

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890024

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞による神経細胞分化誘導法の確立

研究課題名(英文) Establishment of method of dental pulp stem cell differentiation to Neural cell.

研究代表者

菅原 優 (Sugawara, Yu)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：00636954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：PDGF-AAはp38を介して歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を促進し、PDGF-BBは歯髄幹細胞のオリゴデンドロサイト分化を促進することが示唆された。また、PDGF-BBはPDGFR に依存し、その下流でERK1/2、Aktを介して歯髄幹細胞の増殖を促進することが明らかになった。さらに、PDGF-BBはSmad5のリン酸化を抑制することによりBMP2による歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を抑制することが示唆された。結果より、PDGF-BBが象牙芽細胞ではなくオリゴデンドロサイト分化に関与している可能性が考えられた。これらは歯髄幹細胞の細胞運命決定や歯由来細胞を用いた神経再生における重要な情報となる。

研究成果の概要(英文)：PDGF-AA promotes dental pulp stem cell differentiation into odontoblast, whereas PDGF-BB promotes proliferation and differentiation of dental pulp stem cell into oligodendrocyte via PDGFR $\beta$ -ERK1/2 and Akt pathway. Further, PDGF-BB inhibits BMP2 induced dental pulp stem cells differentiation into odontoblast inhibiting Smad5 phosphorylation. From these results, PDGF-BB may regulate oligodendrocyte differentiation from dental pulp stem cells, but not odontoblasts because of the differentiation marker expression after PDGF-BB stimulation. It is important information about the determination of cell fate of dental pulp stem cells and regeneration of neural using dental cells.

研究分野：矯正・小児系歯学

科研費の分科・細目：小児歯科学

キーワード：歯髄幹細胞 オリゴデンドロサイト PDGF 再生 歯

1. 研究開始当初の背景

再生医学の進展により、歯科領域においても歯の再生や歯髄幹細胞の再生医療への応用の可能性が示されてきた。歯髄幹細胞は頭部神経堤由来細胞であり、間葉細胞でありながら、神経系の分子を発現するという特徴的な細胞集団である。この神経堤細胞のマーカー分子として、従来より血小板由来成長因子 (PDGF) の受容体の1つである PDGF 受容体を用いられているがその役割については不明であった。そこで、我々は歯髄幹細胞が他の組織幹細胞よりも神経系の細胞に分化誘導しやすいことに着目した。

2. 研究の目的

歯髄幹細胞を用いた効率の良い神経細胞への分化誘導法の開発を目的とした。これまでに我々は歯の歯髄由来の歯髄幹細胞を血小板由来成長因子 (PDGF-BB) で刺激することにより、中枢神経損傷の治療に有効なオリゴデンドロサイトへ分化誘導させ得る可能性を示唆する知見を得た。そこで、その詳細な分化メカニズム (PDGF-BB 受容体の同定とその下流シグナル伝達経路) を解明し、効率よく神経細胞へと分化誘導させる方法の開発を行う。また、脊髄損傷モデルマウスを用い、誘導させた神経細胞を移植する実験を行うことにより、その有用性および歯髄幹細胞による神経再生能力を評価する。

3. 研究の方法

(1) 歯髄幹細胞の培養

マウス歯髄細胞株 (mDP) に2種類のヘキスト色素を取り込ませ、フローサイトメリーを用いた細胞ソーティング法にて得られた多分可能を有する歯髄幹細胞 (SP 細胞) を用いた。これを D-MEM/10%FBS で培養し、外因性の因子として、PDGF-AA (UPSTATE)、PDGF-BB (systems) を添加する場合にはそれぞれ、5 ng/ml、10 ng/ml で、BMP2 を添加する場合には 200ng/ml の最終濃度で用いた。

(2) PDGF による歯髄幹細胞の分化誘導の評価

RT-PCR 法を用いて SP 細胞における象牙芽細胞分化マーカーである DSPP とオリゴデンドロサイトの分化マーカーである Plp1 と olig2 の mRNA の発現を確認した。Total RNA は、TRIzol 試薬 (invitrogen) を用いて抽出した。

(3) PDGF による歯髄幹細胞の増殖能の評価  
細胞数の測定

6 well のプレートに  $1 \times 10^4$  個/well ずつ、それぞれ 3 well に細胞を播種し、PDGF-AA または PDGF-BB を添加後、0、1、2、3 日後の細胞数を測定した。細胞数は、1 well からランダムに 20 視野ずつ抽出し、細胞数を計測し、その合計を 1 well の細胞数とし、3 well より平均値を出し比較を行った。

WST-8 の代謝を用いた細胞増殖能の評価  
細胞増殖試験として Cell counting kit8 を用いた細胞増殖試験を行った。

BrdU の取り込み試験

細胞をスライドガラス上播種し、PDGF-AA もしくは PDGF-BB を添加し 24 時間培養し、その後 5-bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection kit (Roche) を用いて細胞増殖活性の測定を行った。

(4) 細胞内シグナル伝達経路の解析

ウェスタンブロッティング法

PDGF による SP 細胞の細胞内シグナル伝達経路の解析の為にウェスタンブロッティング法を用いた。PDGF の受容体として PDGF 受容体と PDGF 受容体が知られており、その下流では Ras-MAPK、PI3K、PLC- が関与していることが分かっている。そのため、今回は ERK1/2、p38、SAPK/JNK、Akt のリン酸化を確認した。また、PDGF-BB が BMP2 による象牙芽細胞分化誘導に与える影響を調べるために、smad5 のリン酸化を確認した。

細胞内シグナル伝達経路特異的阻害剤の使用

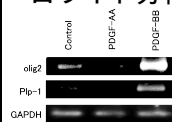
PDGF による分化誘導、増殖促進がどの経路を介しているのかを調べるために、SP 細胞を PDGF 受容体チロシンキナーゼ特異的阻害剤 (AG17) あるいは ERK1/2 経路阻害剤 (MEK 阻害剤、U0126)、p38 経路阻害剤 (SB203580)、Akt inhibitor で処理し RT-PCR 法、細胞増殖試験を行った。

siRNA の導入

PDGF による分化誘導、増殖促進に関与する受容体を特定するために、siRNA を用いて SP 細胞における内因性の PDGF 受容体と PDGF 受容体の発現を抑制し RT-PCR 法、細胞増殖試験を行った。

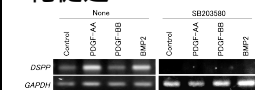
4. 研究成果

(1) PDGF-BB による SP 細胞のオリゴデンドロサイト分化促進



SP 細胞に PDGF-AA もしくは PDGF-BB を添加し 48 時間後の olig2 と Plp-1 の mRNA の発現を RT-PCR を用いて解析を行ったところ、PDGF-AA を添加した SP 細胞では、発現の上昇を認めなかったが、PDGF-BB を添加した SP 細胞では発現の上昇を認めた。

(2) PDGF-AA による SP 細胞の象牙芽細胞分化促進



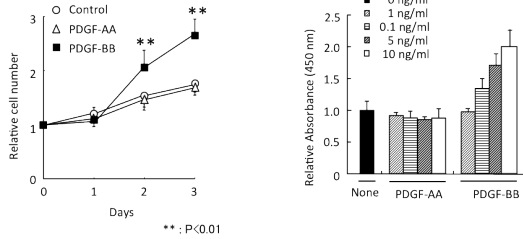
SP 細胞に PDGF-AA、PDGF-BB もしくは 200ng/ml BMP2 を添加

し 48 時間後の DSPP の mRNA の発現を RT-PCR を用いて解析を行ったところ、PDGF-BB を添加した SP 細胞では変化を認めなかったが、PDGF-AA を添加した SP 細胞では BMP2 を添加した SP 細胞と同様に発現の上昇を認めた。また、p38 経路阻害剤 (SB203580) を添加した場合には、PDGF-AA による DSPP の mRNA の発現促進を抑制した。

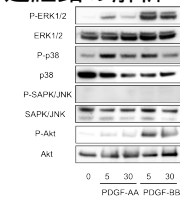
(3) PDGF-BB による SP 細胞の増殖促進

細胞数の測定においては、PDGF-BB を添加した SP 細胞でコントロール、PDGF-AA を添加

した SP 細胞と比較して有意に細胞数の増加が確認された。また、BrdU 取り込み試験では、PDGF-BB を添加した SP 細胞で、コントロール、PDGF-AA を添加した SP 細胞と比較して、約 1.5 倍の BrdU 陽性細胞が認められた。cell counting kit8 を用いた細胞増殖試験では、PDGF-BB を添加した SP 細胞で、コントロール、PDGF-AA を添加した SP 細胞と比較して、有意に細胞の増殖促進が認められた。

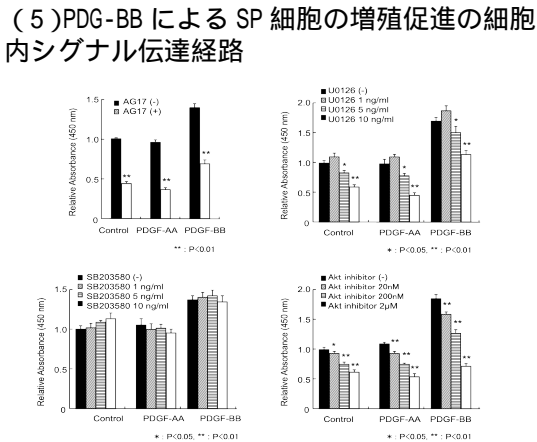


(4) PDGF による SP 細胞の細胞内シグナル伝達経路の解析

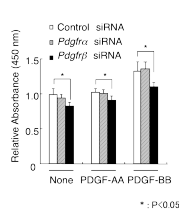


ウェスタンブロッティング法による解析より PDGF-AA を添加した SP 細胞では、p38 のリン酸化が強く誘導された。また PDGF-BB を添加した SP 細胞では、ERK1/2、p38、Akt のリン酸化が強く誘導された。

(5) PDGF-BB による SP 細胞の増殖促進の細胞内シグナル伝達経路



SP 細胞を AG17、U0126、SB203580 もしくは Akt inhibitor で処理し PDGF-AA もしくは PDGF-BB 添加後 48 時間後に cell counting kit8 を用いた細胞増殖試験を行った。AG17、U0126 (5ng/ml、10ng/ml)、Akt inhibitor は SP 細胞の増殖と PDGF-BB によって誘導される SP 細胞の増殖促進を抑制した。一方、SB203580 による SP 細胞の増殖抑制は認められなかった。

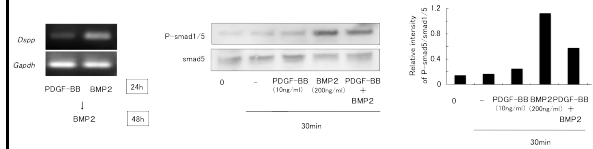


さらに、siRNA を用いて PDGF 受容体の発現を抑制した SP 細胞では、SP 細胞の増殖と PDGF-BB によって誘導される SP 細胞の増殖促進を抑制した。一方で、PDGF 受容体の発現を

抑制した SP 細胞では SP 細胞の増殖抑制は認められなかった。

(6) SP 細胞の象牙芽細胞分化誘導における

PDGF-BB と BMP2 の相互作用

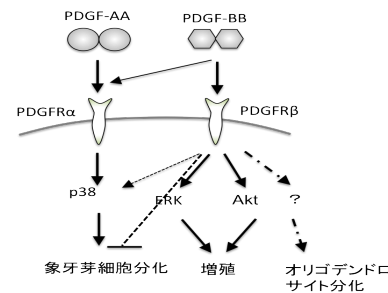


SP 細胞を PDGF-BB で 24 時間の前処理後、BMP2 を添加し培養した場合の DSPP の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討した。PDGF-BB で前処理した SP 細胞ではしていない SP 細胞と比較して DSPP の遺伝子発現が減少した。

また、PDGF-BB が SP 細胞における BMP2 のシグナル伝達に及ぼす影響について調べるために、smad5 のリン酸化をウェスタンブロッティング法にて確認した。PDGF-BB と BMP2 を同時に添加した SP 細胞では、BMP2 単独で添加した SP 細胞と比較して、smad5 のリン酸化が弱かった。

PDGF-AA は p38 を介して歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を促進し、PDGF-BB は歯髄幹細胞のオリゴデンドロサイト分化を促進することが示唆された。また、PDGF-BB は PDGF 受容体に依存し、その下流で ERK1/2、Akt を介して歯髄幹細胞の増殖を促進することが明らかになった。さらに、PDGF-BB は smad5 のリン酸化を抑制することにより BMP2 による歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を抑制することが示唆された。

これらの結果より、PDGF-AA、PDGF-BB を添加した場合の分化マーカーの発現の違いと合わせて、PDGF-BB が、象牙芽細胞ではなくオリゴデンドロサイト分化に関与している可能性が考えられた。これらは歯髄幹細胞の細胞運命決定や歯髄幹細胞を用いた神経再生における重要な情報となる。



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)

[学会発表](計1件)

Yu Sugawara, Dental pulp stem cell differentiation regulated by PDGFs、Pecking-Tohoku Dental Symposium、2013年7月27日、中国・北京大学

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菅原 優 (SUGAWARA, YU)

東北大学病院・医員

研究者番号：00636954