

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17037

研究課題名（和文）歯髄細胞機能制御因子である MXRA5 を用いた新規歯髄温存療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel vital pulp therapy with pulpal function control factor MXRA5

研究代表者

吉田 和真（Yoshida, Kazuma）

広島大学・医系科学研究科（歯）・助教

研究者番号：60846856

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：歯髄間葉系幹細胞（dental pulp stem cells: DPSC）はその高い増殖能や易回収性により、有用な幹細胞ソースとして様々な組織再生への応用が期待されている。さらに、DPSC は骨髄由来間葉系幹細胞（BMSC: bone marrow stem cells）と比べて細胞増殖能が高いとの報告がある。しかしながら、DPSC が高い増殖能を持っている機構については十分に明らかとなっていない。そこで本研究では、NCBI GO analysis database の検索により、DPSC が高い増殖能を持つ分子基盤を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DPSCの高い増殖能を持つ分子基盤を明らかにすることによって、現在では難しいDPSCの臨床応用を行うことに近づけることができる。また、BMSCとの違いを見出すことによって、BMSCに対する相違点、細胞の性質などを把握することによって、未分化性が高く維持されているBMSCに対する理解が一步前進する。

研究成果の概要（英文）：Dental pulp mesenchymal stem cells (DPSC) are expected to be applied to various tissue regeneration as a useful stem cell source due to their high proliferative ability and productivity. Furthermore, it has been reported that DPSCs have a higher cell proliferation ability than bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs). However, the mechanism by which DPSCs maintain high proliferative capacity remains unclear. In this study, we searched the NCBI GO analysis database to clarify the molecular basis of the high proliferative capacity of DPSCs.

研究分野：歯内療法学

キーワード：歯髄幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は多分化性や抗炎症能を持つことから多くの組織再生治療において重要な役割を果たすことが知られている。一方、歯髄細胞も高い分化能と増殖能を持ち再生医療への応用が期待されるが、その細胞特性を支持する分子基盤は明らかとなっていない。申請者は間葉系幹細胞が高発現する分泌タンパクである Matrix Remodeling Associated-5 (MXRA5) を、歯髄細胞が高発現することを見出した。予備的実験から、MXRA5 発現が抑制された歯髄細胞では細胞増殖能・遊走能・石灰化能の低下が認められた。う蝕や酸性条件下での露出象牙質の脱灰により象牙質からは多量の TGF- $\beta$  が放出されるが、MXRA5 の歯髄細胞における発現・分泌は TGF- $\beta$  により著明に上昇することも併せて見出した。これら結果より、MXRA5 は歯髄組織中の恒常性維持を多面的に担う因子であると考え、本研究では MXRA5 の歯髄組織/細胞における機能解析ならびにその再生医療への応用可能性を検討することを目的とする。

## 2. 研究の目的

MXRA5 は細胞接着とマトリクスリモデリングに関する因子として、2002 年に同定された (Walker, et al. 2002.)。それ以降、非小細胞肺癌における予後と関連する因子である (Xiong, et al. 2012.)、腎臓における組織線維化に関連する因子である (Poveda, et al. 2017.)、妊娠高血圧腎症において発現が低下する (Ding, et al. 2018.) などの報告がある。これらの報告は、MXRA5 が細胞遊走や細胞分化に関連することを示唆している。

歯髄組織は血管や神経線維、免疫担当細胞、線維芽細胞などを持つヘテロな細胞の集団で構成され、間葉系幹細胞が多く含まれることが知られている。歯髄間葉系幹細胞 (dental pulp stem cells: DPSC) は象牙質/歯髄複合体受傷時の組織修復や歯髄組織の感染制御に重要な機能を果たす。さらに、DPSC はその高い増殖能や易回収性により、有用な幹細胞ソースとして様々な組織再生への応用が期待されている。さらに、DPSC は骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC: bone marrow stem cells) と比べて細胞増殖能が高いとの報告もある。しかしながら、DPSC が高い増殖能を維持する機構については十分に明らかとなっていない。これまでの予備実験から、前述の MXRA5 がこの分子基盤を支える鍵になっていると考え、歯髄組織および歯髄細胞内での機能役割を検討する。

## 3. 研究の方法

MXRA5 の抗炎症作用について検討を行った。炎症を引き起こす種々の試薬で歯髄細胞や免疫細胞を刺激し、mRNA およびタンパク質レベルで炎症への関与を検討する。また、各種抗体を用いて、細胞内シグナリングについて western blot 法で検討を行う。

つぎに、生体組織内での MXRA5 の役割を検討するために、当施設での倫理委員会に承認を得、ヒト抜去歯牙を実験に供与した。具体的には、歯髄組織を取り出しのち、各種試薬で刺激を行うものや、脱灰後、切片に薄切して免疫学的染色等を行った。

これまでに当研究室で樹立済みのリコンビナントタンパク質の歯髄細胞への作用の検討を行った。具体的には、Boyden chamber で細胞を培養し、細胞遊走能をみるものや、スクラッチ assay で創傷治癒能の検討等を行った。

NCBI の The gene ontology database and informatics resource (GO analysis) から DPSC と MSC の遺伝子発現を whole genomic と比較した研究を抽出し、DPSC が高い細胞増殖能を持つ遺伝

子発現基盤を明らかにするために、歯髄組織に高発現する細胞外基質コード遺伝子 MXRA5 の発現パターンと MXRA5 が DPSC の増殖に与える影響を調べた。NCBI の The gene ontology database and informatics resource (GO analysis) において Term [DPSC、 MSC、 Human] で検索を行い、DPSC と BMSC の比較データとして 2x RNA-seq data (GSE123973、 GSE105145) と 1x microarray data (GSE113297) を抽出した。MXRA5 特異的 siRNA (siMXRA5) を DPSC にトランスフェクションし、total RNA を RNA-seq に供与し、網羅的に遺伝子発現を調べた。siMXRA5 をトランスフェクションした DPSC を SDS-PAGE で展開し、MAPK 経路への関与を確認するために、各種抗体を用いて western blot を行った。

#### 4. 研究成果

歯髄細胞に TNF  $\alpha$  で炎症を惹起すると、MXRA5 の発現が減少した。また、抜去歯牙から歯髄組織を取り出し、TNF  $\alpha$  で刺激後、mRNA 抽出を行った結果、MXRA5 の発現が減少した。このことから、*in vivo*、*in vitro* とともに同じ結果が示された。

歯髄細胞に TNF  $\alpha$  で炎症を惹起した際の培養上清を回収し、ELISA に供与し、タンパク質レベルでの検討を行った。MXRA5 に対する siRNA (siMXRA5) を歯髄細胞にトランスフェクションした群とコントロール siRNA 群では、炎症マーカーに変化はみられなかった。また、リコンビナントタンパク質をふりかけても、炎症を抑制することはできなかった。

リコンビナントタンパク質の歯髄細胞への影響を検討するため、まずは細胞生存 assay を行った。高濃度になると細胞生存率が低下するため、実験では有意差のない濃度で刺激を行った。

歯髄細胞がコンフルエントになるまで培養し、200  $\mu$ L のチップの先端で細胞を剥がし、創傷モデルとした。リコンビナントタンパク質を振りかけたが、創傷治癒を促進できなかった。また、upper well に歯髄細胞、lower well にリコンビナントタンパク質を入れた Boyden chamber 実験条件下において、歯髄細胞に対して細胞遊走能があることが分かった。また、微小管阻害薬で刺激すると遊走能は低下した。

歯髄組織に対して免疫学的染色を行った結果、血管周囲組織に CD105 といった未分化マーカーとの共発現が確認された。これまでに当研究室で行っていた歯髄細胞での実験と関連があることが確認できた。

siMXRA5 によって、DPSC の細胞増殖能と細胞遊走能が低下した。細胞増殖能は、TUNEL 染色を行った細胞のソーティングの結果、MXRA5 の下方制御によって細胞増殖能が低下していることが判明した。また、MXRA5 の下方制御によって生じる細胞外マトリクスの発現の低下によって、細胞増殖能が低下することがわかった。

GO analysis のバイオインフォマティクス解析結果のうち、GSE123973 と GSE113297 では、Retinoblastoma 関連分子や Cell cycle、DNA replication の遺伝子発現が BMSC と比較して DPSC で上昇していることが明らかとなった。さらに、MXRA5 は GSE123973、GSE105145、GSE113297 において、それぞれ全遺伝子中 3、341、39 番目に DPSC 高発現遺伝子であることを見出した。

RNA-seq の結果から、MXRA5 は細胞周期チェックポイントに関わる遺伝子の発現と関連があった。siMXRA5 は DPSC の細胞増殖能を低下させた。一方、MXRA5-full と MXRA5-PV を過剰発現した DPSC の細胞増殖はコントロール細胞と比較して促進された。Western blot の結果、siMXRA5 をトランスフェクションした DPSC の ERK のリン酸化抑制と JNK の発現抑制がみられた。

以上から、MXRA5 は DPSC にとって重要な細胞外マトリクスであることが分かった。MXRA5

の活用によって、歯髄組織に由来する未分化な間葉系幹細胞の産出や、VPT における臨床成績の改善が見込まれるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida Kazuma, Suzuki Shigeki, Yuan Hang, Sato Akiko, Hirata-Tsuchiya Shizu, Saito Masahiro, Yamada Satoru, Shiba Hideki	4. 巻 13
2. 論文標題 Public RNA-seq data-based identification and functional analyses reveal that MXRA5 retains proliferative and migratory abilities of dental pulp stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-42684-z	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田和真, 鈴木茂樹, 佐藤瞭子, 山田聡, 柴秀樹
2. 発表標題 歯髄細胞におけるMXRA5の機能解析
3. 学会等名 日本歯科保存学会秋季学術大会(第157回)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------