

機関番号： 11301

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2009 ~ 2010

課題番号： 21792053

研究課題名 骨形成因子による象牙芽細胞分化メカニズムの解明と再生への応用

研究課題名 Elucidation of the Mechanism of Odontblast Differentiation by Bone Morphogenetic Factor and Application to Regeneration

研究代表者 丸谷 由里子 (MARUYA YURIKO)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号： 60400389

研究成果の概要 (和文)：

骨形成因子の一つである GDF-5 は軟骨・骨形成を促進することが報告されている。しかし、歯の発生に関する知見は少なく、GDF-5 の歯髄細胞に対する作用は不明である。

そこで、歯髄幹細胞に対する GDF-5 の影響を、象牙芽細胞への分化能に着目して検討した。

歯髄幹細胞に GDF-5 を添加し培養した群の DSPP の遺伝子発現は、GDF-5 非添加群に比較し有意な上昇が認められた。象牙芽細胞マーカーである DSPP 遺伝子の著しい発現上昇を誘導したことから、本分子は歯髄幹細胞を象牙芽細胞へ直接分化促進する作用を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

Growth/Differentiation Factor-5 (GDF-5) is a member of the bone morphogenetic protein and promotes formation of bones and cartilages. It has been reported that GDF-5 gene is expressed in oral region. However, the roles of GDF-5 in the differentiation of dental pulp cells are unknown. Thus, we investigated the effect of GDF-5 on the differentiation of dental pulp stem cell.

GDF-5 promoted production of molecules characteristic for odontoblastic phenotype. These findings suggested that GDF-5 promotes differentiation of dental pulp stem cell to odontoblast.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 ・ 矯正・小児系歯学

キーワード：小児歯科学、歯髄幹細胞、GDF-5

1. 研究開始当初の背景

歯は、う蝕や歯周病で喪失してしまうと、現時点では二度と再生しない組織の一つであり、現在、歯の組織再生を試みた報告が多数みられる。自己の細胞機能を高め、組織再

生を図る方法が模索されており、増殖因子や細胞外マトリックスを用いる方法が検討されている。

骨形成因子 (bone morphogenetic protein; BMP) は局所において新生骨を誘導する因子

として発見された。骨だけでなく、軟骨や歯など硬組織の形成にも重要な役割を持つことが知られ、再生医療での臨床応用が期待されている。現在、数多くの BMP ファミリー分子が報告されてきているが、本研究では、そのひとつである growth/differentiation factor-5 (GDF-5) に着目した。

GDF-5 は transforming growth factor β (TGF- β) スーパーファミリーに属し、また、代表的な BMP でもある。GDF-5 は骨形成に重要な役割を果たし、軟骨・骨形成を促進することが報告されている。また、GDF-5 は口腔領域においても発現が認められるということが知られている。歯根の成長期において、GDF-5 の遺伝子発現が歯根膜やセメント質表面の細胞に認められるという報告があることから、GDF-5 は歯根膜の成長に関与すると考えられている (Sena K, et.al, 2003)。さらに、この GDF-5 は歯根膜だけでなく、歯髄にもその存在が確認されている (Nakashima M, et.al, 1998)。しかしながら、GDF-5 に関する研究は、主にその組織内発現を検討したもののみで、その分子機能に関する報告は少なく、また歯の発生に関する GDF-5 の研究はほとんど行われていない。さらに GDF-5 が歯髄細胞に対し、どのように作用しているかは未だ不明である。

申請者はこれまでに、象牙芽細胞の分化誘導に必要な増殖因子の同定を目的として、初代培養の幼若歯髄細胞にさまざまな外的因子の導入を試みてきた。また、本研究グループでは、細胞外マトリックスを対象に、同様のスクリーニングを行ってきた。その結果、細胞外マトリックスでは、laminin α 2 が象牙芽細胞の分化過程において必須であることを明らかにした (Yuasa K et al J Biol Chem 2004)。また、増殖因子群では、GDF-5 を添加し培養すると、象牙芽細胞マーカー遺伝子の発現を上昇させることを報告し、GDF-5 が幼若歯髄細胞を成熟象牙芽細胞に分化促進させる可能性を示した (Maruya Y et al 84th IADR, 2006)。しかし、幼若歯髄細胞には、多分化能を有した幹細胞のほかに、ある程度分化が進んだ細胞も含まれている。したがって、上昇した象牙芽細胞遺伝子マーカーが、本当に GDF-5 の作用により、歯髄幹細胞から象牙芽細胞に分化したことによって生じたものなのかは不明である。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、GDF-5 の歯髄幹細胞に対する影響を、象牙芽細胞分化促進作用に着目し、そのメカニズムを解明することである。

マウス歯髄幹細胞は、通常、歯髄細胞の 1-2% しか存在しておらず、象牙芽細胞の分化誘導を生化学的に評価するには不十分であ

った。そこで、我々はマウス歯髄幹細胞の細胞株化を試み、細胞全体を大量調整する方法を考案し、歯髄由来幹細胞を効率よく調整する方法を開発した。それにより得られた、マウス歯髄幹細胞株を用いて、象牙芽細胞分化に対する GDF-5 の影響を検討し、GDF-5 の歯胚形成における役割を明確にすることを本研究の目的とする。

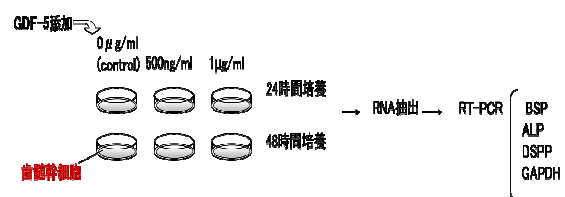
3. 研究の方法

生後 1 週齢 Std;ddy マウスの下顎第一臼歯歯胚から得た幼若歯髄細胞を用いて、GDF-5 添加による幼若歯髄細胞の増殖を MTT 法により測定した。

半定量的 RT-PCR を行い、歯髄細胞に、GDF-5 に対する受容体である BMPR-IB, BMPR-IA, BMPR-II, ActR-II が発現しているか調べた。さらに GDF-5 を添加し 1 週間培養した後、骨芽細胞・象牙芽細胞系のマーカーとして考えられる Alkaline phosphatase (ALP), Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), Osteonectin (OSN), Osteopontin (OPN), Bone sialoprotein (BSP), Osteocalcin (OSC), Dentin sialophosphoprotein (DSPP) の遺伝子発現の増減を調べ、GDF-5 を添加せずに培養した群と比較した。

また、マウス歯髄由来幹細胞株を継代培養し、セミコンフルエント到達後、recombinant mouse GDF-5 を 500ng/ml および 1 μ g/ml の濃度で添加し、24 時間および 48 時間培養した。培養後、GDF-5 添加群および非添加群の細胞から Total RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR を行い、BSP, ALP, DSPP, GAPDH の各遺伝子発現を測定した。

発現強度の測定は ImageJ にて行い、得られた結果の統計学的検定は Student-t-test を用いた。なお、実験は各実験群につき独立した 3 系統を対象に行った。



4. 研究成果

(1) 幼若歯髄細胞に対する GDF-5 の影響

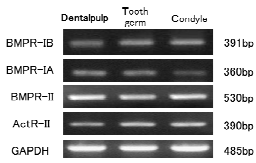
歯髄細胞には GDF-5 の受容体である BMPR-IB, BMPR-IA, BMPR-II, ActR-II の遺伝子が発現していることが確認された。

GDF-5 添加により歯髄細胞の細胞増殖は促進されなかった。一方、ポジティブコントロールである bFGF 添加群では添加 2 日後より有意に増加していた。

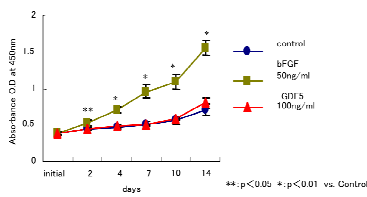
また、GDF-5 を添加し 1 週間培養した幼若

歯髄細胞では、ALP および DSPP の遺伝子発現に有意な増加が認められた。OPN, BSP も同様に、GDF-5 添加群と非添加群の間に有意な差が認められた。

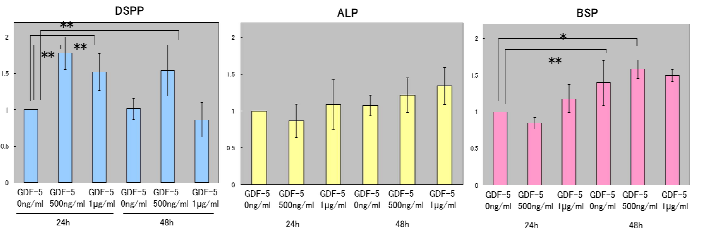
GDF-5 受容体の発現



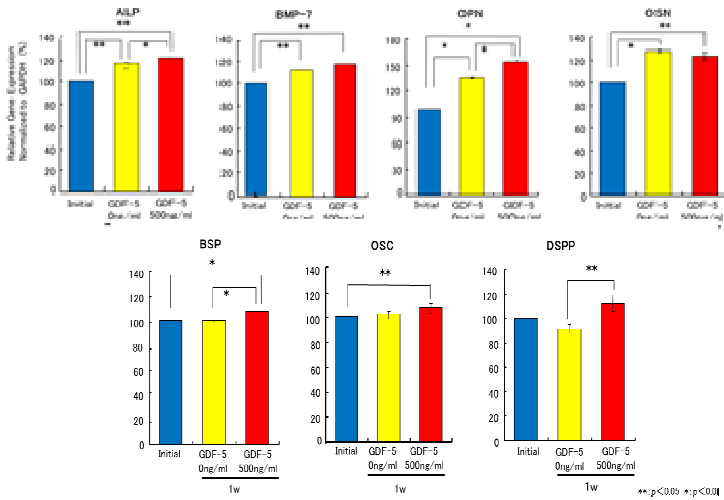
GDF-5 の細胞増殖能への影響



骨芽細胞・象牙芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現



骨芽細胞・象牙芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現

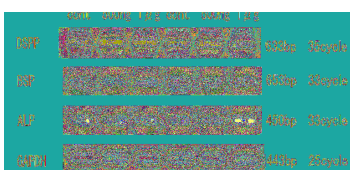


(2) 歯髄幹細胞に対する GDF-5 の影響

歯髄細胞の中には、多分化能を有する歯髄幹細胞の存在が知られていたが、通常、歯髄細胞の1%以下しか存在しないため、象牙芽細胞分化誘導を生化学的に評価するには不十分だった。今回、株化に成功した歯髄幹細胞を用いることにより、この問題が解決できる。歯髄幹細胞に GDF-5 を添加し、24 時間培養した群の DSPP の遺伝子発現は、GDF-5 非添加群に比較し有意な上昇が認められた。また、BSP の遺伝子発現は培養 48 時間後において GDF-5 添加群で上昇し、ALP では、培養 24 時間後、48 時間後いずれにおいても GDF-5 添加による遺伝子発現の有意な変化は見られなかった。

幼若歯髄細胞と歯髄幹細胞を比較すると、歯髄幹細胞のほうが GDF-5 により、DSPP の発現誘導がより増強されていることが示された。

骨芽細胞・象牙芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現



以前より、歯髄細胞中に存在する幹細胞は TGF-β ファミリー分子により、象牙芽細胞への分化が誘導されることが報告されてきた。しかしながら、いずれも幹細胞以外の細胞集団を含む細胞培養条件下での解析であり、これら分子が直接幹細胞に作用しているのか、あるいは歯髄中に存在する他の細胞を介した現象であるのか明らかではなかった。また、TGF-β ファミリー分子のなかでも GDF-5 に関する報告は皆無であった。以前、我々はラットの幼若歯髄細胞において、GDF-5 で処理した群と control 群と比較すると、ALP, OPN, BSP, DSPP の発現が上昇することを示し、GDF-5 が骨芽細胞あるいは象牙芽細胞分化に関与している可能性を報告した。

今回の、歯髄幹細胞を用いた実験において、GDF-5 は、象牙芽細胞マーカーである DSPP 遺伝子の発現上昇を誘導したことから、本分子は歯髄幹細胞を象牙芽細胞へ直接分化促進する作用を持つ可能性が示された。

DSPP 遺伝子発現の上昇は、500ng/ml 添加群のほうが、1 μg/ml 添加群より著しかった。TGF-β ファミリー分子は、濃度により細胞の分化誘導や増殖に対する影響が異なることが知られており、今回のケースでは、500ng/ml 程度の添加濃度が細胞を分化の方向に誘導するものと考えられた。また、時間的な観点からは、TGF-β ファミリー分子の効果は一過性であり、長期的に培養すると逆に分化マーカーの発現を抑制してしまうものが多い。このような例は骨やエナメル芽細胞の分化で確認されている。今回の結果において、48 時間培養群の DSPP 遺伝子発現が、24 時間培養群に比べ低下していたことから、GDF-5 を象牙芽細胞分化誘導に応用する際には、分化の初期にのみ作用させ、適切な時期に除去する必要があるのかもしれない。今回の結果より、GDF-5 が歯髄幹細胞を象牙芽細胞に分化促進させる可能性を示したが、同様に、間葉系の細胞に石灰化を誘導する因子として、BMP2 がよく知られている。しかし、以上に述べたことから、GDF-5 は初期分化に局限して作用することから、BMP2 よりも TGF-β 1 の作用に近い性質を有しているものと思われる。

BSP および ALP は石灰化に関する遺伝子で

あり、さらに長期培養の後、分化が進んだ段階で遺伝子発現に差が現れるものと考えられた。多くの TGF- β ファミリー分子は、骨基質や ALP の発現を早期に調節するものが多く、DSPP のみを発現誘導するものはほとんどない。このことから、幹細胞を骨芽細胞でなく象牙芽細胞に分化誘導させるために GDF-5 は重要な役割を演じている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① Yuriko Maruya, Clinical Evaluation of One-step Adhesive System, IADR, 2010 年 7 月 16 日、スペイン、バルセロナ
- ② 丸谷由里子、HEMA 非含有ワンステップボンディング材の臨床成績、日本小児歯科学会秋季大会、2010 年 12 月 2 日、郡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸谷 由里子 (MARUYA YURIKO)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60400389