

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 1日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592296

研究課題名（和文）乳歯歯根膜由来細胞株の樹立および歯根膜細胞による新しい歯周組織再生法の開発

研究課題名（英文）Establishment of periodontal ligament (PDL) cells derived from deciduous teeth and periodontal tissue regeneration with PDL cells.

研究代表者

長谷川 智一 (HASEGAWA TOMOKAZU)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：50274668

研究成果の概要（和文）：ヒト乳歯由来の歯根膜の不死化細胞株を作成した。この細胞株は脂肪細胞および骨芽細胞への分化能を有した。さらにこの細胞株を使用して、歯周組織の再生に関わると考えられる stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1)による歯周組織の恒常性維持機構・再生機構に関して解析を行った。

研究成果の概要（英文）：We established clonal cell lines of periodontal ligament cells derived from human deciduous teeth immortalized by hTERT gene transfer. SH 9 cells showed the ability of differentiation into both osteoblasts and adipocytes. Stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1) has important roles in migration of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells. We reported that SDF-1 expression in SH 9 cells was regulated by various cytokines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、乳歯歯根膜

1. 研究開始当初の背景

ヒト乳歯歯髄および親知らずの歯根膜に多分化能を持つ細胞の存在が報告されて以来、抜去歯からの細胞を利用した再生医療に注目が持たれていた。しかしヒト乳歯由来の歯髄細胞や歯根膜細胞には不死化した株化細胞が存在せず、様々な研究に大きな壁があった。

2. 研究の目的

(1)ヒト乳歯歯根膜由来の歯根膜細胞の不死化細胞株の樹立。

(2)樹立した歯根膜細胞を利用した歯周組織再生療法の探索。

3. 研究の方法

ヒト乳歯の抜去歯より歯根膜組織を分離、細胞を採取した。この細胞に human telomerase reverse transcriptase (hTERT)遺伝子を導入することにより不死化細胞株を作成した。

この不死化細胞株を使用して歯周組織の再生のために、stromal derived-factor 1 α (SDF-1)の発現調節機構について解析を行った。

4. 研究成果

ヒト乳歯歯根膜細胞を3 clone 得た。そのうちの SH9 clone は骨芽細胞および脂肪細胞への多分化能を示した。

歯周組織の再生に関与する間葉系幹細胞や血管内皮前駆細胞の遊走を誘導する SDF-1

の発現を、作成した細胞株で解析を行った。その結果、fibroblast growth factor 2 (FGF-2)の投与により SDF-1 の発現は抑制された。その抑制機構は、FGF receptor を介しているが MAP kinase および PI3 kinase 経路は経由していないことが明らかとなった。さらに transforming growth factor β 1 (TGF- β)の投与により SDF-1 の発現が促進された。ALK-5 から Smad2/3 経路を介して促進していることが阻害剤や siRNA により明らかとなった。

以上の結果から、作成した細胞株は歯周組織の再生機構の解析に非常に有用であり、また歯根膜細胞自体が骨芽細胞の供給源となり得ることが明らかとなった。さらに歯根膜細胞の発現する SDF-1 により間葉系幹細胞や血管内皮前駆細胞の遊走を誘導し、歯周組織の再生に有用であることも明らかとなった。

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)

- 1) Yuki Akazawa, Takamasa Kitamura, Yuri Fujihara, Yoshitaka Yoshimura, Masato Mitome and Tomokazu Hasegawa. Forced mastication increases survival of adult neural stem cells in the hippocampal dentate gyrus. *Int J Mol Med* 31: 307-314, 2013. DOI: 10.3892/ijmm.2012.1217 査読有
- 2) Mariko Yoshida, Naoto Okubo, Naoyuki Chosa, Tomokazu Hasegawa, Masaharu Kamo, Seiko Kyakumoto and Akira Ishisaki. TGF- β -operated growth inhibition and translineage commitment into smooth muscle cells of ligament-derived endothelial progenitor cells through Smad- and p38 MAPK-dependent signals. *Int J Biol Sci*, 8 (7): 1062-1074; 2012. doi: 10.7150/ijbs.4488 査読有
- 3) Keigo Abe, Yoshitaka Yoshimura, Yoshiaki Deyama, Takashi Kikuri, Tomokazu Hasegawa, Kanchu Tei, Hisashi Shinoda, Kuniaki Suzuki and Yoshimasa Kitagawa. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med*, 29 (6): 1007-1015, 2012. DOI: 10.3892/ijmm.2012.952 査読有
- 4) Tomokazu Hasegawa, Naoyuki Chosa,

Takeyoshi Asakawa, Yoshitaka Yoshimura, Yuri Fujihara, Takamasa Kitamura, Mitsuro Tanaka, Akira Ishisaki and Masato Mitome. Differential effects of TGF- β 1 and FGF-2 on SDF-1 α expression in human periodontal ligament cells derived from deciduous tooth *in vitro*. *Int J Mol Med*, 30 (1): 35-40, 2012. DOI: 10.3892/ijmm.2012.957 査読有

5) Takeyoshi Asakawa, Naoyuki Chosa, Yoshitaka Yoshimura, Asami Asakawa, Mitsuro Tanaka, Akira Ishisaki, Masato Mitome and Tomokazu Hasegawa. Fibroblast growth factor 2 inhibits the expression of stromal cell-derived factor 1 α in periodontal ligament cells derived from human permanent teeth *in vitro*. *Int J Mol Med*, 29 (4): 569-573, 2012. DOI: 10.3892/ijmm.2011.869 査読有

6) Takashi Kikuri, Yoshitaka Yoshimura, Futoshi Tabata, Tomokazu Hasegawa, Jun Nishihira and Tetsuo Shirakawa. Stage-dependent suppression of the formation of dentin-resorbing multinuclear cells with migration inhibitory factor *in vitro*. *Exp Ther Med*, 3 (1): 37-43, 2012. DOI: 10.3892/etm.2011.362 査読有

7) Noriko Takahashi, Naoyuki Chosa, Tomokazu Hasegawa, Soko Nishihira, Naoto Okubo, Mamoru Takahashi, Yoshiki Sugiyama, Mitsuro Tanaka, Akira Ishisaki. Dental pulp cells derived from permanent teeth express higher levels of R-cadherin than do deciduous teeth: Implications of the correlation between R-cadherin expression and restriction of multipotency in mesenchymal stem cells. *Arch Oral Biol.*, 57: 44-51, 2012. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.07.013 査読有

8) 長谷川智一: 乳歯歯根膜細胞による再生医学研究の可能性の検討. *小児歯誌*, 50 (1): p7-14, 2012. <http://www.meteo-intergate.com/linkout/dlview.php?ac=9&cn=1&ar=du8shoni/2012/>

005001/002/0007-0014&us=118134&dt=2013-04-0410:41:44&hs=0dc1a68ad50475b80559f463b07986ee34ef29af 査読無

9) Mayumi Nomura, Yoshitaka Yoshimura, Takashi Kikuri, Tomokazu Hasegawa, Yumi Taniguchi, Yoshiaki Deyama, Ken-ichi Koshiro, Hidehiko Sano, Kuniaki Suzuki and Nobuo Inoue. Platinum nanoparticles suppress osteoclastogenesis through scavenging of ROS productions in RAW264.7 cells. J Pharmacol Sci, 117 (4),243-252,2011.doi: 10.1254/jphs.11099FP 査読有

10) Kenjiro Shibata, Yoshitaka Yoshimura, Takashi Kikuri, Tomokazu Hasegawa, Yumi Taniguchi, Yoshiaki Deyama, Kuniaki Suzuki and Junichiro Iida: Effect of the release from mechanical stress on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. Int J Mol Med, 28 (1): 73-79, 2011. DOI: 10.3892/ijmm.2011.675 査読有

11) Tomokazu Hasegawa, Naoyuki Chosa, Takeyoshi Asakawa, Yoshitaka Yoshimura, Akira Ishisaki and Mitsuro Tanaka. Establishment of immortalized human periodontal ligament cells derived from deciduous teeth. Int J Mol Med 26 (5): 701-705, 2010. DOI: 10.3892/ijmm_00000516 査読有

12) Tomokazu Hasegawa, Naoyuki Chosa, Takeyoshi Asakawa, Yoshitaka Yoshimura, Asami Asakawa, Akira Ishisaki and Mitsuro Tanaka: Effect of fibroblast growth factor-2 on dental pulp cells derived from human deciduous teeth *in vitro*. Exp Ther Med, 1 (3): 477-480, 2010. DOI: 10.3892/etm_00000074 査読有

13) Tomokazu Hasegawa, Naoyuki Chosa, Takeyoshi Asakawa, Yoshitaka Yoshimura, Asami Asakawa, Akira Ishisaki and Mitsuro Tanaka: Effect of fibroblast growth factor-2 on periodontal ligament cells derived from human deciduous teeth *in vitro*. Exp Ther Med, 1 (2):

337-341, 2010. DOI: 10.3892/etm_00000052 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1) 長谷川智一, 帖佐直幸、藤原百合、北村尚正、浅川剛吉、赤澤友基、吉村善隆、石崎明、三留雅人. 乳歯歯根膜は SDF-1 α により間葉系幹細胞の遊走をコントロールし、歯周組織の再生・恒常性に関与している. 第 50 回日本小児歯科学会大会, 2012 年 5 月 12, 13 日 東京国際フォーラム(東京都) (抄) 小児歯誌 50 (2): p240, 2012.

2) 長谷川智一. 日本小児歯科学会学術賞 Lion Award 学術賞受賞講演: 乳歯歯根膜細胞による再生医学研究の可能性の検討. 第 49 回日本小児歯科学会大会, 2011 年 11 月 28(-29)日 いわて県民情報交流センター (盛岡市) (抄) 小児歯誌 49 (4): p51, 2011.

3) 長谷川智一, 帖佐直幸, 浅川剛吉, 浅川麻美, 吉村善隆, 石崎明, 田中光郎. ヒト乳歯歯根膜細胞における FGF-2 および TGF- β 1 による SDF-1 発現への影響. 第 49 回日本小児歯科学会大会, 2011 年 11 月 28 日 いわて県民情報交流センター(盛岡市), (抄) 小児歯誌 49 (4): p368, 2011.

4) 浅川剛吉, 帖佐直幸, 長谷川智一, 浅川麻美, 石崎明, 田中光郎. ヒト永久歯歯根膜細胞における SDF-1 発現調節の解析. 第 49 回日本小児歯科学会大会, 2011 年 11 月 28 日 いわて県民情報交流センター (盛岡市), (抄) 小児歯誌 49 (4): p367, 2011.

5) Tomokazu Hasegawa, Naoyuki Chosa, Takeyoshi Asakawa, Yoshitaka Yoshimura, Akira Ishisaki and Mitsuro Tanaka: Establishment of periodontal ligament cell line derived from human deciduous teeth. The 4th international symposium for interface oral health science in sendai. 2011 年 3 月 7-8 日 ホテル仙台プラザ (仙台市) (抄) Abstract p53.

- 6) Takeyoshi Asakawa, Naoyuki Chosa, Tomokazu Hasegawa, Asami Asakawa, Akira Ishisaki, Mituro Tanaka. Regulation of SDF-1 expression in periodontal ligament cells derived from human permanent teeth. The 4th international symposium for interface oral health science in sendai. 2011年3月7-8日 ホテル仙台プラザ (仙台市) (抄) Abstract p50.
- 7) 長谷川智一, 帖佐直幸, 浅川剛吉, 吉村善隆, 浅川麻美, 石崎 明, 田中光郎. ヒト乳歯歯根膜細胞の細胞株樹立. 平成 22 年度日本小児歯科学会秋季大会. 郡山市民文化センター (郡山市) . 2010年12月2-3日. (抄) 小児歯科学雑誌 48 (5): p578, 2010.
- 8) 浅川剛吉, 帖佐直幸, 長谷川智一, 浅川麻美, 石崎 明, 田中光郎. ヒト永久歯歯根膜細胞における SDF-1 の発現. 郡山市民文化センター (郡山市) . 2010年12月3日. (抄) プログラムおよび抄録集; p46, 小児歯科学雑誌 49 (1): p69, 2011.
- 9) 西平宗功, 大久保直登, 高橋典子, 長谷川智一, 帖佐直幸, 杉山芳樹, 石崎 明: PDGF 受容体を介した VCAM1 の発現は間葉系幹細胞の遊走を抑制する. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会. タワーホール船堀 (東京都) . 2010年9月20-22日. (抄) 歯基礎誌, 52 (補冊) : p134, 2010.
- 10) 長谷川智一, 帖佐直幸, 西平宗功, 石崎 明, 田中光郎: ヒト乳歯歯根膜細胞における SDF-1 の発現調節機構. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会. タワーホール船堀 (東京都) . 2010年9月. (抄) 歯基礎誌, 52 (補冊) : p149, 2010.
- 11) 長谷川智一, 帖佐直幸, 浅川剛吉, 浅川麻美, 吉村善隆, 石崎 明, 田中光郎: ヒト乳歯歯根膜由来線維芽細胞様細胞における SDF-1 の発現. 第 48 回日本小児歯科学会大会 (2010年5月19-20日, 名古屋国際会議場 (名古屋市) (抄) 小児歯誌 45 (2): 339, 2010.
- 12) 西平宗功, 大久保直登, 高橋典子, 客本齊子, 加茂政晴, 長谷川智一, 杉山芳樹, 石崎 明, 帖佐直幸: 間葉系幹細胞における PDGF レセプターを介した VCAM1 の発現解析. 第 82 回日本生化学会大会. 神戸コ

ンベンションセンター (神戸市) . 2009年10月21-24日. (抄) 生化学 (第 82 回日本生化学会大会プログラム号) 81(9) : 262.

[図書] (計 2 件)

- 1) Tomokazu Hasegawa, Naoyuki Chosa, Takeyoshi Asakawa, Yoshitaka Yoshimura, Akira Ishisaki and Mitsuro Tanaka: Establishment of periodontal ligament cell line derived from human deciduous teeth. In: Interface oral health science 2011. Sasaki, K. (ed.) Springer, New York, pp114-116, 2012.
- 2) Takeyoshi Asakawa, Naoyuki Chosa, Tomokazu Hasegawa, Asami Asakawa, Akira Ishisaki, Mituro Tanaka: Regulation of SDF-1 expression in periodontal ligament cells derived from human permanent teeth. In: Interface oral health science 2011. Sasaki, K. (ed.) Springer, New York, pp107-109, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 智一 (HASEGAWA TOMOKAZU)
徳島大学・病院・講師
研究者番号: 50274668

(2) 研究分担者

石崎 明 (ISHISAKI AKIRA)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20356439