間反応させ遠心した (12000 rpm, 4°C で 10 分間)。上澄を除去後、70% エタノールを 200  $\mu$ l 加えてよく混和し、遠心分離をおこなった (12000 rpm, 4°C で 5 分間)。エタノール除去後、ペレットを 5 分間乾燥させ、10  $\mu$ l の DEPC water に溶解した。total RNA 量は吸光度計を用いて測定し、1 $\mu$ g の total RNA と SuperScript III を用いて RT をおこない cDNA を作製した。

### (2) ヒト BMP および硬組織関連遺伝子の発現検討

コンベンショナル PCR は、材料および方法 3 で合成した 1 $\mu$ l の RT 産物を鋳型とし、耐熱性 polymerase に Platinum Taq および KOD plus を用いた。

ヒト BMP-2 およびヒト BMP-4 は、Platinum Taq を用いて heat denature : 94°C, 30 秒, annealing : 52°C, 30 秒, extention : 72°C, 30 秒の条件下でサイクル数を 35 回でおこない、ヒト BMP-6 は KOD plus を用いて heat denature : 94°C, 30 秒, annealing : 56°C, 30 秒, extention : 68°C, 30 秒の条件下でサイクル数を 35 回とした。またヒト BMP-7 は KOD plus を用いて、heat denature : 94°C, 30 秒, annealing : 56°C, 30 秒, extention : 68°C, 45 秒の条件下でサイクル数を 35 回とした。また、硬組織関

連遺伝子であるアルカリフォスファターゼ (ALP), オステオポンチン (OPN), オステオカルシン (OCN), 象牙質シアロタンパク質 (DSP), 象牙質マトリックスタンパク質-1 (DMP-1) は Platinum Taq を用いて heat denature : 94°C, 30 秒, annealing : 58°C, 30 秒, extention : 72°C, 30 秒の条件下でサイクル数を 35 回でおこなった。PCR 産物は、135V, 15 分間 1.5% agarose gel を用いて電気泳動して分離した。

### (3) ウェスタンブロッティングによる

#### BMP-2 タンパク質の検出

ヒト歯髄組織を SDS sample buffer 100 $\mu$ l で溶解し、5 分間煮沸した。煮沸後サンプル 20 $\mu$ l を PAGE ゲルで電気泳動をおこない (298 V, 30 mA, 55 分), 泳動終了後にタンパクを PVDF 膜に転写した。転写した PVDF 膜を Block Ace を用いて常温で 2 時間ブロッキングした。一次抗体として抗 BMP-2 抗体 (R&D, Minneapolis, MN, U. S. A.) を常温で 2 時間反応させ、PBS-T を用いて 10 分間洗浄を 3 回おこなった。二次抗体には goat anti-mouse IgG を室温で 1 時間反応させ、さらに PBS-T にて 10 分間洗浄を 3 回おこなった後、ECLTM plus を 5 分間反応させ、LightCapture を用いて検出した。

### (4) 生物検定

免疫不全マウス (ヌードマウス, 雄性, 4 週齢) 背部に約 10 mm の切開を加え、皮下結合組織を鈍的に剥離してポケットを形成した。移植物を切開創から 10 mm の距離をとって挿入し、創部をナイロン糸で 1 針縫合して、閉鎖創とした。8 週後に摘出し、ヘマトキシリン-エオジン染色後に観察した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト歯髄組織中の BMP および硬組織関連遺伝子の発現

ヒト歯髄組織より抽出した total RNA を用い、RT-PCR 法により BMP および硬組織関連遺伝子の発現を検討した結果、ヒト歯髄組織には BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 および硬組織関連遺伝子である ALP, OPN, OCN, DSP, DMP-1 mRNA が発現していた。

### (2) ヒト歯髄組織中の BMP-2 および BMP-4 mRNA の定量

RT-PCR 解析で使用したものと同一サンプルを用いて、ヒト歯髄組織に存在する BMP-2 mRNA と BMP-4 mRNA の定量を行なった。mRNA はそれぞれのヒト BMP の cDNA を用いて検量線を作製し、それと比較することで定量した。ヒト歯髄組織には

BMP-2 は total RNA 1 $\mu$ g 当たり 0.035 a mol, BMP-4 は total RNA 1 $\mu$ g 当たり 0.270 a mol 存在していた。

- (3) ヒト歯髄組織における BMP-2 タンパク質の同定  
ヒト歯髄組織の組織抽出液を使用して、還元条件下で SDS-PAGE をおこない、ウエスタンブロッティング法（抗ヒト BMP-2 モノクローナル抗体, R&D 社）により BMP-2 タンパク質を検出した。強いシグナルを示すバンドが 50kDa の位置に、弱いシグナルのバンドが 32kDa, 25kDa, および 16kDa の位置に検出された。  
生理的状態の歯髄には BMP-2 が主に未熟型で存在していたことから、カリエスなどのストレス刺激により、未熟型 BMP-2 が活性型になるものと考えられる。
- (4) NGF（神経栄養因子）と HGF（肝細胞増殖因子）の同定  
NGF と HGF をウエスタンブロッティング法で検出した。歯髄における HGF の同定は、文献検索より初めてであり、科学的意義が大きい。血管再生に使用可能と考える。NGF が高濃度に存在していたことから、神経再生に使用可能と考える。
- (5) フローサイトメトリーによる歯髄細胞分析  
細胞表面抗原（CD105, STRO-1）に関する情報をインプットしたフローサイトメトリーで歯髄を検索した結果、幹細胞マーカーである CD105 と STRO-1 抗原の発現が 8-10% に認められ、成体歯髄幹細胞の存在が示唆された。
- (6) ヒト抜去歯から簡便な歯髄採取方法の検討  
初年度はタービンバーを使用して歯に溝を形成後、ヘーベルで分割して採取した。この方法は切削粉塵の飛散が問題であり、歯髄採取に 25 分の時間を要した。開発した歯の電動粉碎装置を使用すると 3 秒で破碎でき、ヒト歯髄が回収可能状態になることが判明した。それは、衝撃により瞬時に歯が割れるためである。タービンバーを使用する場合は歯髄採取に 25 分かかっていたが、伝動装置により 5 分で採取可能となった。なお、採取歯髄を抗菌処理（ストレプトマイシン、ペニシリン、アムホテリシン B 含有溶液に浸漬）後、細胞増殖に成功した。従来の手動採取方法（時間：約 25 分）に比べて、電動粉碎法は圧倒的短時間（5 分）で歯髄採取が可能になった。
- (7) 免疫不全マウスを用いた生物検定系（動物実験と組織標本観察）  
歯の自動粉碎機（特許公開中：本学知的財産）での粉碎後に得られた象牙質顆粒を 2.0%硝酸で完全に脱灰した。歯髄は上

記の抗菌処理後に使用した。ヒト脱灰象牙質顆粒/除菌処理歯髄複合物をヌードマウス（4 週齢, 雄）の背部皮下に埋入した結果、8 週後に骨様象牙質の誘導現象を確認した。なお、歯髄を抗菌処理しないと免疫不全マウスのため、細菌増殖により感染が成立して、移植した歯髄細胞は融解壊死となることを組織学的に観察した。

- (8) 結論  
ヒト歯髄組織には BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 の 4 種の mRNA が発現しているが、その発現レベルは低く、BMP-2 タンパク質は主に 50kDa の前駆体の状態で存在していた。生理的状態の歯髄組織は石灰化に関して休眠状態にあ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 8 件）

- ① Masaru Murata, Makoto Arisue, et al, Human acid-insoluble dentin with BMP-2 accelerates bone induction in subcutaneous and intramuscular tissues, Journal of the Ceramic Society of Japan, 査読有, 118(6), 2010, 438-441
- ② M. Murata, T. Akazawa, J. Tazaki, K. Ito, J. Hino, Y. Kamimura, R. Kumazawa, M. Arisue, Human Dentin Autograft For Bone Regeneration - Automatic Pulverizing Machine and Biopsy -, BIOCERAMICS, 査読有, 22, 2009, 745-748
- ③ Murata Masaru, et al, Human dentin transplantation for bone engineering, Key Engineering Materials, 査読有, 361-363, 2008, 1327-1330

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① 伊藤勝敏, 村田 勝, 有末 眞ら, ヒト歯髄組織における肝細胞増殖因子の発現, 第 19 回 硬組織再生生物学会, 2010 年 9 月 4, 就実大学 (岡山)
- ② 伊藤勝敏, 村田 勝, 田崎純一, 荒川俊哉, 田隈泰信, 有末 眞, ヒト歯髄組織における BMP の発現, 第 16 回 BMP 研究会プログラム, 2009 年 7 月 26 日, 大阪大学中之島センター (大阪府)
- ③ Masaru Murata, et al, Human Demineralized Dentin Autograft for Bone Augmentation, 8th Asian BioCeramics Symposium, 2008/11/4-6, India

〔図書〕（計1件）

- ① 村田 勝、赤澤敏之，（株）メディカル  
ドゥ，「患者までとどいている再生誘導  
治療」遺伝子医学 MOOK 13 分担：第1  
章 1．細胞増殖のためのバイオマテリ  
アル，2009，308

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

有末 眞 (ARISUE MAKOTO)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：20091407

### (2) 研究分担者

村田 勝 (MURATA MASARU)  
北海道医療大学・歯学部・准教授  
研究者番号：00260662  
荒川 俊哉 (ARAKAWA TOSHIYA)  
北海道医療大学・歯学部・講師  
研究者番号：40306254  
赤澤 敏之 (AKAZAWA TOSHIYUKI)  
地方独立行政法人 北海道立総合研究機構  
産業技術研究本部 工業試験場高分子・セラミ  
ックス材料G・主幹  
研究者番号：80469692  
伊藤 勝敏 (ITOU KATUTOSHI)  
北海道医療大学・歯学部・助教  
研究者番号：50433438  
淀川 慎太郎 (YODOGAWA SHINTAROU)  
北海道医療大学・歯学部・助教  
研究者番号：60433439  
(転出のため2010年脱退)