

## 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 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791782

研究課題名（和文） Thy-1 陽性歯髄細胞による象牙質再生

研究課題名（英文） Dentin regeneration by Thy-1-positive dental pulp cells

研究代表者

細矢 明宏（HOSOYA AKIHIRO）

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70350824

研究成果の概要（和文）：Thy-1 陽性歯髄細胞は、鐘状期以降の subodontoblastic layer に局在する。そこで、歯髄組織における subodontoblastic layer 細胞の特性を明らかにする目的で、単離した Thy-1 陽性歯髄細胞の硬組織形成能を評価した。Thy-1 陽性歯髄細胞は、BMP-2 添加後、顕著に ALP 活性を上昇させた。また、皮下移植後の硬組織形成は、陰性細胞群と比べ、陽性細胞群で有意に多く観察された。以上の結果より、Thy-1 陽性歯髄細胞は subodontoblastic layer に局在し、高い硬組織形成能を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The majority of cells in the subodontoblastic layer express Thy-1. Therefore, to clarify the characteristics of cells in the subodontoblastic layer, the differentiation ability of Thy-1-positive cells into mineralizing cells was analyzed *in vitro* and *in vivo*. Following stimulation with BMP-2, Thy-1-positive dental pulp cells showed accelerated induction of ALP activity. Additionally, subcutaneous implantation of these positive cells induced numerous mineralized matrix formations. These results collectively suggest that Thy-1-positive dental pulp cells localized in the subodontoblastic layer have the ability to differentiate into hard tissue-forming cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：移植・再生医療，再生医学，象牙質，発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎え、口腔疾患の予防と Quality of Life (QOL) の向上を目指した歯科医療が望まれており、歯科医療に対するニーズも高度化、多様化している。このような状況下において歯の咬合機能を長期にわたって維持させることが益々重要であると考

えられ、象牙質・歯髄複合体の保存、保護の重要性が再認識されている。一方、歯髄は外部からの侵襲に対して修復象牙質や被蓋硬組織の形成等を行う能力を有することが、多数の形態的研究により明らかにされている。しかしながら、修復過程における歯髄細胞から象牙質細胞への分化機構は不明な点が多

く、これを解明することは歯髄組織の自己再生能を活性化させる生物学的治療法の開発に繋がるものと思われる。

象牙質再生療法には、歯髄細胞から象牙芽細胞への分化を効率的に誘導する必要がある。従来より象牙芽細胞分化には上皮-間葉相互作用が重要な働きを担っていると考えられているが、歯髄幹細胞を用いた移植実験により、一部の歯髄幹細胞は単独でも象牙芽細胞に分化可能であることが示された (Gronthos S. et al., PNAS, 13625-30, 2000)。しかし、幹細胞を単離しないヘテロな歯髄細胞群は骨芽細胞へ分化する (Hosoya A. et al., J Dent Res, 469-74, 2007) ことから、歯髄細胞を象牙芽細胞へ分化させるには、歯髄組織からより分化度の低い細胞群を単離することが有効であると考えられる。

断髄および直接覆髄後に再生する象牙芽細胞は、血管周囲に局在すると推定される組織幹細胞、あるいはその解剖学的位置関係から subodontoblastic layer (象牙芽細胞層下層) の細胞に由来すると考えられている。しかし、これまで有用な細胞マーカーが存在しなかったことから、これらの細胞が歯髄修復時に象牙芽細胞へ分化するという直接的な証明はなされていない。我々は subodontoblastic layer の細胞はアルカリホスファターゼ (ALP) ならびに bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) 等の硬組織形成活性が強いことから、この層に象牙芽細胞前駆細胞が存在すると考えている。そこで本研究は、subodontoblastic layer の歯髄細胞が有する象牙芽細胞分化能を明らかにし、この細胞を用いた自己修復・再生能力を賦活化する治療法の臨床応用により、歯を長期にわたり保存することを目指し、計画された。

## 2. 研究の目的

本研究で注目した Thy-1 (または CDw90) は、細胞膜に局在する糖タンパク質で、幹細胞マーカーの一つとして知られている。我々は、Thy-1 が subodontoblastic layer の細胞に特異的に局在することを予備実験的に確認した。そこで本研究では、(1) ラット臼歯ならびに切歯発生過程における Thy-1 陽性細胞の局在を免疫組織化学的に詳細に検討する。次に、(2) Thy-1 を指標として歯髄組織から Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) により subodontoblastic layer の細胞を分取し、得られた Thy-1 陽性および陰性歯髄細胞の分化度の違いを検討する。評価は、硬組織形成細胞の分化マーカーである組織非特異的 ALP (TNALP), runt-related transcription factor 2 (Runx2), Osterix の遺伝子発現の比較により行う。さらに、(3) in vitro ならびに (4) in vivo における硬

組織形成能ならびに象牙芽細胞への分化能を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯髄における Thy-1 局在の検討

胎生 (E) 15 日～生後 (P) 28 日齢 Lewis 系ラット下顎第一臼歯ならびに P28 日齢下顎切歯を 4% パラホルムアルデヒドにて固定後、通法に従いパラフィン切片を作成する。マウスモノクローナル抗ラット Thy-1 (HIS51, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) 抗体ならびに Histofine Simple Stain rat MAX-PO (MULTI; NICHIREI Co., Tokyo, Japan) を用い、免疫組織化学的に Thy-1 陽性細胞の局在を観察する。

### (2) Thy-1 陽性歯髄細胞の性状解析

#### ① Thy-1 陽性歯髄細胞の単離

4 週齢 Lewis 系ラットの下顎切歯固有歯髄を歯牙から剥脱し、2 mg/ml collagenase, 0.25% trypsin 処理により歯髄細胞を分離する。PE 標識 Thy-1 抗体 (eBioscience) による免疫染色は、得られた細胞を抗体添加  $\alpha$ -MEM (2% FCS, 10mM HEPES; pH 7.5) 中で 60 分間培養する。陽性および陰性細胞は、信州大学・ヒト環境科学研究支援センターにて FACS (FACSVantage, BD) を用い回収する。

#### ② 硬組織形成関連遺伝子の発現

Thy-1 陽性および陰性細胞から RNA を回収し、Tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNALP), Runx2, Osterix, Osteocalcin の発現をリアルタイム PCR (MJ Research, MA, USA) で検討する。

### (3) Thy-1 陽性細胞の in vitro における硬組織形成能

#### ① 分化能の検討

Thy-1 陽性および陰性歯髄細胞を BMP-2 添加 (100 ng/mL; R&D Systems) 条件下で培養し、0, 3 日後に ALP 活性染色を行う。また、0, 6, 12, 24 時間後に硬組織形成細胞分化マーカー (TNALP, Runx2, Osterix, Osteocalcin) の遺伝子発現を比較検討する。

#### ② 石灰化組織形成能の検討

コラーゲンコートした dish 上で 100 ng/mL BMP-2, 5 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 100  $\mu$ g/ml ascorbic acid 添加培地にて 4, 7 日間培養し、Alizarin red 染色により石灰化組織形成を評価する。

### (4) 皮下移植実験による象牙芽細胞分化能の検索

Green fluorescent protein (GFP) 発現ラットから採取した  $5 \times 10^7$  個の Thy-1 陽性および陰性歯髄細胞を hydroxyapatite disk (CELLYARD HA Scaffold, Pentax Corp) に播種し、24 時間培養する。その後、disk を

野生型ラット頭部皮下へ移植し、7 週後に移植体を取り出し固定、形態計測学的ならびに免疫組織化学的手法にて硬組織形成を評価する。硬組織基質の評価は、象牙質に特異性の高い象牙質シアロタンパク質の抗体 (Dr. WT Butler, University of Texas より供与) ならびに骨および象牙質に局在する Osteopontin, 骨シアロタンパク質の抗体染色により行う。また GFP の免疫組織化学染色により、形成細胞の由来を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1) 歯の発生過程における Thy-1 局在

蕾状期 (E15) および帽状期 (E17) 臼歯歯胚において、歯胚周囲に存在する歯槽骨の骨膜に Thy-1 の陽性反応が観察されたが、歯胚内部では特異的な反応は認められなかった。象牙質形成開始後の鐘状期 (P2) および歯根形成期 (P28) では、subodontoblastic layer の歯髓細胞で強い陽性反応を示したが、象牙芽細胞およびその他の歯髓細胞は陰性であった。また、歯槽骨の成熟化に伴い、骨膜での反応は減弱、消失した。切歯でも同様に、subodontoblastic layer の歯髓細胞で特異的に陽性反応が認められたが、象牙芽細胞、サービカルループ周辺の前象牙芽細胞、およびその他の歯髓細胞は陰性であった。

##### (2) Thy-1 陽性歯髓細胞の性状解析

切歯歯髓から FACS を用い Thy-1 陽性および陰性細胞を分取した。Thy-1 陽性歯髓細胞は、陰性細胞と比べ TNALP ならびに NGFR の発現が高いことから、subodontoblastic layer 細胞の特性を有していると考えられた。また、硬組織形成細胞の初期分化マーカーである TNALP と Runx2 の発現は陽性細胞で有意に高値を示したが、後期分化マーカーである Osterix および Osteocalcin はほとんど差がみられなかった。

##### (3) *in vitro* における分化能

BMP-2 (100 ng/mL) による石灰化誘導を行った。TNALP, Runx2, Osterix, Osteocalcin の分化マーカーは、ともに陰性細胞では BMP-2 添加 0, 6, 24 時間で発現の変化はほとんどみられなかったが、陽性細胞では有意に発現上昇が認められた。

アルカリホスファターゼ活性は、分取直後の陰性細胞ではみられず、陽性細胞のみ弱い染色性を示した。これらの反応は誘導後 3 日になると陰性細胞においても染色性が認められたが、陽性細胞を石灰化誘導したものではより強い反応性を示した。

石灰化を示すアリザリンレッド陽性の基質は、陽性細胞で分化誘導後 4 日から観察された。また、7 日後では陰性細胞においても石灰化が認められたが、陽性細胞で高い石灰

化基質形成能を認めた。

##### (4) *in vivo* における分化能

移植 7 週後、陽性細胞移植群、陰性細胞移植群ともに硬組織形成が見られたが、陽性細胞移植群に 10 倍以上の硬組織形成が認められた。また、移植細胞由来であることを示す GFP 陽性細胞は、両移植群ともに新生硬組織基質の表面および周囲で認められ、硬組織形成細胞は移植細胞に由来することが確認された。

形成された硬組織は、両移植群ともに基質中に細胞を封入しており、骨シアロタンパクおよび Osteopontin の局在は示したが、象牙質シアロタンパクは陰性であったため、骨様の特性を有すると思われた。

以上より、Thy-1 陽性歯髓細胞は、ラット臼歯および切歯の subodontoblastic layer に局在し、分取した Thy-1 陽性細胞は TNALP および Runx2 の発現が高いことから、硬組織形成細胞への分化が進んでいる細胞であると考えられた。また、陽性細胞は、*in vitro* および *in vivo* において高い硬組織形成能を示したことから、subodontoblastic layer は、象牙質再生時における細胞の供給源とな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 4 件)

① Akihiro Hosoya, Toru Hiraga, Tadashi Ninomiya, Akira Yukita, Kunihiko Yoshida, Nagako Yoshida, Susumu Ito, Hiroaki Nakamura (2012). Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochem Cell Biol* 137(6):733-742. 査読有  
DOI:10.1007/s00418-012-0928-10

② Nagako Yoshida, Kunihiko Yoshida, Naoto Ohkura, Akihiro Hosoya, Yoshimi Shigetani, Yusuke Yamanaka, Naoya Izumi, Hiroaki Nakamura, Takashi Okiji (2012). Expressional Alterations of Fibrillin-1 during Wound Healing of Human Dental Pulp. *J Endodont* 38(2):177-184. 査読有  
DOI: 10.1016/j.joen

③ Akihiro Hosoya, Sungwook Kwak, Eun-Jung Kim, Declan Patrick Lunny, E. Birgitte Lane, Sung-Won Cho, Han-Sung Jung (2010). Immunohistochemical localization of cytokeratins in the junctional region of ectoderm and endoderm. *Anat Rec*

(Hoboken). 293(11):1864-1872. 査読有  
DOI: 10.1002/ar.21233

④ Akihiro Hosoya, Tadashi Ninomiya, Toru Hiraga, Kunihiro Yoshida, Nagako Yoshida, Etsuo Kasahara, Hidehiro Ozawa, Hiroaki Nakamura (2010). Potential of periodontal ligament cells to regenerate alveolar bone. J Oral Biosci 52(2):72-80. 査読有  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jorlbiosci/52/2/52\\_2\\_72/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jorlbiosci/52/2/52_2_72/_article)

〔学会発表〕(計4件)

① 細矢明宏, 平賀 徹, 二宮 禎, 雪田 聡, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 中村浩彰 「Thy-1 陽性 subodontoblastic layer 細胞の高い硬組織形成能」第9回日本再生歯科医学会 平成23年9月10日 大阪国際会議場(大阪)

② 細矢明宏 「Thy-1 (CD90) 陽性歯髄細胞の硬組織形成能」第10回松本ボーンフォーラム 平成23年5月27日 松本歯科大学(塩尻)

③ 細矢明宏, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 笠原悦男, 中村浩彰 「Thy-1 陽性歯髄細胞の局在および硬組織形成能」第133回日本歯科保存学会・秋季学会 平成22年10月29日 長良川国際会議場(岐阜)

④ 細矢明宏, 平賀 徹, 二宮 禎, 雪田 聡, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 中村浩彰 「Thy-1 陽性歯髄細胞の硬組織形成能に関する形態学的研究」第52回歯科基礎医学会学術大会 平成22年9月22日 タワーホール船堀(東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細矢 明宏 (HOSOYA AKIHIRO)  
松本歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 70350824

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: