

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792084

研究課題名(和文) TNF- α による歯髄細胞の幹細胞化に着目した象牙質再生機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of dentin regeneration focused on reprogramming of human dental pulp cells mediated by TNF-alpha

研究代表者

上枝 麻友 (Ueda, Mayu)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：20625719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒト歯髄組織から得られた歯髄細胞に炎症性サイトカインのひとつである TNF- α を作用させ、そのリプログラミング効果ならびにそのメカニズムを解析することにより、象牙質再生機序を明らかにするものである。

本研究により、短期間の TNF- α 刺激により歯髄細胞がより未分化な状態に誘導されることが示された。また、この作用は、TNF- α 特異的なものであり、NF- κ B 以外のシグナル経路も関与していることが推測された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the effects of a treatment with TNF-alpha on the stem cell phenotype and differentiation ability of human dental pulp cells, and elucidate of the mechanism of dentin regeneration.

In conclusion, our data show that a short-term treatment with TNF-alpha significantly increases the stem cell phenotype of DPCs as well as their function and multipotent differentiation ability. Additionally, our findings also demonstrate that the reprogramming depend on TNF-alpha specifically and NF-kB is not the only pathway involved in the TNF-alpha-enhanced stem cell phenotype of DPCs.

研究分野：補綴系歯学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：TNF- α 歯髄細胞 幹細胞化

1. 研究開始当初の背景

象牙質・歯髄複合体は修復能を持っており、齶蝕、咬耗、摩耗や窩洞形成などの歯の損傷時には歯髄保護のために象牙質の再生が起こることが知られている。しかしながら、これらの現象の生物学的メカニズムは完全には解明されていない。

ところで、炎症性サイトカインのひとつである腫瘍壊死因子 (TNF- α) は、炎症時に様々な細胞から産生され、その生物活性に深く関与している。中でも、TNF- α の過剰な産生は、破骨細胞活性化により骨吸収を促進したり、線維芽細胞や滑膜細胞へ作用し、コラゲナーゼやプロスタグランジン合成を促進し関節破壊や関節痛を引き起こしたり、あるいは血管内皮細胞へ作用し血管透過性の亢進、腫脹・浮腫の増悪などを惹起することがよく知られている。

一方で、近年の研究によると、創傷治癒過程では TNF- α は損傷の局所において初期の段階で発現し、様々な成長因子やサイトカインの発現を誘導、それに引き続く細胞遊走によって組織再生に関与している可能性も示唆されるようになった。すなわち、創傷治癒過程の初期段階においては TNF- α のシグナルが重要な役割を果たしていると推測される。事実、TNF- α は齶蝕に罹患した歯髄組織においても初期に発現が確認されている。しかし、象牙質・歯髄複合体の損傷に端を発する炎症再生連関において、TNF- α が歯髄細胞にどのような影響を及ぼしているのかは未だ明らかにはなっていない。

申請者は予備実験の段階ではあるがヒト抜去歯由来歯髄細胞に TNF- α を短期間作用させると間葉系幹細胞の表面抗原マーカーである SSEA4 や CD146 陽性細胞が増加することや oct4, nanog といった幹細胞マーカー遺伝子の発現が上昇することを確認している。このことは、培養ヒト歯髄細胞において

TNF- α は間葉系幹細胞の性質を保持した、より多分化能の高い細胞の比率を上昇させる可能性 (歯髄細胞の幹細胞化 (リプログラミング) 効果) があることを示している。しかし、その詳細な作用機序は不明である。

2. 研究の目的

ヒト歯髄組織から得られた歯髄細胞に TNF- α を作用させ、幹細胞化効果を検証し、そのメカニズムを *in vitro* で解析すること。

3. 研究の方法

(1) TNF- α の歯髄細胞のアポトーシスに対する効果を細胞染色、カスパーゼ活性を指標に検討した。

(2) TNF- α を 10 ng/ml の濃度で添加し 2 日間培養した後、継代培養を行ったヒト歯髄細胞 (以下、TNF- α 前処理群) を用い、その細胞特性について、細胞免疫染色、FACS、遺伝子発現コロニー形成能、テロメラゼ活性および細胞遊走能を指標に検討した。

(3) 歯髄細胞の多分化能に対する TNF- α 前処理の影響を調べるために、TNF- α で前処理した歯髄細胞を各種分化誘導培地で培養し、遺伝子発現、細胞染色を指標に無処理の歯髄細胞と多分化能を比較した。

(4) 歯髄細胞の幹細胞化が TNF- α 特異的な作用なのかについて解明するために、種々の炎症性サイトカインを歯髄細胞に作用させ、検討した。

(5) 幹細胞化作用のメカニズムを明らかにするため、TNF- α の主要なカスケードである NF- κ B のシグナル経路を阻害し TNF- α のシグナルを抑制することにより表面抗原の発現がどのように変化するかを確認した。

4. 研究成果

(1) TNF- α (10 ng/ml) を添加して 2 日間培養したヒト歯髄細胞 (TNF- α 添加群) の核を

染色したところアポトーシス細胞に見られるような核の凝集や断片化は観察されなかった。また、カスパーゼ活性は TNF- α 添加によりわずかに上昇するものの未処理群と比較すると大きな差は認められなかった。

(2) 初めに、細胞免疫染色を行なった結果、TNF- α 前処理群はコントロール群と比較して間葉系幹細胞のマーカーの STRO-1, SSEA4, CD146 陽性細胞数が増加した (図 1)。

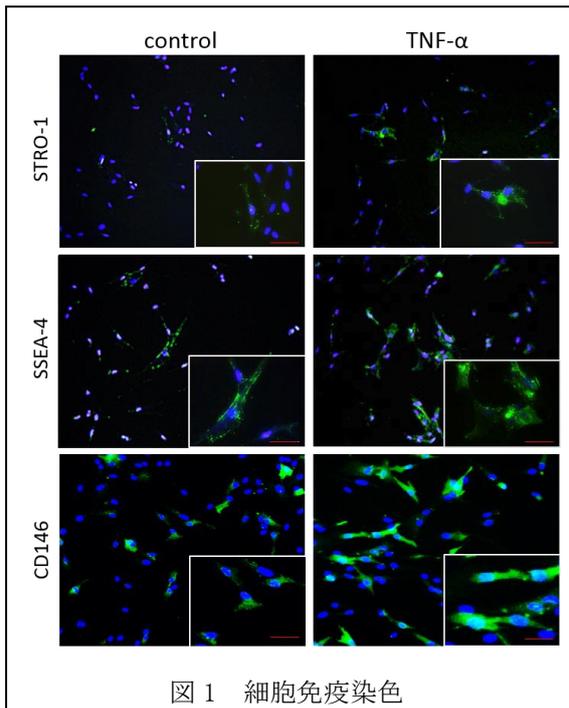


図 1 細胞免疫染色

次に、FACS による表面抗原動態解析を行なった結果、TNF- α 前処理群において間葉系幹細胞マーカーの SSEA4 および CD146 の陽性率が上昇した (図 2)。

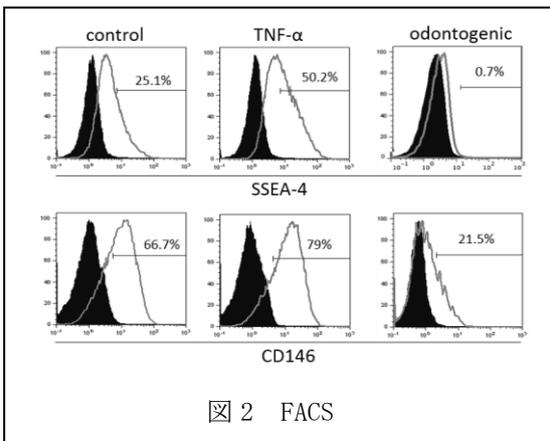


図 2 FACS

さらに、幹細胞マーカーである oct-4 や nanog の遺伝子発現の上昇も認められた (図 3)。

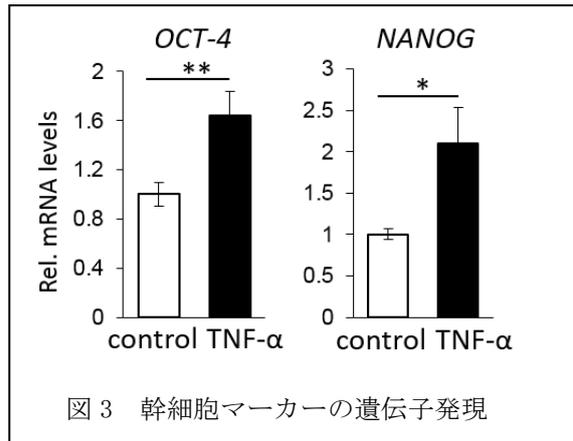


図 3 幹細胞マーカーの遺伝子発現

幹細胞の持つ特性であるテロメラーゼ活性 (図 4)、コロニー形成能 (図 5) および細胞遊走能 (図 6) は、それぞれ TNF- α 前処理により上昇した。

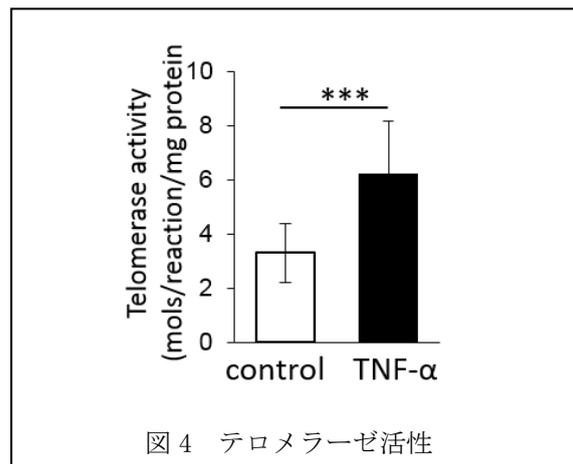


図 4 テロメラーゼ活性

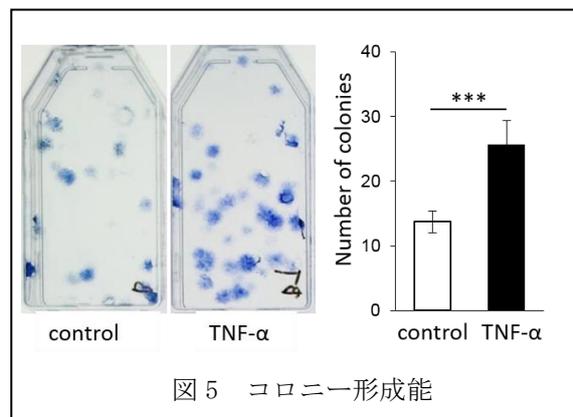
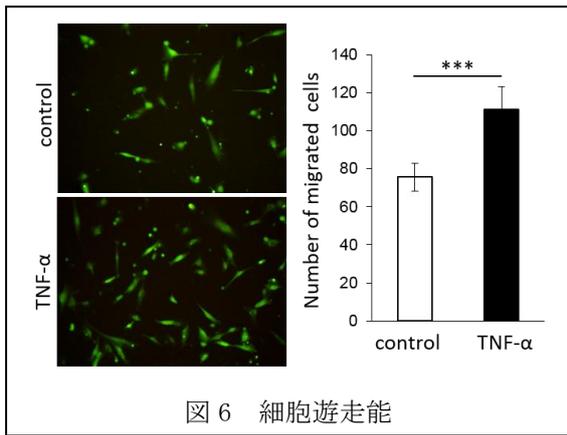


図 5 コロニー形成能



以上の結果より、TNF- α 刺激により歯髄細胞がより未分化な状態に誘導された、すなわち幹細胞様の性質を新たに獲得したことが推測された。

(3) 前処理群の培養ヒト歯髄細胞は、各種分化誘導培地で培養すると、それぞれ骨芽・象牙芽細胞、脂肪細胞の分化マーカー遺伝子の発現が亢進し、各種細胞染色においてもその染色性が亢進した (図 7, 8)。

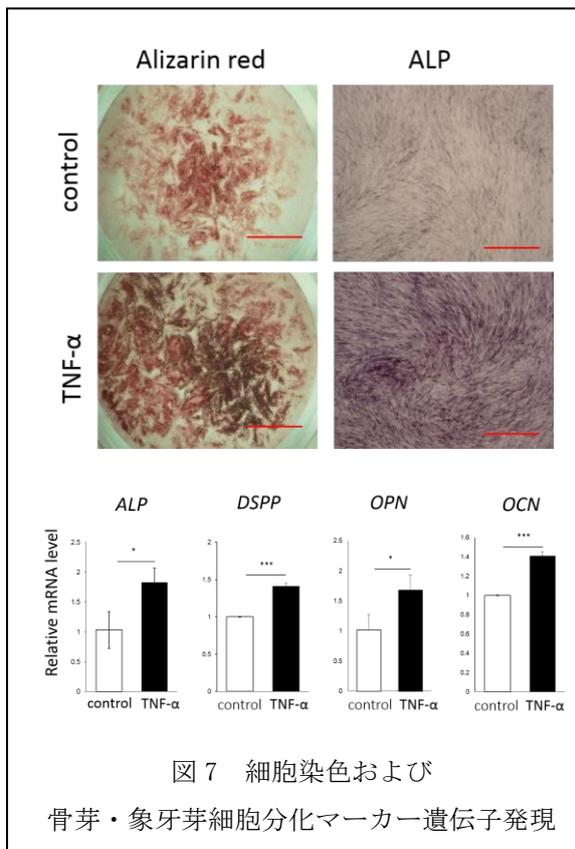


図 7 細胞染色および

骨芽・象牙芽細胞分化マーカー遺伝子発現

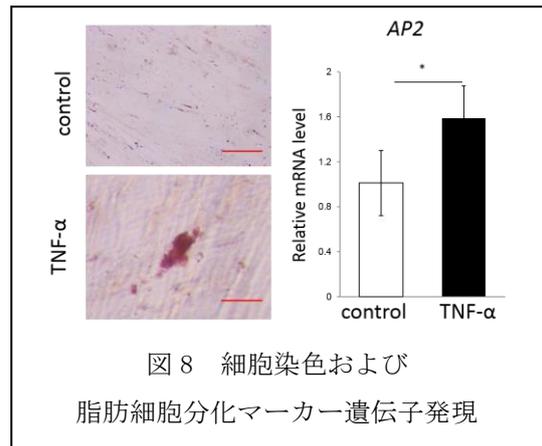


図 8 細胞染色および
脂肪細胞分化マーカー遺伝子発現

(4) 炎症性サイトカインの一つである IL-1 β や IL-6 には TNF- α が持ち合わせるリプログラミング作用は確認できなかった。

(5) TNF- α の主要なカスケードである NF- κ B のシグナルをブロックして表面抗原の発現を確認したところ、TNF- α による効果は完全には抑制されなかった (図 9A・B). このことから歯髄細胞の幹細胞化には NF- κ B 以外のカスケードが関与している可能性が示唆された。

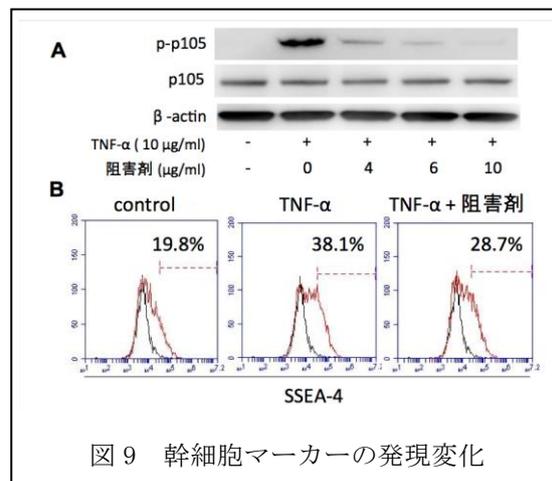


図 9 幹細胞マーカーの発現変化

以上より、TNF- α は培養歯髄細胞において、間葉系歯髄細胞の性質を保持した、より多分化能の高い細胞の比率を上昇させる可能性 (歯髄細胞の幹細胞化 (リプログラミング) 効果) があると考えられた。また、このリプログラミング効果は TNF- α 独自のものであり、

そして、NF- κ B以外のシグナル経路が重要であることが示唆された。今後は、どのような細胞でこのような反応が生じるのか、またどのようなシグナル経路が関与して幹細胞化が生じているのかなどの検討が必要である。

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 1 件)

① Ueda M, Fujisawa T, Ono M, Hara ES, Pham HT, Nakajima R, Sonoyama W, Kuboki T. A short-term treatment with tumor necrosis factor- α enhances stem cell phenotype of human dental pulp cells, Stem Cell Research & Therapy, 査読有, 5 巻 1 号, 2014, 31~40, DOI 10.1186/scrt420

[学会発表] (計 6 件)

1. Pham HT, Ueda M, Fujisawa T, Ono M, Hara ES, Sonoyama W, Pham LV, Kuboki T. A short-term treatment with TNF- α enhances the stem cell phenotype of human dental pulp cells. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research (IBMSC-JSBMR). 2013. 6. 1. Kobe, Japan.
2. Pham TH, Ono M, Hara ES, Ueda M, Sonoyama W, Lieu PV, Kuboki T. A comparative analysis of the effect of rhTNF- α treatment on the stem cell phenotype of cells derived from dental pulp, periodontal ligament and bone marrow. The Asean Plus and Tokushima Joint International Conference. 2012. 12. 7. Yogyakarta, Indonesia.
3. Pham TH, Ono M, Hara ES, Ueda M,

Sonoyama W, Lieu PV, Kuboki T. Effect of transient TNF- α treatment on the stem cell phenotype of human periodontal ligament cells and bone marrow stromal cells. 第 10 回日本再生歯科医学会学術大会・総会. 2012. 9. 2. Kobe, Japan.

4. Ueda M, Fujisawa T, Ono M, Masaki A, Miki H, Sonoyama W, Kuboki T. Human Dental Pulp Cells Increase Stem Cell-like Phenotype By TNF- α . 90th General Session & Exhibition of the IADR. 2012. 6. 21, Iguacu Falls, Brazil.
5. 上枝麻友, 藤澤拓生, 大野充昭, 正木明日香, 三木春奈, 園山 亘, 窪木拓男. 炎症環境による歯髄細胞の幹細胞化—歯髄細胞分化に与える TNF- α の影響—. 平成 24 年度社団法人日本補綴歯科学会第 121 回学術大会. 2012. 5. 26-27, 横浜.
6. 上枝麻友, 藤澤拓生, 大野充昭, 正木明日香, 三木春奈, 園山 亘, 窪木拓男. 歯髄細胞のリプログラミングに対する TNF- α の効果. 平成 23 年度社団法人日本補綴歯科学会中国・四国支部学術大会. 2011. 9. 4, 岡山.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上枝 麻友 (UEDA MAYU)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号 : 20625719