

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 6 月 15 日現在

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890167

研究課題名（和文） 歯髄再生を目指した BMP 2 と FGF 2 による象牙芽細胞分化・機能発現誘導法の検討

研究課題名（英文） Effects of BMP2 and FGF2 on the odontoblast differentiation and the induction methods of expression of cell function for the regeneration of dental pulp.

研究代表者

鷺尾 絢子 (WASHIO AYAKO)

九州歯科大学歯学部歯学科・助教

研究者番号：10582786

研究成果の概要（和文）：我々が樹立した象牙芽細胞様細胞株 (KN-3 細胞) を用い、骨形成促進因子 (BMP-2) および線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) が象牙芽細胞分化に与える影響を検討したところ、BMP-2 誘導性 Smad シグナル伝達経路および FGF-2 誘導性 ERK シグナル経路の活性化が KN-3 細胞の分化に影響を与えることが解明された。これにより、象牙質-歯髄複合体再生療法確立に向けて有用となる知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：We examined the effects of Bone Morphogenic Protein-2 (BMP-2) and Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2), on the odontoblast differentiation of KN-3 cells, a cell line that we established from dental pulp. Our results indicate that BMP-2 and FGF-2 play critical roles in induction of the odontoblast properties of KN-3 cells via activation of Smad and ERK signaling pathways, respectively. We could have useful knowledge about the establishment of wound healing and local regeneration of dentin-pulp complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,090,000	327,000	1,417,000
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

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：象牙質・歯髄複合体、再生医療

1. 研究開始当初の背景

国民生活の質の向上に健全な歯の維持が重要であること、および健全な歯の維持には歯髄が重要な役割を果たしていることは周知の事実である。現在、一般歯科医院においても小規模な露髄に対する歯髄保存療法は実践されている。一方、広範囲にわたる齶蝕や歯の破折等では傷害を受けた歯髄の保存の可否判断が困難なため、抜髄処置を選択す

る歯科医師が多い。現在、専用機器と技術を駆使することで高精度な歯内治療の実施が可能であるが、歯・根尖歯周組織は解剖学的に複雑な形態を有しているため治療レベルには限界がある。歯内治療の困難さや不確実さの結果として根尖病変再発を繰り返し、最終的に抜歯に至る症例も少なくないのも現代歯科医療の現状である。

歯髄喪失による歯の機能低下あるいは喪

失を阻止し現代歯科医療の限界を克服するため、残存する歯髄を利用した象牙質-歯髄複合体の創傷治癒・再生療法を確立することは必須の課題であるといえる。

これまでに私は、歯髄再生において不可欠な神経組織再生を目的とした研究を行ってきた。神経細胞分化機構の研究に広く利用されている PC12 細胞を用い、生体内に豊富に存在する細胞外基質の1つであるヒアルロン酸の神経細胞分化への影響について検討した。その結果、ヒアルロン酸は神経細胞分化を抑制することを明らかにした (Exp Cell Res, 2009)。

一方、私の所属する研究グループでは、ラット歯髄から、象牙芽細胞に特徴的な遺伝子 (Runx-2, DSPP, collagen type I) の発現と石灰化能を示す象牙芽細胞様歯髄細胞株 (KN-3 細胞) を樹立している (J Endod, 2007)。KN-3 細胞を用いて、我々は細菌由来リポ多糖 (LPS) が KN-3 細胞の示す象牙芽細胞への分化と石灰化能に影響を与えること、LPS による KN-3 細胞の炎症応答誘導と石灰化抑制をオゾン水が抑制することを明らかにしてきた (J Endod, 2009)。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は歯髄創傷治癒メカニズムの解明と象牙質・歯髄複合体再生療法の確立にある。最終目標の達成に向け、本研究では、我々が樹立した象牙芽細胞様細胞株 (KN-3 細胞) を用い、歯の発生過程で重要な役割を果たしている骨形成促進因子 (Bone Morphogenetic Protein-2, BMP-2) および線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast Growth Factor-2, FGF-2) が象牙芽細胞分化に与える影響を検討し、象牙芽細胞分化と象牙質形成メカニズムを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) ラット切歯歯髄由来の象牙芽細胞様細胞株 (KN-3 細胞) の単層培養を行い、BMP-2 存在下・非存在下で一定時間培養後、位相差顕微鏡観察下で形態変化の観察を行うとともに、細胞増殖能に及ぼす影響を WST-1 assay で、石灰化能へ及ぼす影響をアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性で検討する。さらに、BMP-2 刺激の細胞内シグナル伝達分子である各種 Smad の発現とリン酸化、および象牙芽細胞分化マーカーである DSP, DMP-1 の発現をウエスタンブロット法で検討する。

(2) (1) 同様に KN-3 細胞において FGF-2 存在下・非存在下で一定時間培養後、位相差顕微鏡観察下で形態変化の観察を行う。さらに、FGF-2 刺激の細胞内シグナル伝達分子である Akt および MAPK の発現とリン酸化、および象牙芽細胞分化マーカーである DSP, DMP-1,

および Nestin の発現をウエスタンブロット法で検討する。また、FGF-2 を刺激した KN-3 細胞に対して、シグナル伝達に与するタンパク質阻害剤を使用することによって、その影響を検討する。

4. 研究成果

(1) KN-3 細胞に影響を及ぼす BMP-2 の至適濃度の決定

① BMP-2 の存在下・非存在下で KN-3 細胞を培養後、形態変化を位相差顕微鏡で観察したところ、BMP-2 により KN-3 細胞の形態に大きな変化はみとめられなかった (図 1)。

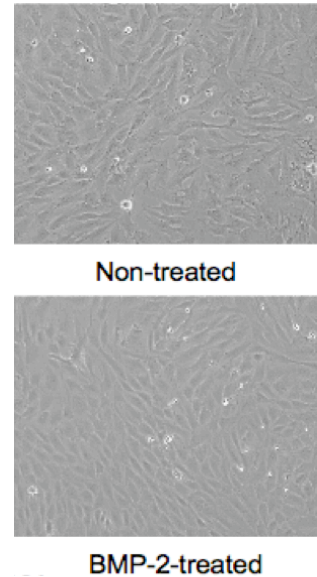


図 1 ; 形態学的変化

② 細胞中のミトコンドリア脱水素酵素によるテトラゾリウム塩 (WST-1) のホルマザン色素への変換を測定することによる細胞増殖能への影響を検討したところ BMP-2 刺激による影響は認められなかった (図 2)。

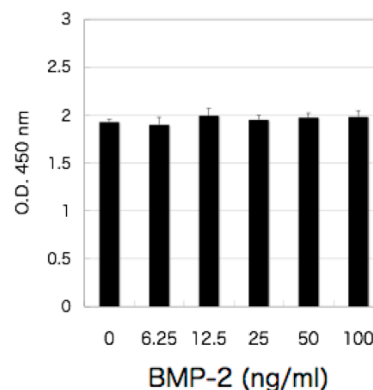


図 2 ; 細胞増殖能の変化

③ アルカリ性フォスファターゼ (ALP) 活性測定による石灰化能への影響を検討したところ、BMP-2 刺激による影響は認められなかった (図 3)。

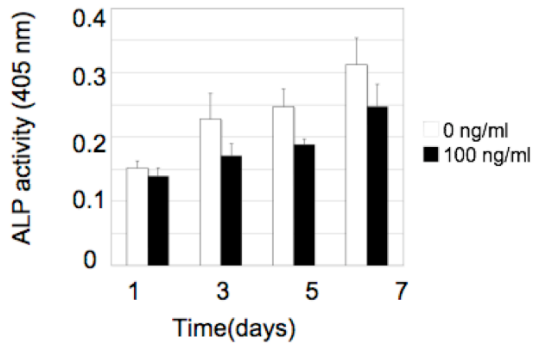


図 3 ; ALP 活性の変化

①～③より、至適濃度を 100 ng/ml に決定した。

④KN-3 細胞における BMP-2 刺激の細胞内シグナル伝達分子である各種 Smad の発現とリン酸化をウエスタンブロット法で検討したところ、100 ng/ml BMP-2 を 30 分間刺激した時に Smad1/5/8 のリン酸化発現は最も強く、Smad6 および Smad7 の発現は時間依存的に発現が上昇した (図 4)。

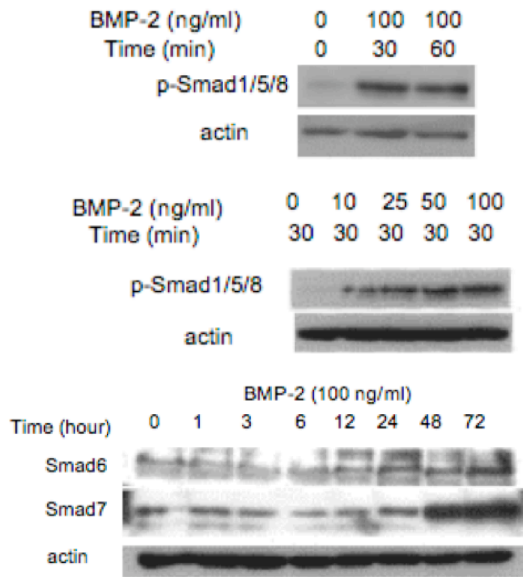


図 4 ; Smad の発現およびリン酸化

⑤100 ng/ml BMP-2 刺激した KN-3 細胞の象牙芽細胞分化マーカーである DSP、DMP-1 の発現をウエスタンブロット法で検討したところ、時間依存的に発現が上昇した (図 5)。

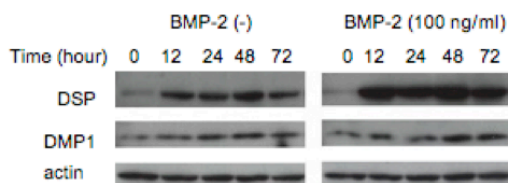


図 5 ; 象牙芽細胞分化マーカーの発現

④および⑤より KN-3 細胞の BMP-2 による象牙芽細胞への分化には Smad シグナル伝達経路の活性が関与していることが示唆された (図 6)。

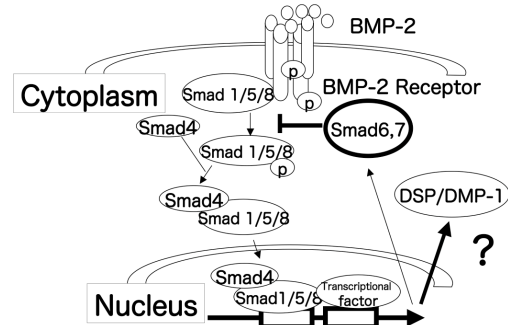


図 6 ; KN-3 細胞の Smad シグナル経路図

(2)KN-3 細胞に影響を及ぼす FGF-2 の影響

①FGF-2 の存在下・非存在下で KN-3 細胞を培養後、形態変化を位相差顕微鏡で観察したところ、FGF-2 刺激により KN-3 細胞は細胞突起伸長が認められた (図 7)。

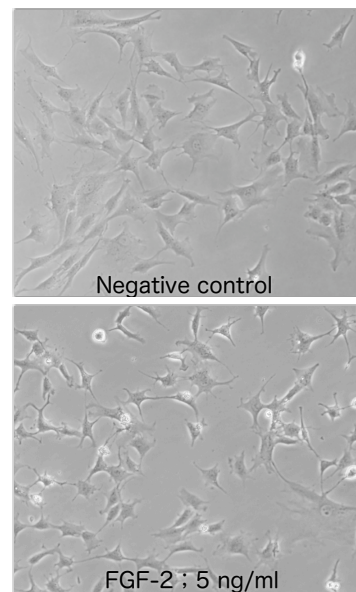


図 7 ; 形態学的変化

②WST-1 による細胞増殖能への影響を検討したところ FGF-2 刺激により KN-3 細胞は細胞増殖傾向が認められた (図 8)。

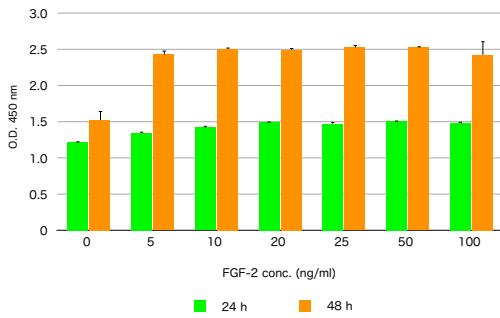


図 8 ; 細胞増殖能の変化

③ALP 活性測定による石灰化能への影響を検討したところ、BNP-2 刺激による石灰化能は低下した (図 9)。

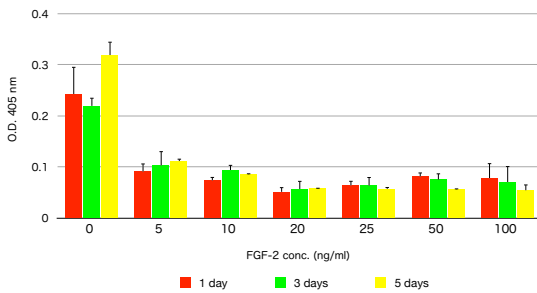


図 9 ; ALP 活性の変化

④FGF-2 刺激した KN-3 細胞の神経細胞分化マーカーである Neurofilament 68 (NF68) の発現をウエスタンブロット法で検討した。Control として神経成長因子 (Nerve Growth Factor ; NGF) を刺激すると神経細胞に分化する PC12 細胞 (ラット由来副腎髄質褐色細胞腫細胞) を使用した。KN-3 細胞において NF68 の発現は認められなかった (図 10)。

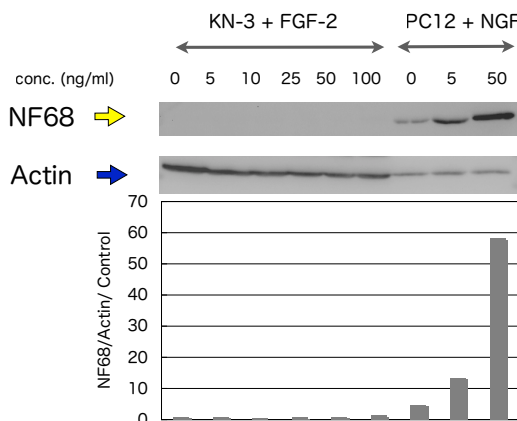


図 10 ; NF68 の発現

⑤FGF-2 刺激した KN-3 細胞の DSP、DMP-1、Nestin の発現をウエスタンブロット法で検討したところ、DSP の発現の上昇が認められた (図 11)。

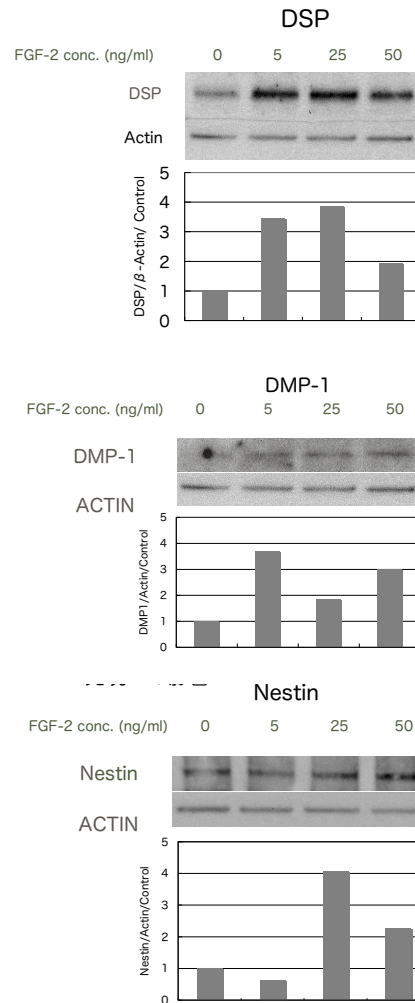


図 11 ; 象牙芽細胞分化マーカーの発現

⑥KN-3 細胞における FGF-2 刺激の細胞内シグナル伝達分子である Akt および MAPK の発現とリン酸化をウエスタンブロット法で検討したところ、5 ng/ml FGF-2 を 30 分間刺激した時に ERK のリン酸化は最も強く発現した (図 12)。

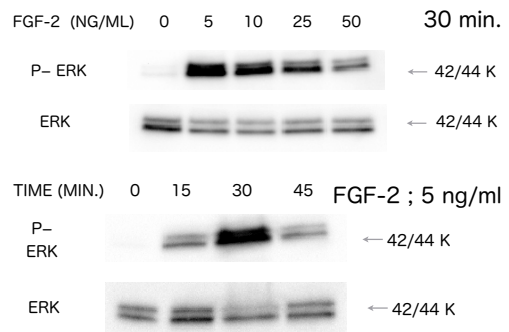


図 12 ; ERK の発現

①～⑥より、象牙芽細胞の特徴を有する KN-3 細胞は FGF-2 の刺激により ERK 経路を介して

象牙芽細胞へと分化してい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 3 件)

- ① Ayako Washio, Chiaki Kitamura, Takahiko Morotomi, Possible Involvement of Smad Signaling Pathways in Induction of Odontoblastic Properties in KN-3 Cells by Bone Morphogenetic Protein-2, a Growth Factor to Induce Dentin Regeneration, International Journal of Dentistry, 査読有, VOL. 2012, 2012 年, DOI:10.1155/2012/258469
- ② Chiaki Kitamura, Tatusji Nishihara, Ayako Washio, Local regeneration of dentin-pulp complex using controlled release of FGF-2 and naturally derived sponge-like scaffolds. Special issue "Tissue Engineering in Dentistry", International Journal of Dentistry, 査読有, VOL. 2012, Article ID 190561, 8 pages, 2012 年, DOI:10.1155/2012/190561
- ③ Chiaki Kitamura, Tatusji Nishihara, Ayako Washio, Regeneration approach for dental pulp and periapical tissues with growth factors, biomaterials, and laser irradiation. Special issue "Polymers for Oro-Dental and Cranio-Maxillo-Facial Applications", Polymers 3(4), 1776-1793, 2011.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 鷺尾 絢子、FGF-2 は象牙芽細胞様細胞の形態変化を誘導する、第 9 回日本再生歯科医学学術大会・総会、2011 年 9 月 10 日
- ② 鷺尾 絢子、象牙芽細胞分化に及ぼす FGF-2 の影響、第 32 回日本歯内療法学会学術大会、2011 年 7 月 30、31 日
- ③ 鷺尾 絢子、FGF-2 が象牙芽細胞様細胞に及ぼす影響、第 134 回日本歯科保存学会、2011 年 6 月 9、10 日
- ④ 鷺尾 絢子、象牙芽細胞様細胞の分化における FGF-2 の影響、第 71 回九州歯科学会総会、2011 年 5 月 28、29 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鷺尾 絢子 (WASHIO AYAKO)
九州歯科大学・歯学部歯学科・助教
研究者番号：10582786

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：