

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593078

研究課題名(和文) GDF-5を用いた歯髄幹細胞分化誘導法の開発

研究課題名(英文) Development of the dental pulp stem cell differentiation derivative method using GDF-5

研究代表者

丸谷 由里子(Maruya, Yuriko)

岩手医科大学・歯学部・講師

研究者番号：60400389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨形成因子の一つであるGDF-5は軟骨・骨形成を促進することが報告されている。しかし、歯の発生に関する知見は少なく、GDF-5の歯髄細胞への作用は不明である。そこで、歯髄幹細胞に対するGDF-5の影響を、象牙芽細胞分化能と血管新生能に着目し検討した。

歯髄幹細胞にGDF-5を添加し培養した群の、象牙芽細胞マーカーDSPPの遺伝子発現は、GDF-5非添加群に比較し有意な上昇が認められた。また、VEGFの遺伝子発現も上昇した。DSPP、およびVEGFの遺伝子発現上昇を誘導したことから、本分子は歯髄幹細胞を象牙芽細胞へ分化促進する作用を持ち、歯髄組織再生において有効な分子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Growth/Differentiation Factor-5 (GDF-5) is a member of the bone morphogenetic protein and promotes formation of bones and cartilages. It has been reported that GDF-5 gene is expressed in oral region. However, the roles of GDF-5 in the differentiation of dental pulp cells are unknown. Thus, we investigated the effect of GDF-5 on the differentiation of dental pulp stem cell.

GDF-5 promoted production of molecules characteristic for odontoblastic phenotype. And gene expression of VEGF increased in the presence of GDF-5. These findings suggested that GDF-5 promotes differentiation of dental pulp stem cell to odontoblast. In addition, possibility to become the effective molecules in reproducing pulp tissue from dental pulp stem cell was suggested.

研究分野：小児歯科

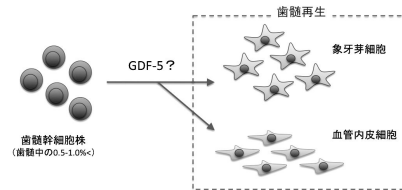
キーワード：歯の再生 骨形成因子

1. 研究開始当初の背景

歯は、う蝕や歯周病で喪失してしまうと、人工物による修復を除いては、再生できない組織の一つと考えられる。その中で歯髓組織は、象牙質の形成に関与し、歯の生活状態を保つ上で大変重要な役割を果たすが、固い象牙質に包まれ、小さい根尖孔からのみ血管供給を受けるといった特徴ゆえに、炎症性変化に対し脆弱で、容易に壊死に陥りやすい。また日常の臨床では、炎症性あるいは壊死性の歯髓は除去されることになるが、歯髓処置を受けた歯は、脆く寿命が短いため、歯髓組織を再生させる技術の開発が望まれている。

日本小児歯科学会では、「乳歯を用いた再生医療技術開発」をメインテーマとし、国民に新たな歯科医療の提供を目指して活動を進めている。つまり、ほとんどすべての大学において、乳歯由来幹細胞の培養技術確立し、今後の再生歯科医学的な治療法への応用に備えようというものである。本プロジェクトが進行している中、組織の発生・再生には、細胞に酸素と栄養を供給するという観点から、素早い血管新生が重要である。そこで、歯髓組織再生の為に、組織内での血管系構築と、象牙質等の硬組織形成の作用を有する分子が重要であると考えられる。

血管新生においては、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) が重要な役割を演じていることが知られており、また TGF- β ファミリー分子である BMPs は、局所において新生骨を誘導する因子として発見された。骨だけでなく、軟骨や歯など硬組織の形成にも重要な役割を持つことが知られ、再生医療での臨床応用が期待されている。GDF-5 は、代表的な BMPs の 1 つであり、軟骨・骨形成を促進することが報告されている。また、骨髄幹細胞に GDF-5 を作用させ、骨分化を誘導させる際に、VEGF の遺伝子発現を上昇させることから、GDF-5 は骨形成のみならず、骨形成における血管新生にも関わると考えられている。GDF-5 は口腔領域にも発現が認められる。歯根の形成過程においては、GDF-5 の遺伝子発現が歯根膜やセメント質表面の細胞に認められることから、歯根膜の成長に関与すると考えられている。さらに、GDF-5 は歯髓組織にもその存在が確認されている。しかしながら、歯の発生に関する GDF-5 の研究はほとんど行われておらず、さらに GDF-5 が歯髓細胞に対し、どのように作用しているかは未だ解明されていない。



2. 研究の目的

血管新生と骨誘導の両作用を期待できる GDF-5 に着目し (図)、本分子の歯髓幹細胞に及ぼす影響を検討することを目的とした。本研究課題では、マウス歯髓幹細胞株を用いて、歯髓組織分化に対する GDF-5 の影響を検討することにより、GDF-5 の歯胚形成における役割、特に歯髓細胞に及ぼす影響と象牙質形成過程における分子機構を明確にすることを目的とする。

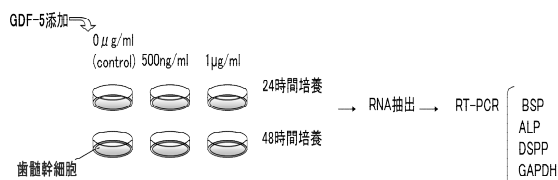
歯髓幹細胞については、通常の培養条件下では歯髓細胞の 0.5-1.0% 以下しか存在せず、象牙芽細胞の分化誘導を生化学的に評価するには不十分であった。そこで、我々はマウス歯髓幹細胞の細胞株化を試み、細胞全体を大量調整する方法を考案した。ある特定の遺伝子群を導入した後、ヘキスト色素の排出能を利用した細胞ソーティング法により、歯髓由来幹細胞を効率よく調整する方法を開発し、世界で初めて歯髓幹細胞株の作成に成功した (Arakaki et al. *J Biol Chem* revised.)。この方法で樹立した歯髓幹細胞を用い、細胞に GDF-5 添加した際の象牙芽細胞分化について、免疫組織学的、分子生物学的、生化学的手法を用いて、その分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

生後 1 週齢 Std; ddy マウスの下顎第一臼歯歯胚から得た幼若歯髓細胞を用いて、GDF-5 添加による幼若歯髓細胞の増殖を MTT 法により測定した。

半定量的 RT-PCR を行い、歯髓細胞に GDF-5 に対する受容体である BMPR-1B, BMPR-1A, BMPR-1I, ActR-1I が発現しているか調べた。さらに GDF-5 を添加し 1 週間培養した後、骨芽細胞・象牙芽細胞系のマーカーとして考えられる Alkaline phosphatase (ALP), Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), Osteonectin (OSN), Osteopontin (OPN), Bone sialoprotein (BSP), Osteocalcin (OSC), Dentin sialophosphoprotein (DSPP) の遺伝子発現の増減を調べ、GDF-5 を添加せずに培養した群と比較した。

また、マウス歯髓由来幹細胞株を継代培養し、セミコンフルエント到達後、recombinant mouse GDF-5 を 500ng/ml および 1 μ g/ml の濃度で添加し、24 時間および 48 時間培養した。培養後、GDF-5 添加群および非添加群の細胞



から Total RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR を行い、BSP、ALP、DSPP の各遺伝子発現を測定した。

さらに、歯髓幹細胞に GDF-5 を 500ng/ml、BMP-2 を 200ng/ml それぞれ添加し、48 時間培養後、リアルタイム PCR 法を用いて DSPP、ALP、VEGF、Dentin matrix protein (DMP)、Nestin の遺伝子発現を調べた。

BMP と GDF-5 の相互作用を検討するため、歯髓幹細胞に、GDF-5 のみ 10ng/ml、100ng/ml、250ng/ml、500ng/ml 添加、また BMP-2 を 200ng/ml + GDF-5 をそれぞれの濃度添加し 54 時間培養後、ALP 活性を測定した。

4. 研究成果

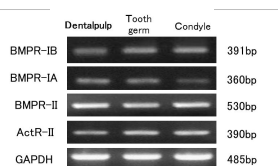
(1) 幼若歯髓細胞に対する GDF-5 の影響

歯髓細胞には GDF-5 の受容体である BMPR-IB、BMPR-IA、BMPR-II、ActR-II の遺伝子が発現していることが確認された。

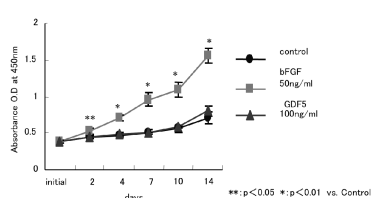
GDF-5 添加により歯髓細胞の細胞増殖は促進されなかった。一方、ポジティブコントロールである bFGF 添加群では添加 2 日後より有意に増加していた。

また、GDF-5 を添加し 1 週間培養した幼若歯髓細胞では、ALP および DSPP の遺伝子発現に有意な増加が認められた。OPN、BSP も同様に、GDF-5 添加群と非添加群の間に有意な差が認められた。

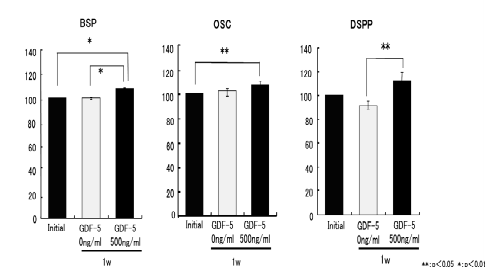
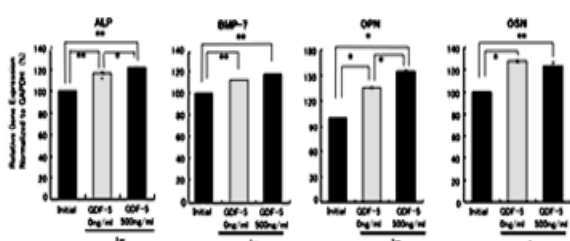
GDF-5 受容体の発現



GDF-5 の細胞増殖能への影響



骨芽細胞・象牙芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現



(2) 歯髓幹細胞に対する GDF-5 の影響

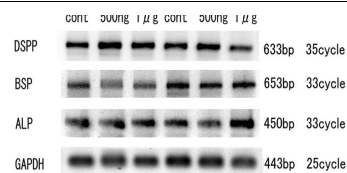
歯髓細胞の中には、多分化能を有する歯髓幹細胞の存在が知られていたが、通常、歯髓細胞の 1%以下しか存在しないため、象牙芽細胞分化誘導を生化学的に評価するには不十分だった。今回、株化に成功した歯髓幹細胞を用いることにより、この問題が解決できる。歯髓幹細胞に GDF-5 を添加し、24 時間培養した群の DSPP の遺伝子発現は、GDF-5 非添加群に比較し有意な上昇が認められた。また、BSP の遺伝子発現は培養 48 時間後において GDF-5 添加群で上昇し、ALP では、培養 24 時間後、48 時間後いずれにおいても GDF-5 添加による遺伝子発現の有意な変化は見られなかった。

幼若歯髓細胞と歯髓幹細胞を比較すると、歯髓幹細胞のほうが GDF-5 により、DSPP の発現誘導がより増強されていることが示された。

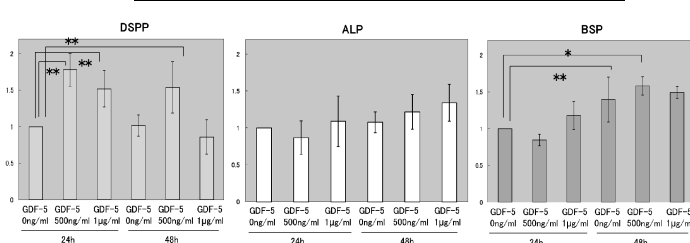
この結果はリアルタイム PCR においても同様であり、GDF-5 添加群においては非添加群に比較しこれら象牙芽細胞分化マーカーの遺伝子発現が上昇した。

BMP-2 と比較すると、DSPP においては GDF-5 の方が、DSPP の遺伝子発現を上昇させたが、ALP においては BMP-2 に比較するとその作用は弱かった。

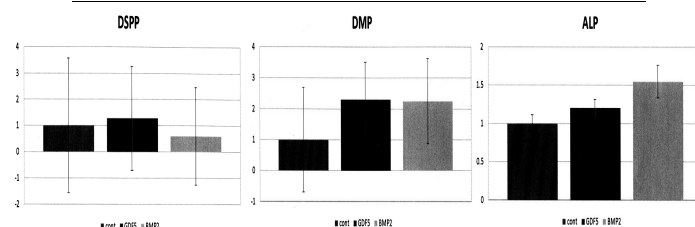
骨芽細胞・象牙芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現



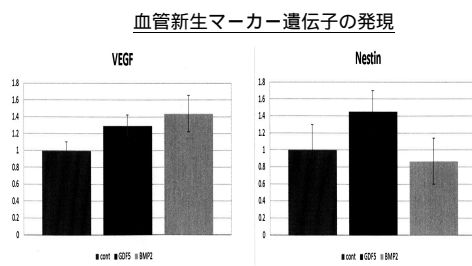
骨芽細胞・象牙芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現 RT-PCR



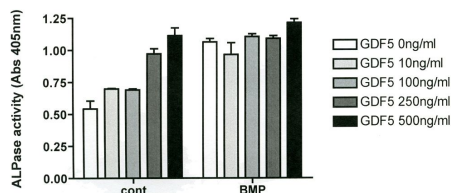
骨芽細胞・象牙芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現リアルタイム PCR



また、歯髄幹細胞に GDF-5 を添加し 48 時間培養した群の VEGF の遺伝子発現は非添加群に比較し上昇していた。この作用は BMP-2 においても認められた。また GDF-5 は、Nestin の遺伝子発現も上昇させた。以上から、GDF-5 は歯髄における血管新生にも関わる可能性があることが示唆された。



GDF-5 と BMP-2 の相互作用を ALP 活性に関して調べた結果、GDF-5 と BMP-2 をともに添加し培養した方が、ALP 活性を上昇させる傾向があった。



以前より、歯髄細胞中に存在する幹細胞は TGF- β ファミリー分子により、象牙芽細胞への分化が誘導されることが報告されてきた。しかしながら、いずれも幹細胞以外の細胞集団を含む細胞培養条件下での解析であり、これら分子が直接幹細胞に作用しているのか、あるいは歯髄中に存在する他の細胞を介した現象であるのか明らかではなかった。また、TGF- β ファミリー分子のなかでも GDF-5 に関する報告は皆無であった。以前、我々はラットの幼若歯髄細胞において、GDF-5 で処理した群と control 群で比較すると、ALP、OPN、BSP、DSPP の発現が上昇することを示し、GDF-5 が骨芽細胞あるいは象牙芽細胞分化に関与している可能性を報告した。

今回の、歯髄幹細胞を用いた実験において、GDF-5 は、象牙芽細胞マーカーである DSPP 遺伝子の発現上昇を誘導したことから、本分子は歯髄幹細胞を象牙芽細胞へ直接分化促進する作用を持つ可能性が示された。

DSPP 遺伝子発現の上昇は、500ng/ml 添加群のほうが、1 μ g/ml 添加群より著しかった。TGF- β ファミリー分子は、濃度により細胞の分化誘導や増殖に対する影響が異なることが知られており、今回のケースでは、500ng/ml 程度の添加濃度が細胞を分化の方向に誘導するものと考えられた。また、時間的な観点からは、TGF- β ファミリー分子の効果は一過性であり、長期的に培養すると逆

に分化マーカーの発現を抑制してしまうものが多い。このような例は骨やエナメル芽細胞の分化で確認されている。今回の結果において、48 時間培養群の DSPP 遺伝子発現が、24 時間培養群に比べ低下していたことから、GDF-5 を象牙芽細胞分化誘導に応用する際には、分化の初期にのみ作用させ、適切な時期に除去する必要があるのかもしれない。今回の結果より、GDF-5 が歯髄幹細胞を象牙芽細胞に分化促進させる可能性を示したが、同様に、間葉系の細胞に石灰化を誘導する因子として、BMP-2 がよく知られている。しかし、以上に述べたことから、GDF-5 は初期分化に局限して作用することから、BMP-2 よりも TGF- β 1 の作用に近い性質を有しているものと思われる。このことは 48 時間培養後のリアルタイム PCR の結果において、BMP-2 添加群の方が GDF-5 添加群より ALP の遺伝子発現が上昇していたことから支持されるであろう。多くの TGF- β ファミリー分子は、骨基質や ALP の発現を早期に調節するものも多く、DSPP のみを発現誘導するものはほとんどない。このことから、幹細胞を骨芽細胞でなく象牙芽細胞に分化誘導させるために GDF-5 は重要な役割を演じている可能性が認められた。また、GDF-5 は VEGF の遺伝子発現を誘導させたことから、血管新生に関わることも示され、歯髄組織再生を目指す上で有効な分子とすることが示唆された。

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)

Glycosphingolipids Regulate Ameloblastin Expression in Dental Epithelial Cells.

Kamasaki Y., Nakamura T., Yoshizaki K., Iwamoto T., Yamada A., Fukumoto E., Maruya Y., Iwabuchi K., Furukawa K., Fujiwara T., Fukumoto S

Journal of Dental Research 91:78-83 2012

〔学会発表〕(計 4 件)

Williams 症候群患児に対する歯科治療経験
丸谷由里子, 日野綾子, 小松偉二, 山田亜矢, 福本敏

顎関節症状を呈する患児に対し、拡大床を使用して交叉咬合の改善を行った一例
日野綾子, 丸谷由里子, 山田亜矢, 福本敏
日本小児歯科学会北日本地方会 2013

Evaluation of S-RPG filler containing fissure sealant

Y.Maruya, A.Yamada, M.Suzuki, R.Miyamoto, T.Hanada, K.Hirayama, S.Fukumoto
Pediatric Dentistry Association of Asia 2012

新しい生物活性化領域スクリーニングとしてのエナメル基質天然変成領域の同定
只木麻友，山田亜矢，宮本綾子，
丸谷由里子，福本敏
日本小児歯科学会 2012

6．研究組織

(1)研究代表者

丸谷 由里子 (MARUYA YURIKO)
岩手医科大学歯学部・講師
研究者番号：60400389

(2)研究分担者

中村 卓史 (TAKASHI NAKAMURA)
東北大学歯学研究科・准教授
研究者番号：90585324

岩本 勉 (TSUTOMU IWAMOTO)
徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究
部・教授
研究者番号：90346916
削除：平成 25 年 7 月 1 日