

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592806

研究課題名(和文) ヒト歯髄幹細胞を用いた硬組織再生の試み

研究課題名(英文) Attempts to identify the hard tissue regeneration by human dental pulp stem cells

研究代表者

片山 直 (Katayama, Tadashi)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：10105596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄組織内には未分化間葉系細胞が豊富に存在し、さらには幹細胞を多く含む事が知られている。しかしながら、未だ歯髄幹細胞の特徴や分化誘導のシグナル伝達についての解明は不十分である。そこで我々はヒト歯髄幹細胞における幹細胞表面マーカーの一つであるCD44の発現を確認した所、CD44は約60%もの発現が確認された。そこでCD44のリガンドと考えられているヒアルロン酸を用いて歯髄幹細胞を刺激した所、アルカリフォスファターゼの発現が誘導された。つまりCD44のシグナル伝達により、歯髄幹細胞が効率的に石灰化誘導される事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In general, undifferentiated mesenchymal cells are in abundant supply in human dental pulp tissue, and it is known that containing a large number of stem cells. However, the clarification of characteristics of dental pulp stem cells (DPSCs) and differentiation signaling are still unknown. Therefore, We determined expression of CD44 that is known as a stem cell surface marker upon human DPSCs. The CD44 expression was approximately 60%. Then, hyaluronic acid that is a ligand of CD44 treatment induced expression of alkaline phosphatase. These data suggested that CD44 signaling may induce efficient calcification on DPSCs.

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：再生医学 歯学 生体材料 歯髄 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

再生医療の必要性が叫ばれ、実現へのいくつかの可能性がしめされるようになってきた。胚性幹細胞 (ES 細胞)、iPS 細胞など大きな夢と可能性を秘めた実験方法が確立されてきている。しかしながら、これらの方法は、倫理上の問題あるいは導入する遺伝子の問題などから臨床応用にはかなりの険しい道が予想される。そこで安全性が高い自己由来の生体材料による再生医療が望まれている。歯科医療においては、従来、歯髄組織内に未分化間葉系細胞が豊富に存在し、さらには幹細胞を多く含む事が知られている。そこで、再生医療の観点から歯髄に含まれる幹細胞 (歯髄幹細胞: Dental pulp stem cells) を分離し、神経、筋組織、さらに歯牙の再生に応用できるという報告がされるようになった。現在、多くの研究者がヒト歯髄細胞から iPS 細胞を作成したり、将来の歯牙再生移植を含む再生医療のために歯髄バンク設けたりされている。しかしながら、未だ歯髄幹細胞の特徴や分化誘導するためのシグナル伝達についての解明は不十分である。

2. 研究の目的

近年、歯髄組織には多分化能を有する歯髄幹細胞 (DSCs: Dental pulp stem cells) の存在することが明らかになっている。しかしながら、同細胞には未だ明確な細胞表面マーカーが存在せず、また、同細胞に対する自己由来増殖因子を応用し、その増殖と分化を促進しようとする試みは行われていない。一方、申請者らは現在までの一連の研究の中で、洗浄血小板をヒト歯髄細胞培養系に作用させることにより、同細胞の増殖と分化が同時に促進されるという知見を見いだした。本来、増殖と分化はそう反する事象であるが、本培養系では洗浄血小板を作用させる事により、ヒト歯髄細胞の初期増殖の促進と骨様の石

灰化の促進が観察された。この骨様の石灰化時期に一致して、歯髄細胞の分化に関連する bone glaprotein (BGP) の発現促進が認められた。従来、歯髄細胞の分化には BMP-2 が重要な働きを担うことは明らかになっているが、申請者らの事前の研究により洗浄血小板が BMP を始めとする TGF スーパーファミリーの発現を刺激し、歯髄幹細胞から骨芽細胞へと分化誘導すると考えられた。従って、ヒト歯髄細胞から幹細胞を分離し、歯髄幹細胞を始めとした、個々の細胞に対する洗浄血小板の作用を詳細に検討する事により、より効率的な硬組織再生を実現できるものと考えられる。

3. 研究の方法

ヒト歯髄細胞より歯髄幹細胞を分取し、フローサイトメトリー、リアルタイム PCR、ウエスタンブロッティング法にて幹細胞マーカーの探索をし、洗浄血小板もしくは他の安全性の高い材料による歯髄幹細胞の骨芽細胞への分化誘導能を検証する。

4. 研究成果

まず申請者らは幹細胞マーカーの一つである CD44 が歯髄幹細胞に発現しているか検証した。

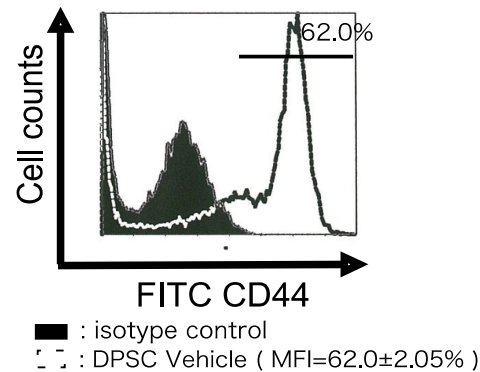


図1 歯髄幹細胞中における CD44 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析。

この結果より、歯髄幹細胞には約 60% の CD44 陽性細胞が含まれている事が明らかとなった。次に、CD44 のリガンドであるヒアルロン酸で歯髄幹細胞を刺激した場合、CD44 の発現が増加するのか検証した。

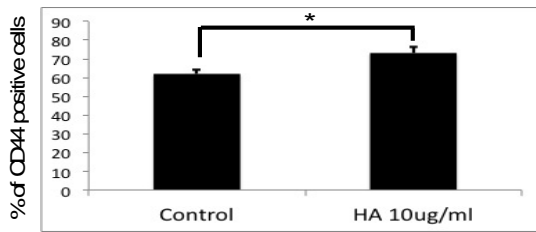


図2 CD44 蛍光染色画像における CD44 が歯髄幹細胞の表面の局在と CD44 陽性細胞が約 60%から 75%と増加した。

次に歯髄幹細胞をヒアルロン酸で刺激した場合分化誘導されるか検討した。

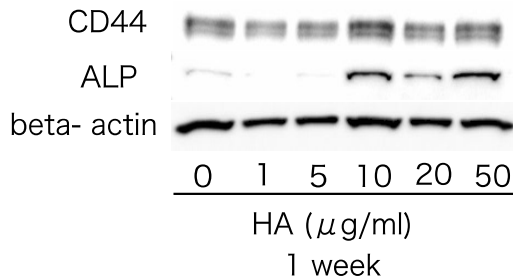


図3 ヒアルロン酸により歯髄幹細胞はアルカリフォスファターゼの発現が上昇。

アルカリフォスファターゼは石灰化の前駆期に活性誘導される事が知られており、歯髄幹細胞はヒアルロン酸により石灰化に誘導された事が示唆された。

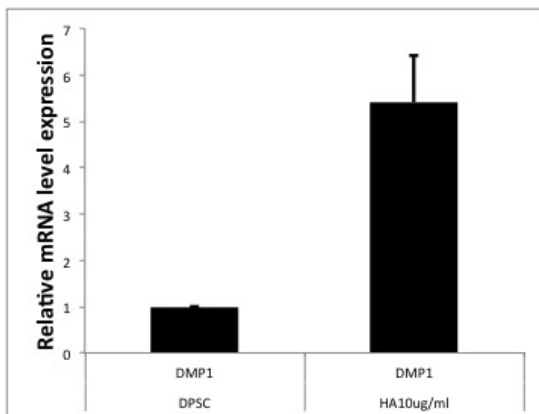


図4 歯髄幹細胞はヒアルロン酸により DMP1 の mRNA レベルが上昇する。

DMP1 は Dentin matrix acidic phosphoprotein 1であり骨もしくは象牙質の石灰化、分化に重要な役割を持つ遺伝子であり、歯髄幹細胞がヒアルロン酸により象牙質に分化誘導された事を示す。

この結果から歯髄幹細胞の CD44 シグナル伝達によりアルカリフォスファターゼが増加し、象牙質への分化誘導される事が示唆さ

れた。
 今後はより歯髄幹細胞の CD44 シグナル伝達の詳細を解明していく予定である。

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 2 件)

Alaa Baryyan, Umashankar Das, Hiroshi Sakagami, Tadashi Katayama, Jan Balzarini, Erik De Clercq, Masami Kawase Joseph Molnár, Rajendra K. Sharma, and Jonathan R. Dimmock:

3,5-bis{4-[4-(2-Aminoethoxy)phenylcarbo-nyloxy]benzylidene}-1-methyl-4-piperido-nes: A novel class of tumour-selective cytotoxins. J Enzyme Inhib Med Chem 2014 *in press*.

Emika Ohkoshi, Naoki Umemura, Tadashi Katayama, Hiroshi Sakagami: CD44 expression in human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is stimulated by baicalin, a common constituent of traditional herbal (Kampo) medicines classified as Bupleurum root drugs, and its aglycone baicalein. Food and Chemical Toxicology 2014 *in press*

[学会発表](計 0 件)

[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

片山 直 (Katayama Tdashi)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号：10223017

(2) 研究分担者

坂上 宏 (Sakagami Hiroshi)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号：50138484

(3) 研究分担者

梅村直己 (Umemura Naoki)
明海大学・歯学部・助教
研究者番号：80609107

(4) 研究分担者

石原 祥世 (Ishihara Sachiyo)
明海大学・歯学部・講師
研究者番号：10223017