

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 18 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791853

研究課題名（和文）3 種類の幹細胞を用いた象牙質・歯髄複合体再生治療法の開発

研究課題名（英文）Development of dentin-pulp complex regeneration therapy by three types of stem cells

研究代表者

尾関 伸明 (OZEKI NOBUAKI)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：70469005

研究成果の概要（和文）：骨格筋幹細胞，ES 細胞と iPS 細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導メカニズムについて基礎的検討を行った。レチノイン酸と BMP-4 の添加による象牙芽細胞分化誘導により，長楕円型への明瞭な形態学的変化と象牙質分化マーカーが観察された。さらに，細胞表面タンパク integrin $\alpha 2\beta 1$ と $\alpha V\beta 3$ の発現が観察され，ラミニン-1 とコラーゲンタイプ I といった細胞外マトリックスに対して強い接着能と運動能を有する象牙芽細胞様細胞に分化することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We have examined the mechanism of three types of stem cells differentiation to odontoblasts for the purpose of dentin regeneration. Morphological analysis indicated that retinoic acid and BMP-4 induced differentiation to the odontogenic pathway. Differentiated cells showed markers of odontoblast differentiation. Moreover, we found significant integrin $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ expression with increased adhesion and motility on laminin-1 and collagen type-I substrates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1700000	510000	2210000
2011 年度	800000	240000	1040000
2012 年度	600000	180000	780000
年度			
年度			
総計	3100000	930000	4030000

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：歯内療法学，骨格筋幹細胞，ES 細胞，iPS 細胞，象牙芽細胞

1. 研究開始当初の背景

う蝕によって失われた歯の形態・機能・審美性を回復するためには，グラスアイオノマーセメント，コンポジットレジン，セラミックなどの人工材料を使用するのが一般的であるが，近年，これらの人工材料に代わり，失われた歯質（象牙質、エナメル質）や歯その

ものの再生を治療目的とする再生療法の開発が期待されており，先行する医学領域においては，角膜，軟骨，人工関節，血管，心筋の再生に対しての臨床研究が盛んに行われている。興味深いことに，歯髄組織はう蝕や修復処置などの物理的あるいは化学的な刺激により象牙質を再生することができる潜在能力を

有している。近年、歯髄前駆体細胞あるいは歯髄幹細胞などが前述の象牙質の再生に関与することが示唆された。したがって、幹細胞を用いた細胞導入治療法が従来のう蝕治療法や覆髄法に代わる有効な手段となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、強い再生能力を有するヒト骨格筋組織から確立した骨格筋幹細胞、さらに外胚葉・内胚葉・中胚葉、そして第4の胚葉と言われている神経堤細胞への分化機構の解析に有用なES細胞、そして、成熟した細胞を初期胚の状態にリセットしたiPS細胞を用いて、象牙質・歯髄複合体の再生メカニズムを解析し、従来のう蝕治療法や覆髄法に代わる新規な幹細胞を用いた細胞導入象牙質・歯髄複合体再生治療法モデルの確立を目標とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨格筋幹細胞、マウスES細胞とiPS細胞の象牙芽細胞への分化誘導の解析:

各幹細胞に hanging drop 法を施した後、RA(レチノイン酸)存在下で3日間、浮遊培養後、コラーゲン上に細胞を播種し、BMP-2, -4, -6 存在下で7日間培養を行う。

(2) 象牙芽細胞への分化の評価:

BMP-2, -4, -6 添加後、1, 3, 5, 7 日目での各幹細胞の形態学的変化を光学顕微鏡下で観察する。BMP-2, -4, -6 添加7日後、total RNA 抽出し、神経堤細胞マーカーである FoxD3 と Sox10, 象牙芽細胞分化マーカーである DSPP (象牙質シアロリタンパク質), Enamelysin (MMP-20) の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて観察する。さらに、象牙芽細胞分化マーカーである DSP (象牙質シアロタンパク質) の発現を免疫染色法を用いて観察す

る。石灰化能を ALP 染色とアリザリンレッド染色により観察する。

(3) 象牙芽細胞分化誘導前後の細胞表面タンパク integrin の発現変化の観察:

細胞外マトリックスに対する細胞接着能に関与する integrin ($\alpha 1, \alpha 2, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 7, \alpha V$) の発現変化をフローサイトメーターを用いて観察する。

(4) (3) における integrin の発現変化が遺伝子レベルで制御されているものであるか、プロモーター assay で証明を行う。

(5) 各幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導における、Enamelysin (MMP-20) の遺伝子発現とその発現経路に関して RT-PCR 法とウエスタンブロット法を用いて観察する。

(6) 細胞外マトリックス (ラミニン, フィブロネクチン, コラーゲンタイプ I) に対する細胞接着能と運動能の解析を行う。

(7) 各幹細胞から分化誘導した象牙芽細胞を、間葉系幹細胞 (理化学研究所より入手) と共存培養し、歯胚での上皮-間葉相互作用を誘導する因子 (activin, EGF, FGF-2, IGF-1, TGF- β) を作用させ象牙質・歯髄複合体の再生を検討する。

(8) 分化誘導した象牙質・歯髄複合体を I 型コラーゲンの人工細胞外マトリックス (ECM) と一体化させ、8週齢の雄性 Wister 系ラットの抜歯した臼歯部と切歯生活歯髄切断面に圧をかけないように注意しながら自家移植する。抜歯した臼歯部は止血用ゼラチンスポンジで封鎖をし、切歯切断面は光重合型コンポジットレジンにて完全に封

鎖する。移植 1, 2, 3, 4 週後に移植部を軟エックス線を用いて観察する。さらに、周囲組織を含めて試料を摘出し、通法に従い固定、パラフィン包埋を行い連続組織切片を作製する。HE 染色による形態学的観察と未脱灰凍結標本のアリザリンレッド染色により石灰化能を検討する。象牙質に特異的なマーカーである DSP (象牙質シアロタンパク質) の発現を免疫染色法を用いて観察する。

4. 研究成果

(1) ヒト骨格筋幹細胞, マウス ES 細胞と iPS 細胞の象牙芽細胞への分化誘導の解析:

Hanging drop 法を施した後, レチノイン酸存在下で 3 日間浮遊培養させ, コラーゲン上に細胞を播種し, BMP-2, -4, -6 存在下で 7 日間培養をおこなった。2. 象牙芽細胞への分化の評価: ① BMP-2, -4, -6 添加後, 形態学的変化を観察した結果, BMP-4 添加群において長楕円型の明瞭な形態学的変化が観察された。② BMP-2, -4, -6 添加 7 日後の FoxD3, Sox10, DSPP, Enamelysin の遺伝子発現を観察した結果, BMP-4 添加群において DSPP と Enamelysin の遺伝子発現が観察された。③ DSP の発現を免疫染色法を用いて観察した結果, BMP-4 添加群において DSP タンパクの発現が観察された。④ 象牙芽細胞分化誘導後の石灰化能を ALP 染色とアリザリンレッド染色により観察した結果, BMP-4 添加群において ALP とアリザリンレッド陽性細胞が観察された。

(2) 象牙芽細胞分化誘導前後の integrin の発現変化の観察:

Integrin ($\alpha 1, \alpha 2, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 7, \alpha V$) の発現変化を観察した結果, BMP-4 添加群において integrin $\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1, \alpha 6\beta 1, \alpha V\beta 3$ の発現が観察された。

(3) 上記 3. における integrin の発現変化が遺伝子レベルで制御されているものであるか, プロモーター assay により観察した結果, BMP-4 添加群における integrin の発現が遺伝子転写レベルで制御されていることが明らかとなった。

(4) 3 種の幹細胞の象牙芽細胞分化誘導における, Enamelysin の遺伝子発現と発現経路を観察した結果, マウス ES 細胞において, BMP-4 添加群に Enamelysin の遺伝子発現が観察され, p38MAPK シグナルを介した制御機構の関与が示唆された。

(5) 細胞外マトリックス (ラミニン -1, -2, フィブロネクチン, コラーゲンタイプ I) に対する細胞接着能と運動能の解析:

ヒト骨格筋幹細胞, マウス ES 細胞と iPS 細胞に Hanging drop 法を施した後, レチノイン酸 (RA) 存在下で 3 日間浮遊培養させ, コラーゲン上に細胞を播種し, BMP-4 存在下で 7 日間培養をおこなった。ヒト骨格筋幹細胞, マウス ES 細胞と iPS 細胞の RA と BMP-4 添加群における, 象牙芽細胞分化誘導前後の細胞外マトリックス (ラミニン -1, -2, フィブロネクチン, コラーゲンタイプ I) に対する細胞接着能と運動能の解析を行った結果, 象牙芽細胞への分化誘導によりラミニン-1, フィブロネクチンとコラーゲンタイプ I に対して強い接着能と運動能を有することが明らかとなった。

(6) 分化誘導した象牙質・歯髄複合体の *in vivo* での石灰化能を検討した結果, ラット切歯生活歯髄切断面にアリザリンレッド染色陽性細胞が観察され, さらに, 象牙質分化マーカーである DSP 陽性細胞が観察された。

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1件)

① Rie Kawai, Nobuaki Ozeki, Hideyuki Yamaguchi, Tsuyoshi Tanaka, Kazuhiko Nakata, Makio Mogi, and Hiroshi Nakamura, “Mouse ES cells have a potential to differentiate into odontoblast-like cells by using hanging drop method”, *Oral Diseases*, 査読有, in press

[学会発表] (計2件)

- ① 川合里絵, 尾関伸明, 骨格筋幹細胞, ES細胞とiPS細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導法の確立, 第22回日本歯科医学会総会, 2012. 11. 10, 大阪, インテックス大阪
- ②川合里絵, 尾関伸明, コラーゲン三次元足場とBMP-4を用いたマウスiPS細胞とES細胞の象牙質分化能の比較, 第134回日本歯科保存学会春季学術大会, 2011. 6. 9, 東京, 東京ベイ舞浜ホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾関 伸明 (OZEKI NOBUAKI)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号：70469005

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし