

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462985

研究課題名(和文) 歯髄・骨髄・脂肪幹細胞培養上清の再生能比較による細胞遊走因子の同定

研究課題名(英文) CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and angiogenesis leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells.

研究代表者

石坂 亮 (Ishizaka, Ryo)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：00705197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯髄再生に關するTrophic factorを明らかにすることを目的に、歯髄・骨髄・脂肪幹細胞培養上清を移植した。その結果、歯髄再生は遊走してきた周囲細胞が血管新生能、抗アポトーシス能を受けて生じている可能性が示唆された。さらに、それらに關する因子として、CXCL14、MCP1のタンパク高発現を認めた。CXCL14は遊走促進能を、MCP1は血管新生促進能を有しており、移植細胞が分泌していた。また、遊走細胞はCXCL14、MCP1のレセプターであるCXCR4およびCCR2を発現していた。以上より、歯髄再生メカニズムにはCXCL14、MCP1が關与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Transplantation of the CM of pulp stem cells yielded a larger volume of pulp regeneration, demonstrating increased migration of endogenous cells from the surrounding tissue, and decreased apoptosis in the regenerated pulp compared with the transplants of the CM from bone marrow and adipose stem cells. Upregulated genes, including CXCL14 and MCP1, in pulp stem cells were compared with those in bone marrow and adipose stem cells and were identified as candidate trophic factors. The stimulatory effects on migration and angiogenesis of CXCL14 and MCP1 were demonstrated in vitro. In the regenerated tissue, the migrated cells from the surrounding tissue expressed the receptors, CXCR4 and CCR2. MCP1 was expressed in proximity to both arterioles and venules. These results demonstrate that potent factors, including CXCL14 and MCP1, may be associated with the higher functional regenerative potential of pulp stem cells with greater trophic effects based on migration and angiogenesis.

研究分野：再生歯学

キーワード：歯髄幹細胞 歯髄幹細胞培養上清 歯髄再生

1. 研究開始当初の背景

MSCs のリプログラミングと分化の決定は、細胞の物理的接触と分泌因子からなる微小環境によって左右されるため、移植した MSCs は微小環境に依存した組織を再生するといわれている¹⁾。また異なる組織由来の MSCs の再生能はいくつかの疾患モデルにおいて比較されている。申請者らもこれまで、同一個体由来の歯髄・骨髄・脂肪幹細胞を、異所性歯根移植モデル、下肢虚血モデルおよび脳梗塞モデルに移植し、その再生能を比較した。その結果、移植細胞により再生量に差が生じたが、再生組織は質的には変わらず、移植細胞の由来ではなく、移植した微小環境に依存した組織が再生されることが判明した²⁾。

移植した MSCs は直接血管や神経、部位特異的な細胞に分化するわけではなく、Trophic factor を分泌し、再生に関与するといわれている³⁾。申請者らもこれまで *in vivo* において同様の結果を得ており、周囲からの遊走細胞が組織を再生させると考えられる。また、Trophic factor は細胞培養上清中に蓄積されており、様々な効果を有することが知られている⁴⁾。したがって、移植細胞の由来組織の違いによる再生能の差は、Trophic 効果(増殖・遊走・抗アポトーシス・抗炎症・血管新生・神経分化促進作用)に起因することが示唆される。

近年の研究において、細胞培養上清を用いた創傷治癒や腎損傷の治癒などが報告されている。しかし、その *in vivo* でのメカニズムは明らかにされておらず、歯髄・骨髄・脂肪幹細胞培養上清を用い、三者の Trophic 効果を比較した報告はない。また、細胞を用いず、培養上清のみで歯髄が再生したという報告もない。したがって、本研究では、一定の微小環境を安定して作ることでできるマウス異所性歯根移植モデルに歯髄・骨髄・脂肪幹細胞培養上清を移植し、幹細胞移植の場合と

比較して、上清移植のみで歯髄が再生するかどうかを検討し、周囲からの遊走細胞が微小環境に依存した組織を再生することを証明する。またその再生能を歯髄・骨髄・脂肪幹細胞培養上清移植間で比較する。さらに、三者の幹細胞培養上清移植による *in vivo* における周囲組織細胞に対する増殖促進と遊走促進、抗アポトーシス作用、血管新生能、象牙芽細胞分化促進能および *in vitro* での Trophic 効果を比較する。これにより、由来組織による再生能の差を生じさせるメカニズムを明らかにするという着想にいたった。さらに、高い幹細胞遊走促進作用を有する因子を同定する着想にいたった。

1) TAli R, et al. *Adv Biochem Engin.* 2012;126:227-262. 2) Ishizaka R, et al. *Biomaterials.* 2012;33:2109-2118.

3) Schantz JT, et al. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012;132-142. 4) Inukai T, et al. *BBRC* 2013;430:763-768.

2. 研究の目的

本研究では、安定して一定の微小環境を供給できる異所性歯根移植モデルを用い、Trophic factor を含有する歯髄・骨髄・脂肪幹細胞培養上清の再生能を比較し、由来する幹細胞により再生量に違いが生じるメカニズムの解明を行い、再生を誘導促進する蛋白質を分離・同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ブタ歯髄・骨髄・脂肪幹細胞分取と上清調整

ブタ歯髄・骨髄・脂肪 CD31-SP 細胞は同一個体の下顎骨より分取し、50%コンフルエントの状態にて無血清培地変え、24 時間後、培養上清(CM)として回収した。

(2) マウス異所性歯根移植モデルにおける再生組織解析

ブタの下顎側切歯より作成した移植片に最終濃度 5 µg/ml 歯髄・骨髄・脂肪CMまたは

1 × 10⁶個の歯髄CD31⁺SP細胞をコラーゲンTEと混合して注入し、5週齢SCIDマウスに皮下移植した。

移植片は固定、脱灰の後、5 μmのパラフィン切片とした。

それぞれの再生組織をHE染色後、形態学的に解析した。再生歯髄における細胞密度は、核染色によって解析した。血管新生能は、RECA1を用いた免疫染色によって解析した。

再生組織が歯髄であると証明するために、歯髄マーカーであるTRH-DEを*in situ* hybridizationにて確認した。次いで、Western blotを行い、そのタンパク発現を確認した。さらに、再生組織における歯髄マーカーTRH-DEおよびSyndecan 3をreal-time RT-PCRで解析した。

再生歯髄組織の象牙芽細胞への分化は、*enamelysin*に対するプローブを用いて*in situ* hybridizationによって解析した。

基質形成は、aggrecanを用いた免疫染色によって解析した。

増殖促進能は、PCNAを用いた免疫染色によって解析した。

周囲組織由来細胞に対する遊走促進能は、BrdUを移植歯周囲に注入し、抗BrdUを用いた免疫染色によって解析した。

抗アポトーシス能は、Caspase 3を用いた免疫染色によって解析した。

(3) 歯髄 CD31⁺SP 細胞中の高発現遺伝子解析

マイクロアレイ解析において、歯髄再生能に関与するTrophic factorを同定した。また同定された9因子であるCXCL14、G-CSF、BDNF、NPY、IL 1、IL 6、IL 8、IL 16、およびMCP 1に対し、real time RT-PCRを行った。

(4) Trophic factor およびそのレセプターの発現解析

歯髄・骨髄・脂肪 CD31⁺SP 細胞において、MCP 1、CXCL14、のタンパク発現をwestern blotにて解析した。

CXCL14の組織内発現と周囲組織より遊走してきた細胞との関係性は、CXCL14およびBrdUにて免疫二重染色によって解析した。MCP 1の再生組織内の発現と新生血管との局在性は、MCP 1およびRECA 1での免疫二重染色によって解析した。CXCL14およびMCP 1のレセプターであるCXCR 4、CCR 2のmRNA発現をreal-time RT-PCRによって解析した。

(5) 遊走細胞に対する免疫組織学的、分子生物学的解析

周囲組織からの遊走細胞におけるCCR 2あるいはCXCR 4の発現を確認するために、BrdUで免疫染色を行い、さらにそれぞれのプローブによる*in situ* hybridizationを行った。

(6) MCP1、CXCL14、IL6のTrophic効果解析

遊走促進能を解析するために、HUVEC、C2C12に対しCXCL14あるいはMCP 1を添加し、TAXIScan-FLを用いた。血管内皮細胞分化促進能を解析するために、CXCL14およびMCP 1を添加したHUVECを14日間培養した後、VE-cadherinを用いた免疫染色を行った。

4. 研究成果

いずれの上清を移植した場合でも形態学的に同様の特徴を示し(図1)、幹細胞を移植した場合と同様に歯髄マーカーTRH-DEの発現を認める歯髄組織が再生した(図2)。

移植歯の周囲組織においてBrdUで標識された細胞は全ての移植後再生組織で認められ、宿主の細胞が遊走していることが明らかとなった。これらの結果は、いずれの組織由来の上清を移植した場合であっても、遊走してきた宿主の細胞が移植歯内部の微小環境

に反応して歯髄組織は再生していることを強く示唆している。しかし歯髄上清を移植した場合、他の上清を移植した場合と比べ、再生量、細胞密度、血管新生密度の高い組織を再生する。つまり、歯髄・骨髄・脂肪上清の再生能の差は、含まれている Trophic factor の持つ遊走促進能、抗アポトーシス能および血管新生促進能によって生じていることが示唆された。

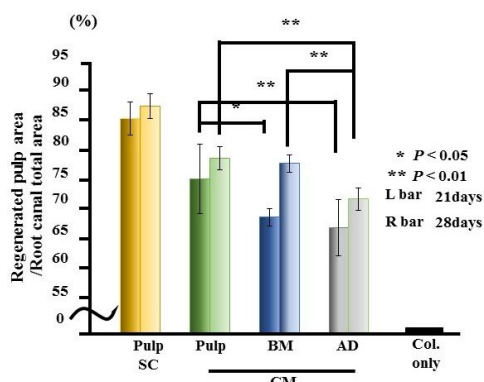
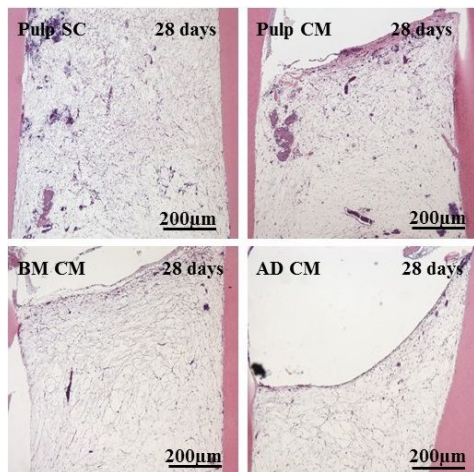


図1 歯髄幹細胞および歯髄・骨髄・脂肪幹細胞培養上清による歯髄再生

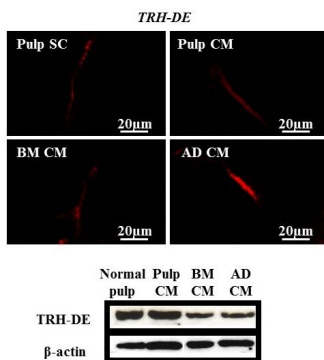


図2 再生歯髄が歯髄であることの証明

マイクロアレイにおいて、間葉系幹細胞の再生能に関与する候補因子を絞り込んだところ、骨髄・脂肪と比べ歯髄で高く発現している因子は9種類挙げられ、加えて、western blotにて解析したところ、タンパク高発現まで認められるのはCXCL14、MCP1であった(図3)。

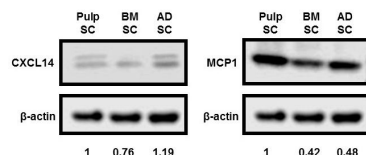


図3 Trophic factor の western blot 解析

CXCL14とCXCL12 (SDF1)はCXCケモカインの一つとして知られ、多様な種にわたってそのアミノ酸配列がよく保存されており、ともに恒常性維持に役割を持っているケモカインであると考えられている。CXCL14は様々な種類の間葉系幹細胞の遊走に重要な役割を果たしているCXCL12のレセプターであるCXCR4に対し高親和性を示し、CXCL12と互いに作用しあっていると報告されている。従来、CD31⁺SP細胞はCXCL12をほぼ分泌していないことがすでに報告されているが、本研究では、歯髄CD31⁺SP細胞はCXCL14を高発現していることを明らかにした。

そこで、C2C12に対しCXCL14を添加すると遊走を促進し、上清をCXCL14抗体により中和し添加すると、遊走は有意に抑制されることが明らかとなった。また、CXCL14は移植細胞が発現しており、BrdU陽性の遊走細胞はCXCR4を発現しているという結果(図4)さらに、in vitroにおける各上清のC2C12への添加実験とin vivoにおけるPCNAの免疫染色により増殖促進能に差を生じないという結果から、移植細胞により再生組織中に分泌されたCXCL14が、周囲のCXCR4陽性細胞を遊走させるTrophic効果を有することが示唆され、その作用が細胞密度と再生量に影響を与えていることが考えられた。

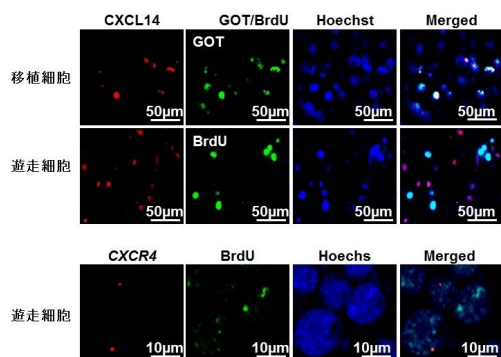


図4 CXCL14およびCXCR4の組織内局在と移植細胞、遊走細胞との関係

MCP 1はC-Cケモカインの一つであり、2次的な血管新生因子発現の調節によって、血管新生能に影響する因子であると報告されており、血管新生療法薬として期待されている。本研究では、歯髄CD31⁺SP細胞はMCP 1を高発現していることを明らかにした。HUVECに対しMCP 1を添加すると、遊走および血管分化が促進され、さらに、上清の遊走促進能および血管誘導促進能は、MCP 1抗体による中和によって阻害されることを示した。また、MCP 1は移植細胞が発現しており、再生組織中では歯髄動脈あるいは静脈と近い径の血管周囲に多く見られ、BrdU陽性の遊走細胞は発現しておらず、レセプターであるCCR 2を発現していた(図5)。これらの結果は、MCP 1がCCR 2を通じた、血管内皮細胞の遊走と血管の成熟により血管新生に関与するTrophic効果を有することを示唆している。

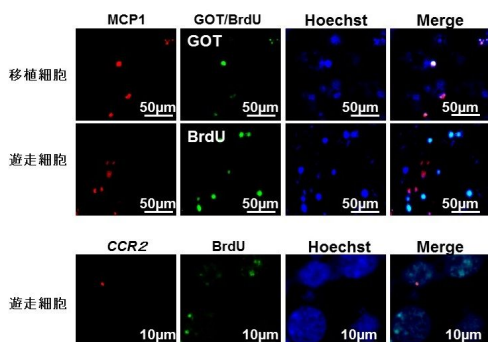


図5 MCP1およびCCR2の組織内局在と移植細胞、遊走細胞との関係

以上より、再生メカニズムには遊走促進能、血管新生促進能および抗アポトーシス能が関与しており、それぞれに関わるTrophic factorの候補にはCXCL14、MCP 1が挙げられた。

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 1 件)

Hayashi Y, Murakami M, Kawamura R, Ishizaka R, Fukuta O, Nakashima M. CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and angiogenesis leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells. *Stem Cell Res Ther.* 2015 May 29;6:111. DOI: 10.1186/s13287-015-0088-z. 査読有。

〔学会発表〕(計 2 件)

Hayashi Y, Kawamura R, Ishizaka R, Nakashima M, Fukuta O. Isolation of inductive microenvironment activity for pulp/dentin regeneration by the sequential extraction of extracellular matrix components from porcine teeth. アジア小児歯科学会、2016年5月26日、東京都文京区、東京ドームホテル

林勇輝、石坂亮、福田理、中島美砂子：歯髄・骨髄・脂肪由来幹細胞培養上清の歯髄・象牙質再生能の比較。日本小児歯科学会、2015年5月21日、広島県広島市、広島国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

石坂 亮 (Ryo Ishizaka)

愛知学院大学歯学部・小児歯科学講座・講師

研究者番号：00705197

(2)研究分担者

中島 美砂子 (Misako Nakashima)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・幹細胞再生医療研究部・部長

研究者番号：20207773

(3)研究分担者

林 勇輝 (Yuki Hayashi)

愛知学院大学歯学部・小児歯科学講座・助教

研究者番号：10756547