

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：31602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870663

研究課題名(和文) 歯由来幹細胞の口蓋裂部移植におけるMTAの役割

研究課題名(英文) The role of the MTA in the palate cleft graft by tooth-derived stem cells

研究代表者

前田 豊信 (Maeda, Toyonobu)

奥羽大学・歯学部・助教

研究者番号：10382756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：口蓋裂の移植片におけるMTAの効果を検証するために、MTAによる細胞分化を調査した。MTAは用量と時間依存的に、ALP活性を伴って石灰化形成を促進した。また、コラーゲン合成とMMPsの産生を増加させ、オステオカルシン(Ocn)の発現も誘導した。また、興味深いことに、MTAはAtf6のmRNA発現と活性化を誘導した。Atf6強制発現はOcn遺伝子発現を増加させたが、MTAによりOcnプロモータ領域と結合しているAtf6は増加した。Doxで誘導されるAtf6 shRNAは、MTAによる石灰化促進を抑制した。これらから、MTAはAtf6を介して、骨分化を誘導すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To understand effect of MTA in the palate cleft graft, we determined whether MTA induces osteoblastic differentiation.

MTA enhanced mineralization concomitantly with alkaline phosphatase activity in a dose and time dependent fashions. MTA increased production of collagens and MMPs. MTA also induced osteocalcin mRNA. Interestingly, we observed induction of Atf6 mRNA expression and activation of Atf6 by the MTA treatment. Forced expression of p50 Atf6 markedly enhanced Ocn mRNA expression. Chromatin immunoprecipitation assay investigated increase in p50Atf6 binding to Ocn promoter region by MTA treatment. Furthermore, knockdown of Atf6 gene expression abrogated MTA induced mineralization. These results suggest that MTA induces in vitro osteoblastic differentiation through the Atf6 - osteocalcin axis as the ER stress signaling.

研究分野：口腔生化学

キーワード：MTA 骨形成 小胞体ストレス オステオカルシン コラーゲン MMP

1. 研究開始当初の背景

MTA セメントはポルトランドセメントを主材とする、強塩基性の無機質から構成されている。MTA セメントは、世界中で歯科臨床で覆罩剤や根管粘薬剤として用いられ、非常に良好な成績をおさめている。この MTA の作用として象牙質・セメント芽細胞の分化誘導と再生があることが分かっている。しかしながら、MTA セメントの詳細な作用機序は、依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、MTA セメントを口蓋裂に応用することで、移植片の増殖・分化を誘導することを目的として、主に以下の二点について検証を行った。(1) MTA セメントの骨への分化誘導能を検証した。(2) MTA セメントの安全を担保する目的で、分化促進作用機序を解明にあたった。

3. 研究の方法

まず、硬化後の MTA セメントの細胞増殖の足場としての機能、並びに分化誘導能を調べるために、以下の実験を行った。MTA セメントとして Pro Root MTA(DENTSPLY)を板状に硬化させ、十分に浸漬させた後、細胞培養を開始した。

次に硬化 MTA セメントから、微量に溶出する MTA の効果を検証する目的で、MTA セメントを培地中で十分時間サスペンドし、遠心分離により上清のみを分取した。この上清を 1.0 または 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で骨芽細胞の培養液に添加した。石灰化の指標として alizarin 赤染色を行った。培養期間中に分化の指標として、ALP 活性、基質に蓄積されたコラーゲン量をウエスタンブロットで、培地中に分泌されたマトリックス金属プロテアーゼ活性はゼラチンザイモグラフィ、カゼインザイモグラフィで、測定した。オステオカルシンは、qRT-PCR を用い遺伝子発現を定量し培地中に分泌されたオステオカルシン量は ELISA にて測定を行った。また、分化促進に関与する遺伝子である BMP-2, BMP-4, Runx2, オステリックス等の遺伝子発現を qRT-PCR で検証を行った。

小胞体ストレスセンサー物質に関して、ATF4、ATF6、および ATF6 類縁体である OASIS について、qRT-PCR とウエスタンブロットを行った。また、ATF6 の発現とオステオカルシン遺伝子発現の関連を検証する目的で、クロマチン免疫沈降 (ChIP Assay) を行い、活性型 ATF6 である p50 を強制発現させた。また、ATF6 が MTA による石灰化に関与するかを目的で、Tet-on ATF6 shRNA を安定発現する骨芽細胞株を樹立し、MTA による石灰化を検証した。

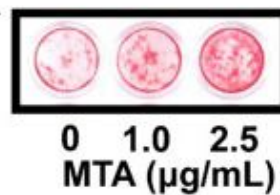
4. 研究成果

硬化 MTA セメントがスキャフォールドとして機能するかを検証する目的で、板状に硬

化させた MTA セメントを用い、骨芽細胞培養を行った。その結果、MTA セメントは細胞毒性を示し、板状 MTA セメントから数 mm の細胞は死滅した。しかし、その周囲の細胞は非常に分化が促進されていた。この結果から、MTA セメントは、十分に浸漬しても、微量に溶出が起こりこの成分の一部が骨芽細胞分化を強く促進しているのではないかと、いう仮説を立てた。

そこで、この仮説を検証する目的で、培地中に MTA セメントを十分浸漬させ、遠心分離により沈殿を除き、元の MTA セメント換算で 1.0 または 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で骨芽細胞の培養に添加した。この濃度での MTA セメントは、培地 pH に変化を及ぼさなかった。また、これによって増加するカルシウム濃度は数 μM であった。しかしながら、MTA セ

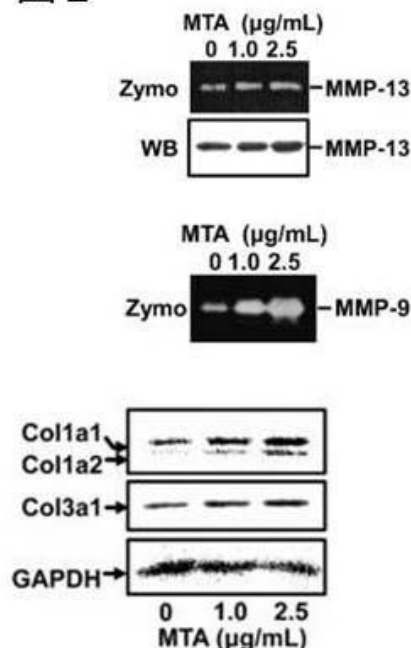
図 1



メントの添加で、骨芽細胞の石灰化は有意に促進された(図 1)。この

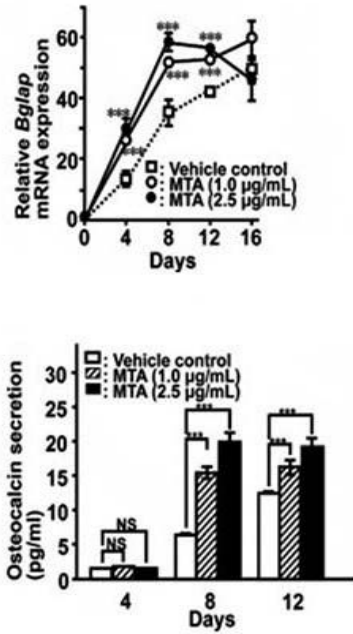
MTA セメントの添加による石灰化促進作用は、アルカリホスファターゼ活性の上昇を伴うものであった。また、骨基質の主成分であるコラーゲンの分解に関与する、コラゲナーゼ (MMP-13) とゼラチナーゼ (MMP-9) の活性も上昇させた。それにも関わらず、MTA セメントによって、骨基質中に蓄積されたコラーゲン量は増加した(図 2)。

図 2



この石灰化促進について、機序解明を試み

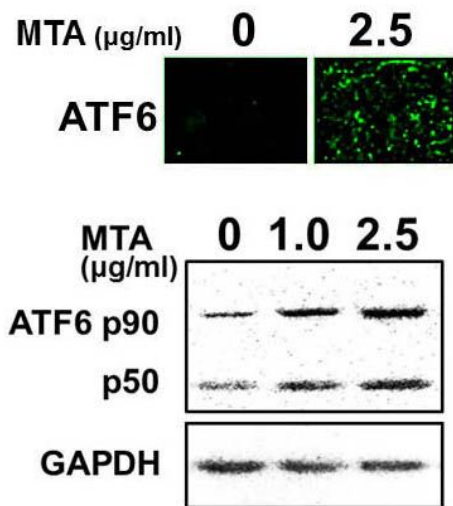
図 3



たところ BMPs の発現促進は qRT-PCR, ELISA 共に認められなかったが、オステオカルシンの発現促進が qRT-PCR ならびに、培地中に分泌されたタンパク質量の変化として観察された (図 3)。

興味深いことに、MTA セメントの添加は、小胞体ストレスセンサーである ATF6 の細胞内での発現を有意に促進した。この発現上昇に伴って、S1P、S2P によって切断された 50kDa の ATF6 (活性型) も増加することが分かった。しかし、この増加は p50 のみを増やすものではなく、完全長である p90 の量の増加に伴い、p50 が増加していた (図 4)。

図 4

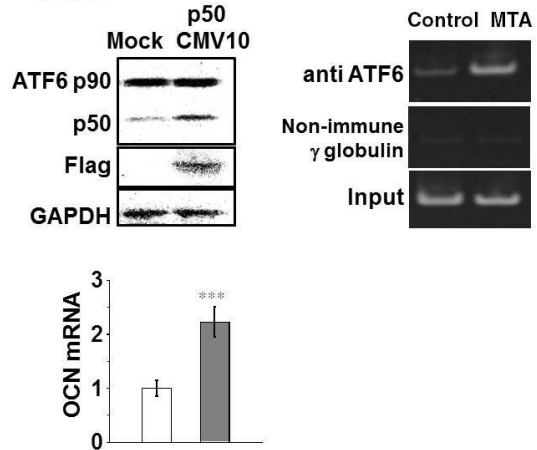


そこで、この ATF6 の発現上昇がオステオカルシンの発現上昇に関与しているのでは

ないかという仮説を検証する目的で、以下を行った。

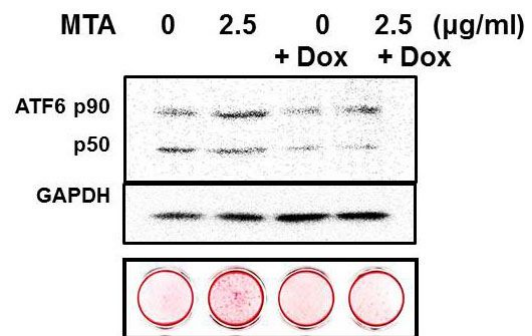
骨芽細胞に一過性に p50 ATF6 を強制発現させると、オステオカルシン遺伝子の発現が上昇した。次に、ATF6 が直接オステオカルシンプロモーターに結合するかをクロマチン免疫沈降により検証した。その結果、MTA セメント添加によって、オステオカルシンプロモーター領域に結合する ATF6 (p50) は増加した (図 5)。

図 5



最後に、Tet on ATF6 shRNA の安定発現骨芽細胞株を樹立した。すなわち、この細胞株ではドキシサイクリンの存在下では、ATF6 の遺伝子発現がロックダウンされる。この細胞での MTA セメントの石灰化促進作用を検証したところ、ドキシサイクリンの添加で、MTA セメントによる石灰化の促進は完全に解除された (図 6)。

図 6



これらのことから、次のことが考察された。(1) MTA セメントは、硬化後の微少な漏出が、骨芽細胞に有意な分化促進・石灰化促進作用をもたらす。

(2) この石灰化促進作用は、アルカリホスファターゼ活性の上昇、コラーゲンの蓄積増加、オステオカルシン遺伝子の発現促進を伴うものであった。

(3) オステオカルシンの遺伝子発現促進機能には、小胞体ストレスセンサーである ATF6 の発現促進が関与する。この小胞体ス

トレスの増加は、巨大分子であるコラーゲンの合成促進が何らかの影響を及ぼしている」と推察できる。

以上のことから、MTA セメントは骨芽細胞でも分化・石灰化誘導能が検証できた。MTA セメントに関する安全性は、小胞体ストレス経路の1つであるATF6を強く誘導することで、分化を促進していた。従ってMATセメントは、顎裂部への移植片応用に際しても完全な材質であると考えられる。

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5件)

1: Maeda T, Suzuki A, Baba Y, Yuzawa S, Kimura Y, Kato Y. Mineral trioxide aggregate induces osteoblastogenesis via Atf6. *Bone Rep* 2; 36-43. 2015 doi:10.1016/j.bonr.2015.03.003

2: Baba Y, Fujii M, Maeda T, Suzuki A, Kato Y. Deguelin Induced Apoptosis by Targeting both EGFR-Akt and IGF1R-Akt Pathways in Head and Neck Squamous Cell Cancer Cell Lines. *Biomed Res Int*. 657179. 2015 doi 10.1155/2015/657179

3: Suzuki A, Maeda T, Baba Y, Shimamura K, Kato Y. Acidic extracellular pH promotes epithelial mesenchymal transition in Lewis lung carcinoma model. *Cancer Cell Int*. 14:129. 2014 doi: 10.1186/s12935-014-0129-1.

4: Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, Baba Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell Int*. 13:89. 2013 doi: 10.1186/1475-2867-13-89.

5. 前田 豊信, 鈴木 厚子, 湯澤 仁, 馬場 優, 加藤 靖正. CRISPR / Cas9 を用いた MC3T3-E1 細胞における Gpr81 遺伝子のノックアウト 奥羽歯学誌 41:123-128. 2015 <https://ohu-lib.repo.nii.ac.jp/>

[学会発表](計6件)

1: 前田豊信, 鈴木厚子, 湯澤仁, 馬場優, 木村裕一, 加藤靖正 Mineral Trioxide Aggregate セメントの骨形成作用 第 57 回奥羽大学歯学会 2014年6月21日 郡山

2: 前田豊信, 鈴木厚子, 湯澤仁, 阿部匡聡, 加藤靖正 MC3T3-E1 細胞において、MTA は ATF6 を介して石灰化を促進させ

る. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 2014年9月26日 福岡

3: 前田豊信, 鈴木厚子, 湯澤仁, 阿部匡聡, 加藤靖正 MTA は骨芽細胞様細胞で ATF6 を介して石灰化を促進させる. 第 87 回日本生化学会大会 2014年10月17日 京都

4: 前田豊信, 原元信貴, 有馬英夫, 木村裕一 MTA による ATF6 を介した骨芽細胞の石灰化促進作用 日本歯科保存学会 2014年度秋季学術大会(141回) 2014年10月31日 山形

5: 前田豊信, 鈴木厚子, 湯澤仁, 阿部匡聡, 加藤靖正 小胞体ストレスセンサーATF6 を介した石灰化の一例 第 36 回東北骨代謝研究会 2015年2月7日 仙台

6: 前田豊信, 鈴木厚子, 湯澤仁, 加藤靖正 Mineral Trioxide Aggregate による MC3T3-E1 細胞における分化促進は Atf6 を介して起こる。 第 47 回日本結合組織学会学術大会 2015年5月16日 東京

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.ohu-u.ac.jp/faculty/dental/course/ksk.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 豊信 (Maeda, Toyonobu)

奥羽大学 歯学部 助教

研究者番号: 10382756

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

加藤 靖正 (KATO, Yasumasa)

研究者番号: 50214408

木村 祐一 (KIMURA, Yuichi)

研究者番号: 60211877