

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893074

研究課題名(和文)臨床応用を見据えた三次元培養による歯髄細胞分化誘導とそのシグナルネットワーク解析

研究課題名(英文)Three dimensional culture of dental pulp cells and signal network analysis for clinical applications

研究代表者

山本 弥生子 (Yamamoto, Mioko)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50732749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：株化マウス歯乳頭細胞を24時間三次元スフェロイド培養した後、細胞を回収、RNA抽出し定量的PCRで解析したところ、象牙芽細胞・骨芽細胞分化マーカーであるAlkaline phosphatase (Alp)、Bone morphogenetic protein2 (BMP2)の発現が亢進したことを確認した。一方で、インテグリンシグナル阻害剤を三次元スフェロイド培養した細胞に添加したところ、AlpおよびBmp2の発現が亢進しないことを確認した。以上より、三次元スフェロイド培養は株化マウス歯乳頭細胞を、インテグリンシグナルを介して象牙芽細胞・骨芽細胞分化誘導する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For 3D spheroid culture, mouse dental papilla cells (MDPs) were cultured for 24 hours in 96-well low-attachment culture plates. Flat-bottomed plates were used for two-dimensional (2D) monolayer culture as a control. Following RNA extraction and complementary DNA synthesis from samples, real-time PCR was performed to evaluate the expression of alkaline phosphatase (Alp) and bone morphogenetic protein2 (BMP2) using specific primers. Up-regulation of Alp and Bmp2 expression was observed in the 3D spheroid-cultured MDPs, however, the expression of these genes was low in the 2D monolayer-cultured MDPs. In order to study the effects of integrin signaling, Focal adhesion kinase and Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 inhibitors were added to the 3D-spheroid cultured MDPs. Then, down-regulation of Alp and Bmp2 was observed in the presence of these inhibitors. In conclusion, 3D-spheroid culture induced the odonto-/osteoblastic differentiation of MDPs probably through integrin signaling.

研究分野：歯内療法

キーワード：三次元スフェロイド培養

1. 研究開始当初の背景

細胞の培養は、二次元的な平面培養が一般的だが、本来生体組織は三次元的に構成されているため、平面培養では生体内の生理的環境を再現するには限界があり、細胞が本来持つ分化能や細胞増殖を阻害してしまうことが知られている。三次元培養には、細胞の密度・サンプルの形態が調整可能な、コラーゲンやゼラチン、PLGA などの細胞の足場となるスキャフォールド材料を使用する方法が一般的である。しかし、スキャフォールド材料中の細胞は、細胞・細胞間、細胞・細胞外基質間の環境が生体と異なることが考えられる。そこで我々はスキャフォールド材料を使用せずに細胞を三次元的に培養することが可能な「三次元スフェロイド培養」に着目した。本法は、細胞と細胞自身が産生する細胞外基質が凝集することで三次元的なスフェロイドコロニーを形成するため、生体により近い環境を作ることが可能である。これまでに歯髓細胞としての特性を有する株化マウス歯乳頭細胞 (MDP 細胞) を 14 日間三次元スフェロイド培養し、分子生物学的、組織学的な解析を行ってきた。その結果、三次元スフェロイド培養は歯髓細胞の象牙芽細胞分化を促進することが確認され、分化促進にインテグリンシグナルが関与している可能性が示唆された¹。しかし、培養初期における MDP 細胞の特性変化についてはまだ解析しておらず、また、三次元スフェロイド培養が MDP 細胞の分化を誘導したメカニズムについて更なる研究が必要だった。

2. 研究の目的

(1) 三次元スフェロイド培養した MDP 細胞の培養初期の特性変化を解析する。

(2) 三次元スフェロイド培養した MDP 細胞の象牙芽細胞分化が促進するメカニズムとして、インテグリンシグナルの阻害実験を行い、インテグリンシグナルが関与している可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

三次元スフェロイド培養には、底面が低接着加工された 96 穴プレート (PrimeSurface, Sumitomo Bakelite) を、平面培養には、一般的な培養ディッシュ (90φ plate, greiner) を使用し、MDP 細胞を各培養法で 6、12、24 時間培養後に回収し、RNA 抽出後、象牙芽細胞・骨芽細胞分化を検討するため、分化マーカーである alkaline phosphatase (*Alp*)、bone morphogenetic protein2 (*Bmp2*) の発現を、定量的 PCR を用いて調べた。また、インテグリンシグナルを阻害するため Focal adhesion kinase (FAK) inhibitor (Chemie Tek, 1 and 10 μM)、Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) inhibitor (Cayman Chemical, 1 and 10 μM)

を三次元スフェロイド培養した MDP 細胞に添加し、同様に分化マーカー発現を定量的 PCR で解析した。

4. 研究成果

(1) 三次元スフェロイド培養した MDP 細胞は播種 6 時間後には培養皿底面に集積していることを確認した。さらに時間経過とともに細胞が凝集し、密になっていることを確認した。(図 1、スケールバー 500μm)

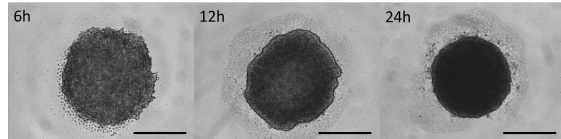


図 1 スフェロイドコロニーの凝集

(2) 12 時間、24 時間三次元スフェロイド培養した MDP 細胞は、同時間平面培養した MDP 細胞と比較し、象牙芽細胞・骨芽細胞分化マーカーである *Alp* および *Bmp2* の発現が有意に亢進した。(図 2、n = 5、*p < 0.05)

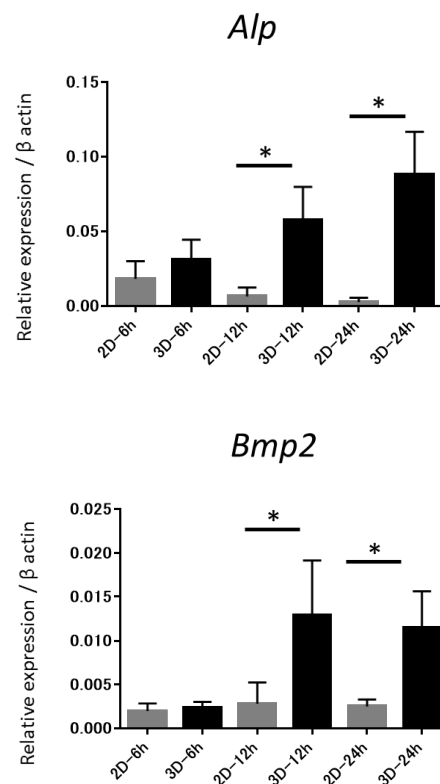


図 2 三次元スフェロイド培養した MDP 細胞の象牙芽細胞・骨芽細胞分化マーカー発現

(3) 象牙芽細胞・骨芽細胞分化マーカー発現の亢進にインテグリンシグナルが関与している可能性を明らかにするため、インテグリンシグナル阻害剤として、FAK inhibitor および ERK1/2 inhibitor を三次元スフェロイド培養した MDP 細胞に添加したところ、阻害剤を添加せず三次元スフェロイド培養した MDP 細胞と比較し、分化マーカーである *Alp* および *Bmp2* の発現が抑制された。(図 3、n=4、*p < 0.05 vs. Control)

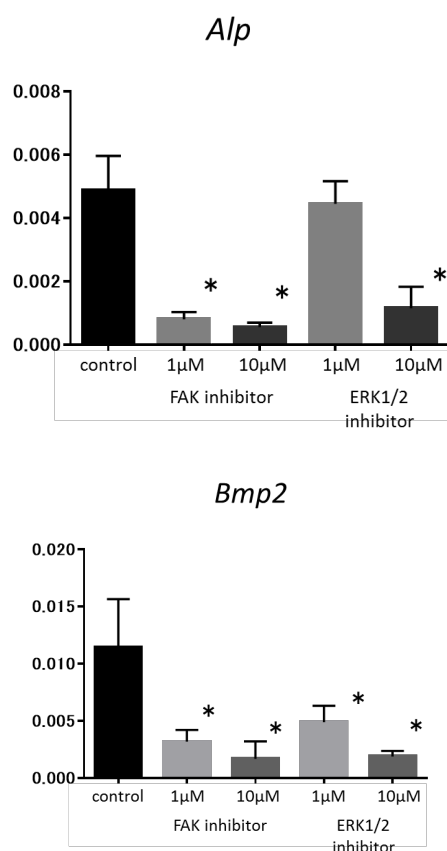


図 3 FAK inhibitor および ERK1/2 inhibitor が三次元スフェロイド培養した MDP 細胞の象牙芽細胞・骨芽細胞分化マーカー発現に与える影響

(4) 考察

以上の結果より、三次元スフェロイド培養した MDP 細胞は平面培養と比較し、培養 12 時間後には象牙芽細胞・骨芽細胞分化マーカーである *Alp* および *Bmp2* の発現が上昇することを確認した。我々は、過去の研究において、三次元スフェロイド培養してスフェロイドコロニーとなった MDP 細胞を用いて凍結切片を作製し、インテグリンシグナル関連因子 (pPaxillin, pFAK) の発現を免疫組織染色で調べたところ、スフェロイドコロニーにこれら因子が強く発現していることを報告している¹。よって三次元スフェロイド培養が MDP 細胞の分化誘導を促進した因子の一つとしてインテグリンシグナルが関与してい

る可能性があると考えている。今回はさらにインテグリンシグナルの影響を調べるため、インテグリンシグナル阻害実験を行った。三次元スフェロイド培養した MDP 細胞に FAK inhibitor および ERK1/2 inhibitor を添加したところ、*Alp* および *Bmp2* の発現は、何も添加せずに三次元スフェロイド培養した MDP 細胞と比較し、有意に発現が低下したことを確認した。よって、三次元スフェロイド培養が MDP 細胞の象牙芽細胞・骨芽細胞分化マーカー発現を亢進した要因としてインテグリンシグナルが関与している可能性があることが示唆された。細胞表面に発現している主要な接着因子の一つであるインテグリンは、スフェロイドコロニー形成に重要な役割を果たしていることが分かっており、MG63 細胞では、三次元スフェロイド培養することでインテグリン発現が促進し、インテグリンを抑制するとスフェロイドコロニー形成が阻害されることが報告されている。また、インテグリンシグナルが神経堤由来幹細胞の象牙芽細胞分化に関与しているとの報告もある。三次元スフェロイド培養した MDP 細胞では、細胞が三次元的に密に接触する環境にあることから細胞接着が発達している可能性があり、インテグリンシグナルを介した象牙芽細胞・骨芽細胞分化が促進した可能性が高いことが分かった。

今後は、三次元スフェロイド培養によって歯髄細胞を効率的に象牙芽細胞に分化誘導できる条件を確立した上で、三次元スフェロイド培養した歯髄細胞をマウス歯髄腔に移植し歯髄組織再生を図る動物実験を行い、臨床応用の可能性を探る予定である。

< 引用文献 >

Yamamoto Mioko, Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation of dental pulp cells, Archives of Oral Biology, Volume 59, Issue 3, 2014, Pages 310–317, doi: 10.1016/j.archoralbio.

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 件)

[学会発表](計 2 件)

Yamamoto Mioko, Effects of short-period three-dimensional (3D) spheroid culture for odonto-/osteoblastic differentiation of dental pulp cells, European Society of Endodontology, 19 September 2015, Barcelona, Spain

Kawashima Nobuyuki, Yamamoto Mioko

et al. Osr2 (odd-skipped related 2) induced upregulation of odonto-/osteoblastic gene expression in mouse dental papilla cells, European Society of Endodontology, 19 September 2015, Barcelona, Spain

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 弥生子 (Yamamoto, Mioko)
東京医科歯科大学(TMDU)・大学院医歯学
総合研究科・医員
研究者番号：50732749

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：