

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 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659343

研究課題名（和文） 歯髄細胞および骨芽細胞の三次元培養におけるシグナルネットワークの解析と臨床的展開

研究課題名（英文） Analysis of 3-D cultured dental pulp cells and osteoblasts and their clinical application

研究代表者

川島 伸之（KAWASHIMA NOBUYUKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60272605

研究成果の概要（和文）：

歯髄細胞は象牙芽細胞へ分化し象牙質を形成する。骨芽細胞は骨形成細胞である。これらの細胞は硬組織形成細胞としての共通した特性を有する。臨床において、象牙質、骨といった硬組織の誘導を現実に行うために、まず *vitro* において効率的に分化および石灰化誘導可能な条件について検討した。通常のディッシュを用いた 2 次元培養においては、硬組織誘導培地を用いない限り硬組織マーカーの発現増加および石灰化結節の形成は誘導できないが、3 次元培養することにより、硬組織マーカーの発現増加が観察され、硬組織誘導培地により効率的な石灰化結節が形成された。3 次元培養することで、より生体に近い環境で細胞を培養することが可能となったため、オリジナルの硬組織形成細胞としての特性が顕著に表れたものと推察される。なお、3 次元培養によりインテグリンシグナルが活性化され、それが分化誘導に関与していることも明らかになった。これらの結果は、生体における象牙質および骨形成のメカニズムの一端を明らかにしてくれるとともに、臨床における硬組織誘導を実現するための布石となりうると思われる。

研究成果の概要（英文）：

Dental pulp cells are differentiate into odontoblasts, which are dentin-forming cells, and osteoblasts are bone tissue-forming cells. These cells are categorized as hard tissue forming cells, and may possess common properties. Mineralization of these cells in the conventional two dimensional culture is only observed in the presence of mineralization-inducing factors, such as BMPs or ascorbic acid and beta-glycerophosphate. We revealed that three dimensional (3-D) culture induced up-regulation of odonto-/osteoblast marker expression in dental pulp cells and osteoblasts. Transplantation of 3-D cultured pulp cells or osteoblasts into bone cavities effectively induced hard tissue formation. Clinical application of 3-D cultured dental pulp cells or osteoblasts are expected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	500,000	0	500,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	630,000	3,230,000

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：歯髄細胞 骨芽細胞 象牙芽細胞 細胞分化 硬組織形成 三次元培養

1. 研究開始当初の背景

歯髄および骨における硬組織形成細胞は、それぞれ象牙芽細胞および骨芽細胞である。両細胞とも二次元の平面培養において、それぞれオステオカルシンおよび DSP (Dentin Sialo-phospho protein) といった分化マーカー発現を誘導することが可能である。しかし実際の組織においては、細胞は三次元で存在しており、二次元での培養において得られたデータは生体とは異なっている。石灰化誘導条件で、両細胞とも石灰化物の沈着を確認することも可能であるが、造られる硬組織は生体において存在する象牙質および骨とは全く異なったものであり、また象牙芽細胞および骨芽細胞も生体において存在する様態とは全く異なっている。組織において、象牙芽細胞においては象牙質に象牙芽細胞突起を伸ばし、強い極性を示す形態が特徴的である。また骨芽細胞は敷石状の形態を呈して骨表面に存在する。二次元培養において、このような形態を誘導したとの報告は現在のところまだない。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、組織と同様の三次元の実験モデルにおいて細胞の分化誘導を行い、分化に伴う遺伝子の変動を網羅的に解析し、その結果に基づき分化誘導を効率的に行う手法を確立することである。これまでの *in vitro* における歯髄細胞および骨芽細胞の分化シグナルの解析は二次元の平面培養にて行われているが、実際の組織は三次元であり、二次元での実験モデルには限界がある。この限界を打破するために三次元で培養を行うことが本研究の特色であり、得られたデータを元に、臨床への展開を検討する。

3. 研究の方法

1. 歯髄細胞および骨芽細胞を三次元環境にて培養する。三次元培養にはハンギングドロップ法 (スフェロイド培養) を用いる。コントロールとしてコラーゲン中で培養した細胞を用いる。

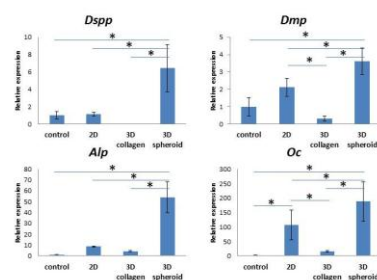
2. 三次元培養期間における硬組織マーカー遺伝子の発現を観察する。

3. マウス歯髄および頭蓋骨窩洞において、*vivo* における評価を行う。

4. 研究成果

歯髄および骨における硬組織形成細胞は、それぞれ象牙芽細胞および骨芽細胞である。両細胞とも二次元の平面培養において、それぞれオステオカルシンおよび DSP (Dentin Sialo-phospho protein) といった分化マ

ーカー発現を誘導することが可能である。しかし実際の組織においては、細胞は三次元で存在しており、二次元での培養において得られたデータは生体とは異なっている。このような点を鑑み、本研究においてはより生体に近い三次元培養を行い、その間におけるシグナル変動を解析し、それを臨床応用へ結びつけるのを目的とする。三次元培養は、コラーゲン、ゼラチンといったスキヤフォールドを用いる培養が一般的であり、そのスキヤフォールドが細胞外マトリックスとして細胞の足場として機能する。しかし、逆に臨床応用を考えた場合にはそのスキヤフォールドが炎症を惹起してしまうリスクも指摘されている。そのため、今回ハンギングドロップ法に準じたスフェロイド培養を行うことにより分化誘導がどのように誘導されるのかを検討した。実験にはマウス間質細胞由来の KusaA1 とマウス歯乳頭細胞由来の MDP を用いた。これらの細胞をスフェロイド培養し、その形態および特性の変化を観察した。スフェロイド培養に適した細胞数は、1 ウェルあたり 30000 個であった。両細胞とも 1 日でスフェロイドを形成したが、透明の球形であった。その後、不透明の球状を呈し、時間経過とともに大きく成長した。BMP2 といった硬組織形成誘導因子非存在下においても、スフェロイド培養によりオステオカルシン、デンティンフォスフォプロテインといったマーカー発現が亢進した (図)。しかし、2 次元およびコラーゲン中で培養した細胞においてのそれらの遺伝子発現はほとんど認めなかった。



Odontoblastic and osteoblastic marker expressions

図の説明

歯髄細胞を 3-D 培養 (スフェロイド培養) することにより、硬組織マーカー発現が亢進した。同じ 3-D 培養でも、コラーゲン中での培養は硬組織マーカー発現を誘導しなかった。2 次元培養でも硬組織マーカー発現は誘導されなかった。

スフェロイド培養した歯髄細胞を SCID マウス頭蓋に形成した骨窩洞に移植したところ、約一カ月で骨様の硬組織の形成が誘導された。

以上より、分化の方向性が決定づけられている細胞においては、スフェロイド培養を行うことでその分化傾向を増強する可能性が示唆されるとともに、三次元培養した細胞の臨床応用が可能であることが明らかになった。

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 9 件)

1. S. Wang, N. Kawashima, K. Sakamoto, K. Katsube, A. Umezawa, H Suda
Osteogenic differentiation of mouse mesenchymal progenitor cell, Kusa-A1 is promoted by mammalian transcriptional repressor Rbpj
Biochemical and Biophysical Research Communications 400, 39-45, 2010.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.133>

2. H.G. Wang, N. Kawashima, T. Iwata, J. Xu, S. Takahashi, T. Sugiyama, H. Suda
Differentiation of Odontoblasts Is Negatively Regulated by MEPE via Its C-Terminal Fragment
Biochemical and Biophysical Research Communications 398, 406-12, 2010.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.085>

3. Sun H, Kawashima N, Xu J, Takahashi S, Suda H
Expression of Notch-Signalling-related Genes in Normal and Differentiating Rat Dental Pulp Cells
Austrian Endodontic Journal 36, 54-8, 2010.
10.1111/j.1747-4477.2009.00188.x

4. H.G. Wang, N. Kawashima, T. Iwata, J. Xu, S. Takahashi, T. Sugiyama, H. Suda
MEPE Activated by Furin Promotes Pulpal Cell Adhesion, Journal of Dental Research 90(4):529-534, 2011.
10.1177/0022034510391057

5. Kawashima N.
Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration?
Arch Oral Biol. 57, 1439-58, 2012.

10.1016/j.archoralbio.2012.08.010

6. S Wei, N Kawashima, N Suzuki, J Xu, S Takahashi, M Zhou, Y Koizumi, H Suda
Kinetics of Th17-related cytokine expression in experimentally induced rat periapical lesions
Aust Endod J 2013 in press.
10.1111/j.1747-4477.2012.00371.x

7. J Xu, N Kawashima, N Fujiwara, H Harada, MS. Ota, H Suda
Promotional effects of vasoactive intestinal peptide on the development of rodent Hertwig's epithelial root sheath,
Congenital Anomalies Volume 52, Issue 3, September 2012, Pages: 162-167.
10.1111/j.1741-4520.2012.00371.x.

8. Koji Otabe, Takeshi Muneta, Nobuyuki Kawashima, Hideaki Suda, Kunikazu Tsuji, Ichiro Sekiya
Comparison of gingiva, dental pulp, and periodontal ligament cells from the standpoint of mesenchymal stem cell properties
Cell Medicine, Vol. 4, pp. 13-21, 2012.

9. T. Yoshida, Y. Kumashiro, T. Iwata, J. Ishihara, T. Umemoto, Y. Shiratsuchi, N. Kawashima, T. Sugiyama, M. Yamato and T. Okano
Requirement of Integrin $\alpha 3$ for Iron Transportation during Enamel Formation
J DENT RES published online 12 October 2012

[学会発表] (計 23 件)

1. N Kawashima, J Xu, N Suzuki, M Zhou, K Takimoto, Y Koizumi, M Yamamoto, A Salima, S Takahashi, H Suda
Expression of Mef2c in Murine Odontoblasts
8th World Endodontic Congress, to be held 6 - 9 October 2010, in Athens, Greece.

2. S Takahashi, N Kawashima, K Katsube, T Sugiyama, H Suda
Shh Signaling is Related to BMP and Wnt Signaling in Ameloblast Differentiation
8th World Endodontic Congress, to be held 6 - 9 October 2010, in Athens, Greece

3. Y Koizumi, N Kawashima, K Takimoto, S Takahashi, J Xu, N Suzuki, M Zhou, M Yamamoto, A Salima, T Sugiyama, H Suda
Wnt Signaling in Odontoblast Differentiation Induced by BMP

8th World Endodontic Congress, to be held
6 - 9 October 2010, in Athens, Greece

4. Gombo Bolortuya, Arata Ebihara,
Satoshi Watanabe, Tomoo Anjo, Chizuko
Kokuzawa, Hidetoshi Saegusa, Nobuyuki
Kawashima, and Hideaki Suda
Analysis of osteoblastic mesenchymal cell
adhesion on laser-induced
dentin modification

8th World Endodontic Congress, to be held
6 - 9 October 2010, in Athens, Greece

5. N Kawashima, J Xu, T Iwata, S
Takahashi, Y Koizumi, K Takimoto, Z
Mengyu, C Ohi, N Suzuki, T Sugiyama, H
Suda

Promotive effects of Sp7 on Dspg
expression

89th IADR General Session & Exhibition
in Barcelona, Spain, July 14-17, 2010.

6. K Takimoto, N Kawashima, M
Nakashima, H Nakamura, Y Koizumi, and
H Suda

Effects of MMP-3 on Inflammatory
Mediator Synthesis from Macrophages

89th IADR General Session & Exhibition
in Barcelona, Spain, July 14-17, 2010.

7. Suzuki N, Kawashima N, Xu J, Suda H.
Effective suppression of periapical lesion
expansion by Cathepsin K inhibitor

89th IADR General Session & Exhibition
in Barcelona, Spain, July 14-17, 2010.

8. J Xu, N Kawashima, N Fujiwara, H
Harada, H Suda

Expression of Vasoactive Intestinal Peptide
Receptors in HERS Cells

89th IADR General Session & Exhibition
in Barcelona, Spain, July 14-17, 2010.

9. Kawashima N., Xu J., Suzuki N., Zhou
M., Wei S., Takimoto K., Koizumi Y.,
Takahashi S., Suda H.

Induction of IL17 synthesis in the
experimentally-induced murine periapical
lesions

2010 Spring Scientific Meeting of Korean
Academy of Endodontics, BEXCO Busan,
Korea, March 27, 2010.

10. 川島伸之、許セイ、岩田隆紀、周夢宇、
瀧本晃陽、小泉悠、大井智恵、高橋里美、鈴
木規元、須田英明

象牙芽細胞分化における Sp7 による dentin
sialophosphoprotein 発現誘導

日本再生医療学会 広島国際会議場 平成
22年3月18日

11. Suzuki N, Kawashima N, Suda H
Mechanisms of Bone Destruction and its
Regulation in the Periapical Lesions,
KACD, 11-12 November, 2011, Kim Koo
Museum, Seoul.

12. N Kawashima, K Takimoto, Y Koizumi,
M Yamamoto, M Zhou, N Suzuki, M
Nakashima, H Suda,

Down-regulation of Inflammatory
Mediator Synthesis from macrophages by
MMP3

KACD, 11-12 November, 2011, Kim Koo
Museum, Seoul.

13. S Takahashi, N Kawashima, K Katsube,
T Sugiyama, H Suda

Shh and Wnt Signaling in Ameloblast
Differentiation

ESE, 15 - 17 September, 2011, Cavalieri
Hotel, Rome.

14. N Kawashima, J Xu, N Suzuki, M Zhou,
K Takimoto, Y Koizumi, M Yamamoto, S
Takahashi, T Sugiyama, H Suda

Mineralization of Odonotoblastic-Lineage
Cells Was Accelerated by Enhanced
Expression of Mef2c

ESE, 15 - 17 September, 2011, Cavalieri
Hotel, Rome.

15. Kawashima N, Suzuki N, Suda H
Mechanisms of Bone Destruction in the
Periapical Lesions and Its Regulation, The
16th Scientific Meeting of Asian Pacific
Endodontic Confederation, April 21st, 2011,
Jahad Daneshgahi Complex, Shiraz, Iran.
<Invited Lecture>

16. 山本弥生子、川島伸之、須田英明
単層培養法と三次元培養法における歯髓細
胞の象牙芽細胞分化について

日本歯科保存学会秋季大会（第135回）
平成23年10月20日
大阪国際交流センター

17. 川島伸之、周夢宇、須田英明、工藤 明、
勝部憲一

ペリオスチンによる骨芽細胞分化制御
日本歯科保存学会秋季大会（第135回）
平成23年10月20日
大阪国際交流センター

18. K. Takimoto, N. Kawashima, N. Suzuki, M. Nakashima, H. Suda, Effects of MMP-3 on Mediator Synthesis and Accumulation of Inflammatory Cells, AAE 2012 Annual Session, Boston, MA, April 20, 2012.

19. N. Kawashima, J. Xu, N. Suzuki, M. Zhou, K. Takimoto, Y. Koizumi, M. Yamamoto, H. Suda Involvement of a Myogenic Transcriptional Factor in Odontoblast Differentiation AAE 2012 Annual Session, Boston, MA, April 20, 2012.

20. N. Suzuki, N. Kawashima, K. Takimoto, H. Suda Regulation of Periapical Bone Destruction by Cathepsin K Inhibitor AAE 2012 Annual Session, Boston, MA, April 20, 2012.

21. Kawashima N, Mengyu Z, Katsube K, Kudo A, Suda H, Osteoblast differentiation was negatively regulated by periostin, IADR 90th General Session, Iguacu Falls, Brazil, June 20, 2012.

22. M. YAMAMOTO, N. KAWASHIMA, Y. KOIZUMI, K. TAKIMOTO, M. SAITO, H. HARADA, and H. SUDA Effects of 3-D Spheroid Culture on Dental Pulp Cells IADR 90th General Session, Iguacu Falls, Brazil, June 20, 2012

23. KAWASHIMA Nobuyuki, YAMAMOTO Mioko, SAITO Masahiro, TAKIMOTO Koyo, ZHOU Mengyu, KOIZUMI Yu, SUZUKI Noriyuki and SUDA Hideaki Induction of Mineralization by Spheroid Cultured Dental Pulp Stem Cells 日本歯科保存学会秋季大会（イングリッシュセッション）：広島国際会議場 2012年11月22日

〔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0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
川島伸之 (KAWASHIMA NOBUYUKI)

研究者番号：60272605

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし