

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592785

研究課題名(和文) 幼若象牙芽細胞に発現するOsterixの細胞分化における機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Osterix in immature odontoblasts for cell differentiation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：象牙質形成ならびに再生過程において、分化初期の幼若象牙芽細胞にはOsterixが局在するが、成熟化とともに発現が減弱、消失することを明らかにした。また、歯髄細胞を用いた象牙芽細胞もしくは骨芽細胞への分化誘導実験において、分化初期では共にOsterixの陽性反応が認められたが、象牙芽細胞へ分化した細胞のみ反応が消失することが示された。以上より、硬組織形成細胞への分化過程におけるOsterixの一時的な発現と、その後の消失が象牙芽細胞分化に重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Osterix was localized in odontoblasts just beginning dentin matrix secretion during the processes of dentin formation and regeneration. However, as dentin formation progressed, this immunoreactivity decreased in intensity. In addition, although osteoblasts that were differentiated from dental pulp cells maintained the reactivity of Osterix, this reactivity was not detected in mature odontoblasts originated from pulp cells. Therefore, these results suggest that temporary expression of Osterix in odontoblast-lineage cells might play important roles in odontoblast differentiation and regeneration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Osterix 象牙芽細胞

1. 研究開始当初の背景

歯の形態形成は BMPs および TGF- β s などの成長因子, Msx2, Runx2 をはじめとする転写調節因子などの関与が重要であると考えられている。しかし, 象牙芽細胞の分化に関与する遺伝子については, どの分子が重要であるのかは不明であり, これを解明することは歯髓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。本研究は, 象牙芽細胞分化過程における Osterix (SP7) による調節機構を検索し, この遺伝子を用いた歯髓細胞の自己修復・再生能力を賦活化する治療法の開発により, 歯を長期にわたり保存することを目指す基礎研究として計画した。

2. 研究の目的

本研究で注目した Osterix は, 骨芽細胞の分化を決定する転写調節因子である。この分子は, 遺伝子欠損マウスの解析において, 骨と歯の硬組織形成阻害が認められたことから (Nakashima et al., Cell, 17-29, 2002), 間葉系細胞の硬組織形成細胞への分化を広く制御していると考えられている。しかしながら, Osterix の歯の形態形成における機能についての知見は乏しく, Osterix による象牙芽細胞分化の調節機構, 特に分化後の象牙芽細胞における Osterix の役割については不明な点が多い。

我々は, 象牙芽細胞の分化過程において, 象牙質形成開始直後の幼若象牙芽細胞に Osterix が特異的に局在することを予備実験的に見いだした。これは, 象牙芽細胞の分化初期から Osterix 発現が必要であることを示唆する所見である。そこで本研究では, 歯の発生および歯髓再生過程における Osterix 陽性細胞の局在を免疫組織化学的に検索する。また, 歯髓細胞が象牙芽細胞もしくは骨芽細胞へ分化する過程における Osterix 発現を比較検討することにより, Osterix の象牙芽細胞分化における機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 歯の発生過程における Osterix 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した。ウサギポリクローナル抗マウス Osterix (Abcam, Cambridge, UK) 抗体ならびに Histofine Simple Stain rat MAX-P0 (MULTI; NICHIREI Co., Tokyo, Japan) を用い, 免疫組織化学的に Osterix 陽性細胞の局在を観察した。

(2) 歯髓再生過程における Osterix 局在の検討

4 週齢ラット下顎第一臼歯近心面に深さ約 400 マイクロメートルの象牙質窩洞を形成し,

形成 1 日～8 週後の歯髓組織における Osterix 局在を検討した。

(3) 歯髓細胞による象牙芽細胞および骨芽細胞誘導実験

4 週齢 Green fluorescent protein (GFP) 発現ラット上顎第一臼歯を抜歯し, ただちに野生型ラット腹部皮下へ他家移植した。5, 10, 20 日後に移植歯を周囲組織と共に取り出し固定, 矢状断パラフィン切片を作製し, H-E 染色ならびに免疫組織化学的手法にて, Osterix, α -平滑筋アクチン, GFP の局在を観察した。

(4) Osterix の Small ubiquitin related modifier (SUMO) 化修飾の検討

Lewis 系ラット下顎第一臼歯の発生過程ならびに窩洞形成後の SUMO-1, SUMO-2/3, Ubc9 の免疫局在を Osterix と比較した。また, 免疫沈降法にて Osterix と SUMO-1 の結合を検討した。

(5) 歯髓未分化細胞の分化過程における Osterix 発現

未分化細胞マーカーの 1 つである Thy-1 (CD90) を用い, 未分化と考えられる歯髓細胞を FACS により分取した。分取した歯髓細胞を硬組織形成細胞へ分化誘導し, Osterix 発現を検討した。また, この細胞をハイドロキシアパタイト (CELL-YARD HA scaffold, ペンタックス, Tokyo, Japan) と共に, ラット皮下へ移植した。

4. 研究成果

(1) 歯胚形成過程における Osterix 局在

蕾状期 (E15) および帽状期 (E17) 歯胚において, Osterix の特異的な反応は認められなかった。象牙質形成が始まる鐘状期 (E20) になると, 象牙芽細胞で Osterix の陽性反応が認められたが, 前象牙芽細胞ならびに歯髓細胞は陰性であった。歯根形成期 (P7-28) では, 根尖部の象牙芽細胞で陽性反応を示したが, 歯冠部の象牙芽細胞では反応が減弱, 消失した。また, 鐘状期と同様に, 前象牙芽細胞ならびに歯髓細胞は陰性であった。

(2) 歯髓再生過程における Osterix 局在

窩洞形成 1 日後, 窩洞直下の象牙芽細胞層とその近傍の歯髓組織に壊死がみられ, Osterix の局在は認められなかった。4 日後, 壊死組織の修復とともに, 窩洞直下の歯髓組織に Osterix 陽性細胞の集積が観察された。7 日後, 円柱状の象牙芽細胞が再生し修復象牙質が形成されるようになると, 再生象牙芽細胞で陽性反応が認められた。再生象牙芽細胞におけるこれらの陽性反応は 4 週後まで観察されたが, 8 週以降, 再生象牙芽細胞の文が低くなると反応は消失した。

(3) 歯髓細胞の象牙芽細胞もしくは骨芽細胞

分化時の Osterix 発現

歯の皮下移植後 5 日において、歯髄上部に壊死が生じ典型的な象牙芽細胞は消失したが、根尖部の象牙質に接して象牙質様組織の薄層形成が認められた。10 日後、壊死組織の回復とともに、歯冠部歯髄で島状に骨様組織が形成された。20 日以降、歯冠部歯髄に形成された骨様組織は量を増した。歯の細胞由来であることを示す GFP は、根尖部および歯冠部歯髄の硬組織形成細胞で陽性を示した。幹細胞および前駆細胞マーカーの一つである - 平滑筋アクチンは、移植 10 日後の歯冠部歯髄において多数の陽性細胞が観察された。Osterix は、移植後 10 日の象牙質様および骨様組織形成細胞で陽性を示したが、20 日以降の象牙質様組織形成細胞での局在は消失した。

以上の結果から、Osterix は歯の発生および歯髄再生過程において、分化初期の象牙芽細胞では局在が認められるが、細胞の成熟化とともに発現が消失することが示された。

(4) Osterix の SUMO 化修飾の検討

SUMO 化修飾は、ユビキチン化に類似したタンパク質翻訳後修飾であり、多くの転写因子に対して転写を調節することが報告されている。SUMO タンパク質 (SUMO1, SUMO2/3) および SUMO 化修飾に必須の酵素である ubiquitin conjugating enzyme 9 (Ubc9) は、鐘状期以降の歯の発生過程において、Osterix 陽性細胞特異的に共局在することが明らかとなった。また免疫沈降法にて、Osterix と SUMO-1 タンパクの結合を確認したことから、Osterix は SUMO 化修飾を受けることが示された。従って、SUMO 化修飾因子は分化直後の象牙芽細胞において Osterix の転写を調節し、象牙芽細胞分化に重要な役割を担うことが示唆された。

(5) 歯髄未分化細胞の分化過程における Osterix 発現

Thy-1 陽性歯髄細胞は Osterix をほとんど発現していなかったが、硬組織形成細胞へ分化誘導すると発現が上昇した。この細胞をハイドロキシアパタイトとともにラット皮下へ移植すると、Osterix を発現し続け、骨様組織を形成した。

以上の結果から、象牙芽細胞分化には初期段階で Osterix が一時的に発現し、その後消失することが重要であると考えられた。一方、発現が消失しない場合は、歯髄細胞であっても骨芽細胞に分化することが明らかとなった。

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)

Nagako Yoshiba, Kunihiro Yoshiba, Naoto

Ohkura, Erika Takei, Naoki Edanami, Youhei Oda, Akihiro Hosoya, Hiroaki Nakamura, Takashi Okiji. Correlation between Fibrillin-1 degradation and mRNA downregulation and myofibroblasts differentiation in cultured human dental pulp tissue. J Histochem Cytochem (in press). 査読有

Akihiro Hosoya, Hiroaki Nakamura. Ability of stem and progenitor cells in the dental pulp to form hard tissue. Jpn Dent Sci Rev (in press). 査読有

Akihiro Hosoya, Akira Yukita, Tadashi Ninomiya, Toru Hiraga, Kunihiro Yoshiba, Nagako Yoshiba, Etsuo Kasahara, Hiroaki Nakamura (2013). Localization of SUMOylation factors and Osterix in odontoblast lineage cells during dentin formation and regeneration. Histochem Cell Biol 140(2):201-211. 査読有
DOI: 10.1007/s00418-013-1076-y

Akihiro Hosoya, Akira Yukita, Kunihiro Yoshiba, Nagako Yoshiba, Masafumi Takahashi, Hiroaki Nakamura (2012). Two distinct processes of bone-like tissue formation by dental pulp cells after tooth transplantation. J Histochem Cytochem 60(11):861-873. 査読有
DOI: 10.1369/0022155412459741

[学会発表](計 11 件)

Akihiro Hosoya, Tadashi Ninomiya, Kunihiro Yoshiba, Nagako Yoshiba, Michiko Nakatsuka, Hiroaki Nakamura 「Immunohistochemical Localization of Bmi1 during odontoblast differentiation and regeneration」第 120 回日本解剖学会 平成 27 年 3 月 22 日 神戸国際会議場(兵庫)

Nagako Yoshiba, Kunihiro Yoshiba, Naoto Ohkura, Erika Takei, Naoki Edanami, Youhei Oda, Akihiro Hosoya, Hiroaki Nakamura, Takashi Okiji 「Fibrillin-1 Degradation and Myofibroblasts Induction in Cultured Human Dental Pulp」 IADR 93th General Session 平成 27 年 3 月 13 日 Hynes Convention Center (Boston, USA)

細矢明宏, 二宮 禎, 吉羽邦彦, 吉羽永子, 中塚美智子, 中村浩彰 「象牙芽細胞分化における Bmi-1 の機能」第 56 回歯科基礎医学会学術大会 平成 26 年 9 月 22 日 福岡国際会議場(福岡県)

吉羽永子, 吉羽邦彦, 大倉直人, 細矢明宏, 中村浩彰, 興地隆史 「ヒト歯髄組織から outgrowth する細胞による組織構築に関する

る研究」第55回歯科基礎医学会学術大会
平成25年9月22日 岡山コンベンションセン
ター(岡山県)

細矢明宏, 雪田 聡, 吉羽邦彦, 吉羽永
子, 笠原悦男, 中村浩彰 「皮下移植歯の歯
髓腔内に形成される骨様組織の由来」第55
回歯科基礎医学会学術大会 平成25年9月
21日 岡山コンベンションセンター(岡山
県)

細矢明宏, 雪田 聡, 吉羽邦彦, 吉羽永
子, 笠原悦男, 中村浩彰 「ラット臼歯皮下
移植後の歯髓腔内に出現する骨芽細胞様細
胞」第138回日本歯科保存学会・春季学会 平
成25年6月28日 福岡国際会議場(福岡県)

Akihiro Hosoya, Akira Yukita, Hiroaki
Nakamura 「Formation of bone-like tissues
by dental pulp cells after tooth
transplantation」2nd Joint Meeting of the
International Bone and Mineral Society
(IBMS) and the Japanese Society for Bone
and Mineral Research (JSBMR) 平成25年5
月30日 神戸国際会議場(兵庫県)

細矢明宏, 雪田 聡, 吉羽邦彦, 吉羽永
子, 中村浩彰 「皮下移植歯の歯髓腔内にお
ける骨様組織形成」第118回日本解剖学会
平成25年3月29日 かがわ国際会議場(香
川県)

Akihiro Hosoya, Akira Yukita, Kunihiko
Yoshiba, Nagako Yoshiba, Hiroaki Nakamura
「Origin of Bone-like Tissues in Dental
Pulp after Tooth Transplantation」The 60th
Annual Meeting of Japanese Association for
Dental Research 平成24年12月15日 新
潟コンベンションセンター(新潟県)

細矢明宏, 雪田 聡, 二宮 禎, 平賀 徹,
吉羽邦彦, 吉羽永子, 中村浩彰 「分化直後
の象牙芽細胞に局在する SUMO 化修飾因子と
Osterix」第54回歯科基礎医学会学術集会
平成24年9月15日 奥羽大学歯学部(福島
県)

細矢明宏, 雪田 聡, 二宮 禎, 平賀 徹,
吉羽邦彦, 吉羽永子, 中村浩彰 「SUMO 化修
飾因子の象牙質形成および再生過程におけ
る局在」第10回日本再生歯科医学会学術集
会 平成24年9月2日 ニチイ学館 神戸
ポートアイランドセンター(兵庫県)

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

中村 浩彰 (NAKAMURA Hiroaki)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 50227930

平賀 徹 (HIRAGA Toru)
松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 70322170

雪田 聡 (YUKITA Akira)
静岡大学・教育学部・講師
研究者番号: 80401214