

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861640

研究課題名(和文) TNF- のリプログラミング効果を応用した新規覆髄剤の開発

研究課題名(英文) Development of new dental pulp capping material applied effect of reprogramming of dental pulp cells by TNF-alpha

研究代表者

上枝 麻友 (UEDA, Mayu)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：20625719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が発見した歯髄細胞に対するTNF- のリプログラミング効果(幹細胞化)のメカニズム解明と、これに関与している因子を同定することを目的に実験を行った。

実験に同意の得られた患者から提供を受けた抜去歯牙の歯髄から、Gronthosらの方法に準じて歯髄細胞の分離・培養を行い、これまでと同様に培養できること、TNF- (10ng/ml)による刺激を加えても培養などに問題がないことを確認した。その後TNF- により刺激した歯髄細胞と、無処理の歯髄細胞からタンパクを回収し抗体アレイを用いて、解析を行ったところ、TNF- 刺激により、p38MAPK、TRAF1などの発現が亢進していた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate of the mechanism of dentin reprogramming of human dental pulp cells mediated by TNF- , and identify the factor participating in the reprogramming.

Human DPCs were isolated from patients who agreed with our study in accordance with a previously reported method. We collected protein from dental pulp cells which were untreated and stimulated by TNF- .Thereafter we analyzed the protein used an antibody array, expression of p38MAPK, TRAF1 was increased.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯髄細胞 TNF- 幹細胞化

## 1 . 研究開始当初の背景

象牙質・歯髄複合体は自己修復能を有しており、齲蝕、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修復が起きることが知られている。すなわち、象牙質に及ぶような歯の損傷は象牙芽細胞の損傷と炎症反応を惹起する。炎症が惹起されると、好中球や単球から炎症性サイトカインやケモカインが放出され、それに引き続き血管新生が誘導され、さらに既存の象牙芽細胞が再活性化されて象牙質の再生が生じる、あるいは、歯髄内に存在する前駆細胞や歯髄幹細胞が新たに象牙芽細胞に分化し象牙質の再生が生じると推測されている。しかしながら、これらの現象の生理的メカニズムは完全には解明されていない。

一方、炎症性サイトカインの一つである TNF- は損傷治癒過程において初期の段階で局所発現し、様々な成長因子やサイトカインの発現を誘導したり、細胞の遊走を促進して組織再生に関与している。骨折部位に TNF-

を作用させると治癒が促進するという報告(Glass et al., PNAS 2011)がある。すなわち、創傷治癒過程の初期段階においては TNF- のシグナルが重要な役割を果たしていると推測される。実際、申請者は、マウス露髄モデルにおいて、前駆細胞や歯髄幹細胞が露髄刺激により誘導されることを間葉系幹細胞のマーカーである CD146 の免疫染色にて確認しており、歯髄の炎症と幹細胞誘導の間には密接な関連が推測される。

申請者はこれまでの研究により、ヒト歯髄組織から得られた歯髄細胞に TNF- を作用させることで、より多分化能の高い細胞の比率を上昇させることを示した。ヒト抜去歯由来歯髄細胞を TNF- で処理すると、生細胞数は変化しないものの、間葉系幹細胞の表面抗原マーカーである SSEA4, CD146 陽性率が増加し、oct4 や 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、コロニー形成能が亢進され、テロメラーゼ活性が上昇することを確認した。さらに、TNF- 前処理により歯髄細胞は脂肪細胞や軟骨細胞、骨芽細胞への分化が促進された。

これらの結果から、培養ヒト歯髄細胞において TNF- は、培養歯髄細胞において、間葉系幹細胞の性質を保持した、より多分化能がある細胞の比率を上昇させるリプログラミング効果を有すると考えられる。

炎症性サイトカインの一種である IL-1 を添加した歯髄細胞の SSEA4 発現を免疫染色にて検討したところ、陽性細胞数の増加は認められなかったことから、リプログラミング効果は TNF- 特異的な現象であると推測される。

また、本リプログラミング作用のメカニズムを明らかにするため、TNF- の主要なカスケードである NF- B のシグナルをブロックして同様の実験を行ったところ、TNF- によるリプログラミング効果は完全には抑制されなかった。このことから歯髄細胞の幹細胞化には NF- B 以外のカスケードが関与している可能性が示唆される。

## 2 . 研究の目的

申請者が発見した、TNF- による歯髄細胞の幹細胞化メカニズムをより詳細に解明し、歯髄細胞のリプログラミングに関与する因子を同定することにより、これを応用した新規覆髄剤を開発する。

## 3 . 研究の方法

歯髄細胞において、TNF- 刺激により誘導されるシグナル経路を抗体アレイ法を用いて解析を行った。

歯髄細胞を培養して、TNF- $\alpha$ （10ng/ml）で刺激した歯髄細胞と無処理の歯髄細胞からそれぞれタンパク質を回収し、抗体アレイ実験を行った。TNF- $\alpha$ のシグナル経路に関与する因子を45種類選択、配置したメンブレンを作製した。サンプル溶液中にメンブレンを浸してインキュベートすると、メンブレンに配置された各抗体と相互作用のあるタンパク質が複合体を形成することにより捕捉される。メンブレンを洗浄後、酵素標識抗体ミックスとインキュベートし、洗浄後、酵素反応（化学発光）させることでタンパク質の検出を行った。ルミノイメージアナライザーを用いて検出・画像解析を行った。

#### 4. 研究成果

実験に同意の得られた患者から提供を受けた抜去歯牙の歯髄から、Gronthosらの方法に準じて歯髄細胞の分離・培養を行い、これまでと同様に培養できること、TNF- $\alpha$ （10ng/ml）による刺激を加えても培養などに問題がないことを確認した。

歯髄細胞を培養して、TNF- $\alpha$ （10ng/ml）で刺激した歯髄細胞と無処理の歯髄細胞からそれぞれタンパク質を回収し、抗体アレイ実験を行った。

抗体アレイ実験に先駆けて、TNF- $\alpha$ のシグナル経路に関与する因子を45種類選択・配置したメンブレンを作製した。

<抗体アレイに用いた抗体>

Apaf1, BID, Caspase1, Caspase2, Caspase3, Caspase4, Caspase5, Caspase6, Caspase7, Caspase8, Caspase9, Caspase10, cytochromeC, ERK1, ERK2, FADD, c-Fos, JNK1,2,3, p-JNK1,2,3, c-Jun, MEK1, MEK11, MEK2, NF- $\kappa$ B 50, NF- $\kappa$ B 52, NF- $\kappa$ B p65,

I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\gamma$ , I $\kappa$ B- $\delta$ , I $\kappa$ B kinase, I $\kappa$ B kinase, NIK, Notch, p38MAPK, RAIDO, Ras, RIP, SODD, TNFR1, TNFR2, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3

抗体アレイ実験は複数回を行い、実験に適したタンパク濃度の確認を行った。

TNF- $\alpha$ により刺激した歯髄細胞から得られたタンパク質から、p38MAPK, TRAF1, Caspase3, SODD, RIP, TNFR1, JNK1,2,3, I $\kappa$ B- $\alpha$ が検出された。しかしながら、無処理の歯髄細胞から得られたタンパク質と比較した場合、TNF- $\alpha$ 刺激による各因子の発現の増減に関しては結果が不安定であり確定は得られなかった。

今回の抗体アレイ実験で発現が確認されたTNF- $\alpha$ のシグナル経路に関与する各因子については、Western Blotting法を用いて再度定量的に検証・比較が必要であると考えられる。

また、それぞれの因子に関して、阻害剤あるいは促進剤を応用して、歯髄細胞のリプログラミングに重要なシグナル経路の同定を行い、メカニズムの解明につなげたい。

#### 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. 上枝麻友 .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腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )の影響 ,journal of oral Health and Biosciences , 査読無 , 28巻 , 2015 , 1~7

〔学会発表〕(計 1件)

1. 上枝麻友 .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-

の影響 . 第 12 回日本再生歯科医学会学  
術大会・総会 . 2014.8.26 , 徳島大学蔵  
本キャンパス藤井節郎記念医科学セン  
ター ( 徳島県・徳島市 ).

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

上枝 麻友 ( UEDA, Mayu )

徳島大学・病院・助教

研究者番号 : 20625719