

## (4) 研究成果の概要

1 口腔組織再生医学研究班

## &lt;研究成果概要&gt;

## 1-1 口腔組織の分化・誘導に関する研究グループ

口腔組織の再生に関与する遺伝子の探索と組織再生への応用では、まずヒト歯髄細胞の初代培養を行い、デキサメサゾン (Dex), ベーターグリセロフォスフェイト ( $\beta$ -GP), アスコルビン酸を添加して培養することによって石灰化結節を形成させる実験系を確立した。ヒト歯肉上皮から歯肉上皮細胞を培養し、歯肉線維芽細胞とともに mRNA を回収し、約 8,500 遺伝子の cDNA マイクロアレイを用いて、両細胞に優位に発現している遺伝子 keratin, desmocollin (上皮細胞), vimentin, gp130 (歯肉線維芽細胞) の同定を行った。ヒト歯根膜細胞から歯根膜線維芽細胞を培養し、ALPase, I 型コラーゲン, オステオカルシンの産生を観察した。エナメルタンパク質 (エムドゲイン) を添加, 非添加群両者から合成した cDNA をテンプレートにそれぞれを cy3, cy5 で標識しながら cRNA を合成した結果, 蛍光色素の取り込みは良好であった。ヒト歯根膜細胞にエムドゲイン (50  $\mu$ g/ml) を作用させ, 約 10,000 のヒト遺伝子カスタムメイドオリゴヌクレオチドマイクロアレイにハイブリダイズし, 遺伝子発現の変化を解析した結果, 多数の遺伝子の mRNA レベルが増大し, 低下する遺伝子は少なかった。遺伝子発現が増大したのものとして, VLDL 受容体, lysyl oxidase, thrombomodulin, ICAM-1, claudin 1 などの細胞増殖に関与する遺伝子が認められた。以上の結果より, エムドゲイン刺激により, 歯根膜細胞で生じる遺伝子発現の変化が明らかとなった。

TNF- $\alpha$  はヒト歯肉線維芽細胞の PA 活性を作用時間および作用量に依存して上昇させ, ホスホリパーゼ C 消化したヒト歯肉由来線維芽細胞から遊離される PA 活性を増大させ uPA および uPAR の mRNA 量を増大させた。これらことから uPA および uPAR の遺伝子発現を促進することで産生量を増大させて PA/プラスミン系を促進し, 歯肉組織の炎症や結合組織の破壊に深く関わっていることが明らかになった。歯根膜細胞では咬合咀嚼モデルとして機械的ストレスを刺激し, GeneChip を用いて遺伝子発現変化をモニターし, STAT 関連遺伝子群, serine/threonine kinase 情報伝達系, voltage-gated Na channel, Ca<sup>2+</sup> channel 依存性情報伝達系など種々の関連遺伝子の変動を見いだした。細胞間/細胞外基質間相互作用関連因子, 細胞骨格調節性機械的ストレス誘導性因子 deleted in liver cancer 1 の発現がみられた。また, cDNA マイクロアレイ解析の結果, 歯根膜細胞への歯周病原菌内毒素の刺激によって galectin-9 遺伝子の発現が促進されることを見出した。また, ヒトセメント芽細胞における骨組織誘導培地で発現が上昇する遺伝子を遺伝子差別化法により特定し, 本研究で口腔領域の種々の細胞について半網羅的に解析を試み, 再生医療に役立つ興味深い遺伝子が探索できた。

間葉系骨髄細胞, 未分化細胞の細胞操作による組織再生では, ヒト幹細胞に Dex,  $\beta$ -GP, アスコルビン酸を添加して培養を行ったところ, 線維芽細胞様形態から骨芽細胞の特徴である敷石所の形態に変化した。また, von Kossa 染色によって, 骨結節様に沈着物を形成することを確認された。Dex 存在での培養実験で, 既に報告されている濃度の BMP カクテルおよびエムドゲインを添加すると, BMP カクテルはむしろ骨結節様沈着物の形成を抑制した。これに比較して, エムドゲイン添加群では, 骨結節様沈着物の形成を促進した。以上のことから, 未分化な細胞から骨芽細胞への分化に際して, GeneChip によるトランスクリプトーム解析を行う場合の培養条件を決めるのに有用な情報を得ることができた。正常ヒト骨髄間葉系幹細

胞を用いて、骨芽細胞誘導培養系の培養下で、1~2日で紡錘形から敷石状に形態変化した。BMP 4の単独投与ではデキサメタゾン存在下で骨形成能が認められた。そして、デキサメタゾン添加下でBMP-2, 4, 7の3種の混合系がもっとも石灰化を増大させ、von Kossa, 染色によっても骨結節様の形成を確認した。一方、妊娠時にカフェン摂取させたラット頭蓋骨から分離した骨芽細胞は骨結節の形成能が低下していること、胎盤細胞のAngiotensin II 2型受容体遺伝子の発現を増大させることを明らかにした。IGF-IIとIGFBP-2遺伝子は期待した通りヒト骨髄間葉系幹細胞の分化過程にしたがってmRNAレベルが増大していた。骨誘導培地により、骨髄細胞から骨芽細胞へと分化誘導した各時期における細胞からmRNAを回収し、ALPase, I型コラーゲン, オステオカルシンおよびCbfa1転写因子の遺伝子発現をRT-PCR法により解析した。

神経細胞の再生に関与する分化・誘導の探索では、ヒト神経膠細胞にプロポフォールを作用させた群で、作用直後および48時間後において、増殖能およびviabilityの有意な低下が認められた。神経細胞のモデルであるPC12細胞(ラット副腎髄質褐色細胞腫細胞)において、培地へ神経成長因子50 $\mu$ g/ml添加による神経突起発現を確認した。脳保護作用が報告されている静脈麻酔薬であるチオペンタールおよびプロポフォールをヒト神経膠細胞(CCF-STTG1)に作用させたところ、プロポフォールで増殖能抑制効果が示唆され、神経細胞の再生に関しては抑制する可能性が考えられた。PC12細胞は、血清存在下で培養すると増殖し、血清非存在下でNerve Growth Factor (NGF)が存在する環境では突起を伸長して神経細胞様に分化した。NGFおよびbFGFを同時に作用させ、神経突起の伸長に対する影響を確認した結果、NGF50ng/ml+bFGF 5.0ng/ml添加群はNGF 50ng/ml添加群と比較し、24時間後において1.26倍の突起伸長が確認された。

## 1-2 骨タンパク質に関する研究グループ

骨形成病変における骨形成機序および骨蛋白の局在についての病理組織学的研究とその応用では、骨などの硬組織の形成を伴う病変を中心として、骨形成性エプーリスおよび石灰化歯原性嚢胞など石灰化を伴う代表的な疾患に関して、詳細な病理組織学的検索を行った。病理組織学的に骨形成性エプーリスは、線維性結合織と石灰化物により構成され、石灰化物が梁状骨および緻密骨、セメント粒あるいは骨粒、および異栄養性石灰化に分類された。石灰化物の種類、量および大きさは症例内および症例間で様々であった。潰瘍性病変は石灰化物の周囲に、高細胞密度の線維芽細胞領域を高頻度に有し、異栄養性石灰化がその領域にのみ観察された。Ag-NOR染色およびPCNA免疫染色において、本病変の線維芽細胞の増殖能は各々0.91と41.1%を示し、それらが対照のセメント質骨形成性線維腫の数値(1.70; 51.5%)よりも低く、各値の両者には有意差が認められた。石灰化歯原性嚢胞は種々の量の幽霊細胞および石灰化物を伴う歯原性上皮により裏装されており、その上皮は基底細胞、星状網様細胞、幽霊細胞および幽霊細胞様細胞の4種類の細胞で構成されていた。免疫組織化学的に、基底細胞および星状網様細胞が種々の程度にkeratin, cytokeratin (CK) 7, CK 17, CK 19およびhigh-molecular-weight CKに陽性を呈した。幽霊細胞様細胞はこれらの抗体のほかに、CK 10/13にも種々の程度に陽性であった。いくらかの幽霊細胞がHMW CKにのみ陽性を示した。微細構造学的に、幽霊細胞は細胞小器官に乏しく、トノフィラメントの束で満たされていた。その束は融合し、大きな無構造の塊状物を形成していた。巨大で、球形、無線維性の無構造な

塊状物を有し、硝子様変性を呈しているものも観察された。デスモゾームと細胞質突起は4種類全ての細胞に観察された。また、光顕的に幽霊細胞の胞体内に石灰化物が観察されたが、微細構造学的には細胞質辺縁の境界不明瞭なびまん性の高電子密度領域として認められた。上皮と間質結合織の境界部には dentinoid 形成があった。これら石灰化物や dentinoid の量は症例により異なっていた。石灰化物を有する幽霊細胞において細胞増殖能のマーカーは陰性を呈した。これらのことより、骨形成性エプーリスの多くのものおよび石灰化歯原性嚢胞における石灰化物は細胞が作り出すのではなく、変性により生じると推察され、これらの病変における骨形成機序が明らかになった。加えて、Ki-67 標識指数 (LI) やトポイソメラーゼ II $\alpha$  LIにおいて、管腔性・壁性の増殖および充実性増殖を示す腫瘍型 (7.82; 6.56) が嚢胞型 (4.71; 4.32) および単嚢胞性エナメル上皮腫 (5.56; 4.84) よりも高値を示した。

歯周組織再生過程での骨芽細胞内転写因子の発現変化では、骨シアロタンパク質 (BSP) の遺伝子発現を調節する転写因子を中心に検索を行った。BSP は、石灰化結合組織特異的に発現する非コラーゲン性タンパク質で、試験管内でアパタイト結晶形成能を有することから、石灰化における役割が注目されている。まず、骨代謝に重要なホルモンである副甲状腺ホルモン (PTH) による BSP の転写調節機構の検索を行った。ROS17/2.8 骨芽細胞様細胞を PTH (10nM) にて刺激すると、12 時間後に BSPmRNA 量の増加および BSP の転写活性の上昇が認められた。PTH による転写の調節は Pit-1 配列を介すると考えられた。次に、ROS17/2.8 骨芽細胞様細胞を用い、骨代謝を調節すると考えられるフラボノイド (Genistein, 50 $\mu$ M) の BSP の転写に対する影響を検索した。50 $\mu$ M の Genistein は、12 時間後に BSPmRNA 量を増加させた。ルシフェラーゼプラスミドに種々の長さの調節した BSP プロモーター遺伝子を挿入し、ROS17/2.8 細胞に導入後、Genistein で刺激したところ、BSP のプロモーター約 116 塩基上流域を含むコンストラクトでルシフェラーゼ活性が上昇した。次に、プロスタグランジン E2 (PGE2) による BSP の転写調節機構の検索を行った。PGE2 刺激により BSP の転写活性は上昇し、この転写の促進は BSP プロモーター中の cAMP および FGF2 応答配列を介することが明らかとなった。cAMP 応答配列に結合する転写因子は CREB であり、現在未同定の FGF2 応答配列結合タンパク質の同定を行っている。

骨芽細胞は骨の形成および再生において最も重要な細胞であり、様々なタンパク質を分泌し、石灰化を調節している。その際、細胞質および核内では転写因子が細胞機能の調節を行っている。そこで、歯周組織再生過程における骨芽細胞内での転写調節因子の発現変化を検索した。創傷治癒過程で、骨芽細胞内での様な転写因子の発現が変化するかを生化学的および形態学的に検索する前段階として、まず骨芽細胞様細胞 (Saos2 および ROS17/2.8 細胞) と骨髄由来細胞 (SBMC) を培養し、創傷治癒を試験管内で再現できる系を検討した。創傷治癒の場で多量に発現する、塩基性線維芽細胞成長因子 (FGF2) とインシュリン様成長因子 (IGF-I) を骨芽細胞培養系に添加し、骨組織に多く発現する骨シアロタンパク質 (BSP) またはオステオポンチン (OPN) 遺伝子の発現量の変化をノーザンブロット法にて検索を行った。骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8, Saos2 細胞, または SBMC 細胞を FGF2 または IGF-I にて刺激し、経時的に細胞より全 RNA を抽出してノーザンブロットを行った結果、両因子とも BSPmRNA 量を増加させることが明らかとなった。また、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、両者ともが転写を上昇させた。FGF2 または IGF-I で刺激した ROS17/2.8 および Saos2 細胞から、核内タンパク質を抽出し、ゲルシフトアッセイにて、プロモーター遺伝子との結

合を核内転写因子の発現を検討した結果、FGF2 刺激では、核内タンパク質と FGF Response Element (FRE) の結合が、また IGF-I 刺激では、FRE と HOX 結合配列との結合量が増加することが明らかとなった。

歯周組織（特に骨組織）再生過程における骨シアロタンパク質発現調節機構では、FGF2 刺激による BSPmRNA の発現量の変化を検討する目的で、FGF2 で刺激した ROS17/2.8 細胞と無刺激の細胞から全 RNA を抽出し、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。FGF2 (10ng/ml) 刺激により、BSP の mRNA 量は経時的に上昇し、6 時間で最大に達し、その後 24 時間まで変化はなかった。一方、コントロールである GAPDH の発現量には変化は認められなかった。

次に BSPmRNA 量の増加が、mRNA の分解速度の変化によるものか否かを検討する目的で、転写阻害剤である 5, 6-dichloro-1-b-d-ribofuranosylbenzimidazol (DRB)にて細胞を処理し、経時的に全 RNA を抽出してノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、BSPmRNA の半減期は FGF2 刺激前後で変化はなかった。FGF2 による BSP の転写の調節を調べる目的で、ラット BSP プロモーターを含むルシフェラーゼコンストラクト (pLUC1-pLUC5)を用い、ROS17/2.8 細胞に導入後、FGF2 (10ng/ml)で 6 時間刺激し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、pLUC3 (-116~+60 塩基対)と pLUC3 よりも長いプロモーター配列を含むコンストラクトで、FGF2 により約 3 倍の転写活性の上昇が認められた。pLUC3 に含まれるプロモーター配列である-116 から-43 塩基対までのプロモーター配列をさらに短く切断したコンストラクトを用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、FGF2 による転写活性の上昇は、-116BSPLUC および-108BSPLUC で認められ、-84BSPLUC より短いプロモーター配列を含むコンストラクトでは転写活性の上昇は認められなかった。以上のことから、FGF2 に応答する配列は-108 から-84 塩基上流までのプロモーター配列中に存在すると考えられた。

骨芽細胞様細胞 (ROS17/2.8, Saos2 および骨髄由来細胞;SBMC)を用い、BSP の発現を検討した。各々の細胞に対し、創傷治癒の場で多量に発現する塩基性線維芽細胞成長因子 (FGF2) または血小板由来成長因子 (PDGF)を添加し、分化程度の異なる細胞がどの様な発現調節を受けるかを検討し、さらに、BSP のプロモーター配列約 3000 塩基対を挿入したルシフェラーゼプラスミドを作成し、両細胞にトランスフェクションして、転写活性に及ぼす FGF2 または PDGF の作用を検討した。ROS17/2.8 および骨髄細胞 (SBMC)を FGF2 または PDGF にて刺激をすると、両因子とも BSPmRNA 量を増加させた。BSP 遺伝子のプロモーター配列を挿入したルシフェラーゼプラスミドを作成し、ROS17/2.8 および骨髄由来細胞に導入後、FGF2 および PDGF で刺激を行ったところ、FGF2 のみが転写を上昇させた。一方、UMR106 細胞に導入し、両因子にて刺激を行ったところ、活性に変化は生じなかった。

### 1-3 歯の形態形成に関する研究グループ

歯と歯周組織の形態発現に関わる制御機構に関わる研究では、発生学および遺伝子学的方面からのアプローチが行われている。歯および歯周組織の発生過程における形態形成と細胞分化は、上皮と間葉の相互作用により制御されており、近年、歯の発生分化に関わる各種成長因子、さらにそれらに関係する遺伝子が発見されている。歯と歯周組織の発生過程における各構成細胞の基質分泌機構、アパタイト結晶形成について、組織学的、免疫学的手法を用いて検索し、形態形成、再生機構を追求している。形成された硬組織に周期的に出現する

成長線の形成機構を探っている。歯胚分化過程の構成細胞の分泌タンパク質の遺伝子発現を解析している。歯周組織の中で歯根形成に関しては、形態形成と組織発生との関係を再検討した。

歯周組織の研究については歯根形成との関連性に注目し、ヒトを含む種々動物の歯根において肉眼解剖学的な形態形成と組織発生との関係という基本的な問題を再検討している。これは、歯と歯周組織の形態発現に関して、これまで進められてきた分子レベルないし遺伝子レベルでの研究を総括的に検討していく重要なステップと考えられる。エナメル芽細胞や象牙芽細胞等のより分化の進んだ形成細胞について、形態学的、免疫組織細胞学的により詳細な研究と細胞動態を視野に入れた立体的な研究に焦点を当てている。これらの研究の中からより基本的な幹細胞としての本質を導き出すことができると考えられる。

歯の形態形成に関する幹細胞の基礎的研究では、魚類からは哺乳類までの各種動物の歯の発生様式が精査されており、咬頭の形成、歯種の決定、歯根の形成制御機構の解明が進んでいる。これには、胚培養による歯胚発生初期の上皮、間葉での遺伝子発現の検索が進んできたことが大きな要因となっている。さらに、歯胚発生初期の細胞の形態を精査することにより、細胞の形態と機能発現の関連性の検索も進んでいる。一方、幹細胞の同定と機能発現に関する基礎研究においては、歯胚培養によりエナメル器、神経堤由来の組織における細胞分化の詳細とその制御について精査されており、無歯根のヘルトビッチ上皮鞘などに有力な候補が挙がってきている。近年、歯の形態形成に関わる多くの遺伝子と、発現調節に関与する因子の解明が進んできている。歯および歯周組織の再生機構を明らかにするためにも形態形成機構の詳細を解明する事が重要である。しかし、歯胚の生物学的実体である細胞の、正常な胚発生を保證する調節発現機構、組織形成を進める分化機構については十分に判明していない。本研究では歯の発生学的な検索を行うとともに、細胞増殖と分化の基本となる幹細胞の分化制御や調節能の解析を行い、それらを人為的にコントロール可能となるような条件の検索を行い、歯そのものを細胞レベルから構築するための足がかりとすることを目的とする。そして、正常な形態と機能の再生のためにヒトも含めて広く歯と歯周組織の発生機構とその制御機構を明らかにし、機序を解明することを目的とする。一方、歯冠形成とあわせて歯根の形成にも焦点を当て、形態形成の解明を遺伝子発現と関連させて解析を進め、実験的再生に結びつける。これら、制御機構の解明の目的に対して、歯胚の器官培養、免疫組織化学、免疫電子顕微鏡等の手法を用いて検索を進め、立体構築の手法によってより鮮明な解析を目指してきた。更に、ヒトの歯の形態形成の解明には系統発生的で幅広い観点が必要であり、魚類、爬虫類、哺乳類の各種の動物歯胚、化石試料までを加えた検索を用い、これまでの実験動物からの知見を越えてより統合的な形態形成機構を探り、合理的な再生機構を追求してきた。歯の形態形成における幹細胞の存在とその部位についての研究では、ゲッ歯類の常生歯（切歯）において終生、歯の形成細胞を供給する場として、Apical budを組織型幹細胞のニッチと位置づけ、その形態学的研究と分子生物学的研究を行った。幹細胞ニッチは幹細胞の特性を維持するためのシグナルを提供している微小環境と考えることができる。エナメル質形成に関わる遺伝子についての成果は、第一にエナメル質形成に関わる転写調節因子特に誘導性の因子でAP-1とその関連タンパク質の形成段階依存性の発現を解析し、エナメル質形成の初期にはATF2が成熟期にはc-Junなどが重要でco-activatorのCBPも関与していることを示すことができた。第二にエナメル芽細胞のアポトーシスに関する研究においては、コルヒチンは通常

アポトーシスを起さない基質形成期エナメル芽細胞にアポトーシスを引き起こす原因となること、エナメル芽細胞はアポトーシスの原因となりうるFas抗原を一貫して発現しているが、このFasは実際にはアポトーシスの誘導を引き起こさないことを明らかにすることができた。第三にエナメル芽細胞によるエナメル質の石灰化機構の解明に関して、細胞のCaATPaseの局在を形質膜のPMCAと小胞体膜のSERCAに注目し、調べた結果は、基質形成期と成熟期のエナメル芽細胞でPMCAとSERCA2の2つのカルシウムATPaseが局在していることを明らかにした。

エナメル器と歯髄の樹状細胞とマクロファージに関して内在性のシステインプロテアーゼインヒビターであるシスタチンCを発現していることを明らかにした。また、歯の形態形成におけるストレスタンパク質発現の機能的意義について検索し、同タンパク質が歯の形態形成の時期に対応して特異的な発現パターンを示すことを明らかにした。このタンパク質は酵母や大腸菌から哺乳動物細胞に至るまで、生物が高温など危険な環境に曝されると生合成が著しく促進される一群のタンパク質で、ストレスによる損傷からの自身の防御と修復に関与することが知られている。本プロジェクトにより、分化したエナメル芽細胞や象牙芽細胞がこのストレスタンパク質の一つ（HSP-25）をもつことが明らかになり、当該細胞機能発現に重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、細胞増殖パターンとの相関を検索すると歯の構成細胞の増殖から分化のスイッチにもHSP-25が重要な役割を果たすことが明らかになった。一方、歯根領域の研究においては生後歯胚、特に歯根形成を研究するために好適な器官培養系の開発を行い、これを用いてマウス下顎第一臼歯で歯根伸長のメカニズムの検討を行った。その結果、ヘルトビツヒの上皮鞘（HERS）の伸長は細胞増殖が重要な役割を果たすことが分かった。さらにこの際HERSの内エナメル上皮に比べて、外エナメル上皮の方が各ステージとも高い分裂指数（MI）を示した。HERSは組織化学的検索においてIGF-I receptorを持つことから、歯根形成初期のHERSの伸長はIGF-Iが制御因子のひとつであること、外エナメル上皮の細胞増殖が重要な働きをしていることが分かった。外エナメル上皮はHERSの伸長の際に、HERSの長さを維持するために、細胞の供給源としての役割を担っている可能性が考えられた。歯の形成機構と象牙質結晶の配向性や組成の関連性についての研究では、二生歯性の歯において、歯冠象牙質では無配向であった。歯冠象牙質では、石灰化球が存在し、結晶の配向性が放射状になると考察される。歯根象牙質の結晶は配向性が認められた。歯根象牙質では、石灰化球の発達が悪いが存在しない。歯根象牙質では成長線が明瞭に認められ、結晶の配向は成長線の方やコラーゲン線維の配列と平行であった。多生歯性のワニの歯では、歯冠部では成長線が明瞭であり、結晶の配向性が認められた。その配向は成長線に平行であった。石灰化球の発達が悪い。一生歯性のクジラ類の歯でも歯冠部で結晶の配向性が認められた。ヒトの歯の発生様式の特異性を理解するために、下等脊椎動物から哺乳類各種の歯胚を用い、形態学的観察に加え免疫学的な手法を用いて比較検討をおこなってきた。更に、これらの連続切片から各種動物の歯胚群を立体復構し、発生様式を三次元的に検討してきた。一方、系統発生的な分析のために化石試料の形態学的解析をすすめて、発生様式の考察をおこなってきた。その結果、エナメル質については、主にイヌの歯胚を用いた研究によって、エナメル芽細胞の集団化とその動きからシュレーゲル条形成との関連性が強く示唆され、その過程におけるエナメル芽細胞内あるいは細胞間での細胞骨格やタンパク質の動態が検索され、物質レベルでの関連性まで明らかになってきた。また、歯の発生様式の研究では

立体構築像から歯胚の世代関係が明らかになり、これまで不明であったオポッサム、スキウスの交換様式が明らかになってきている。これらはそれぞれの種の特異性を反映しており、ヒトの歯の形成機構と萌出機構の解明の手掛かりとなる。爬虫類の研究では哺乳類のエナメル質の基本構造であるエナメル小柱の起源が明らかにされてきた。また、顎における歯種の決定機構については、前歯、犬歯、臼歯の3つの領域が想定され、異なる動物間での遺伝子発現の比較を行い、上顎と下顎では発現領域が異なることが明らかになった。系統発生学的なアプローチは化石試料の組織構造の検索から発生過程を推定する試みを進め、新生代第三紀の代表的な化石哺乳類であるデスモスチルスにおいて臼歯の形成、萌出様式を推定しこれまでの歯式の変更を示唆する結果が出されてきた。これらの例は新しい研究方法の開発と議論の積み重ねによって着実に成果をあげてきたことを示しているといえよう。

## <優れた成果があがった点>

当研究班では、遺伝子の発現制御だけでなく、タンパク質の発現および発現後の歯と歯周組織の形態形成まで考慮した研究を続けていることから、将来の臨床応用の可能性が高いものと思われる。基礎的細胞培養実験においても、幹細胞の分化条件を十分に検討することが出来た。以上のことは基礎的バックグラウンドの確立した臨床応用に繋がると考えられる。また、石灰化組織特異的に発現する BSP の転写調節機構に焦点を当てた研究では、質の高い研究成果が得られていると考えられる。

### 1-1 口腔組織の分化・誘導に関する研究グループ

歯周組織は複数の組織細胞が細胞相互作用を発揮して、恒常性を維持している。当然ながら病態の進行、組織再生時においても各組織細胞における特異的細胞機能を明らかにすることは再生医療を考慮したとき重要な課題である。本研究では、GeneChip 解析、遺伝子差別化法といった先進技術を応用して、これまで知られていなかった種々の遺伝子を同定することができた。とくに歯根膜細胞における galectin-9、ヒトセメント芽細胞の硬組織形成の誘導で発現上昇する thrombospondin, IGF-dependent IGF binding protein 4 protease, fibroblast growth factor 7 遺伝子は、組織再生に有用な遺伝子として期待される。間葉系幹細胞から骨芽細胞へと効率良く分化誘導できる実験系を確立して mRNA を回収し、蛍光標識を行って mRNA レベルを Affymetrix GeneChip を応用して網羅的にトランスクリプトーム解析を行い、多数の遺伝子が発現した。これらの遺伝子群は、オートクリン的に働くと考えられる遺伝子も多く認められた。骨粗鬆症ラットに IGF-II と IGFBP-2 の投与が骨吸収を抑制し、かつ骨形成に働くことが報告されており、興味深いことに、IGF-1/IGFBP3 投与は腎臓での沈着物を形成するが IGF-II と IGFBP-2 は認められず安全性の高い骨の再生医療に IGF-II と IGFBP-2 の共投与は有用であると示唆された。神経突起形成に NGF 及び bFGF の相加効果が示唆され、同時作用は神経の再生医療に有用であると思われる。

### 1-2 骨タンパク質に関する研究グループ

骨形成性エプーリスは腫瘍と炎症の中間に位置し、非腫瘍性の病変ではあるが、高い増殖能を有することが示唆され、適切な外科切除が必要と考えられた。また、硬組織の性状は症例間で様々であったが、異栄養性石灰化は潰瘍性病変にのみ認められた。一方、石灰化菌原性嚢胞における石灰化物は、幽霊細胞の胞体内に小顆粒状あるいは辺縁部にびまん性に観察された。微細構造学的に、幽霊細胞にはトノフィラメントの束が多数観察され、それらの融合による無構造塊状物もみられた。これらの所見は幽霊細胞が異常な角化の結果生じ、更には石灰化を伴う硝子様変性の来すものとの結果が得られた。更に、腫瘍型の石灰化菌原性嚢胞は、腫瘍としての生物学的態度を有しており、それ故腫瘍として分類され、嚢胞型から区別されるべき病変と考えられた。

骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 および Saos2 細胞を用いて、創傷治癒の場で多量に発現する FGF2 または IGF-I の BSP に対する効果を検討したところ、BSP の転写は 両因子共に促進することが明らかになった。両因子に誘導される核内転写因子の同定は今後の課題である。ROS17/2.8 骨芽細胞様細胞および骨髄由来細胞では、ノーザンブロットの結果とルシフェラーゼアッセイの結果が、FGF2 と PDGF 刺激で一致しなかった。また、UMR106 細胞を用いた



ルシフェラーゼアッセイの結果は、ROS17/2.8 細胞の結果と異なり、両因子で刺激を行っても活性に変化が認められなかった。以上の結果から、異なる成長因子は異なる細胞内情報伝達系で BSP の転写を調節すること、骨芽細胞の分化程度が異なると、同じ成長因子に対して違った応答性を示すことが明らかになった。

### 1-3 歯の形態形成に関する研究グループ

幹細胞ニッチは幹細胞の特性を維持するためのシグナルを提供している微小環境と考えることができるが、ゲッ歯類の常生歯の場合、終生、歯の形成細胞を供給する場として apical bud を組織型幹細胞のニッチと位置づけることができた。そして、apical bud の形態学的研究を分子レベルの研究と対比させながら、シグナルセンターとしてのエナメルノットとその周囲に存在する FGF-10 の発現様式が形態決定に重要であることを明らかにした。また、エナメル質形成に関わる広範な研究から得られ、エナメル質形成の初期には ATF2 が成熟期には c-Jun などが重要で co-activator の CBP も関与していること、エナメル芽細胞はアポトーシスの原因となりうる Fas 抗原を一貫して発現しているが、この Fas は実際にはアポトーシスの誘導を引き起こさないこと、基質形成期と成熟期のエナメル芽細胞で PMCA と SERCA2 の2つのカルシウム ATPase が局在していることを示す知見を得たが、特に樹状細胞またはマクロファージが上皮幹細胞をふくむ未分化細胞の維持に関わっている可能性が示唆され、エナメル器の増殖期の場所である apical bud でもシスタチン C 陽性細胞の存在が明らかにされたことは、歯の形態形成に関する幹細胞の研究と関連するが、このように研究ユニット間での新しいテーマの創生は共同研究の観点からも非常に重要で、すぐれた点であるといえよう。また、ストレスタンパク質の一つ (HSP-25) の研究では、分化したエナメル芽細胞や象牙芽細胞がこのタンパクを持ち、機能発現に重要な役割を果たし、細胞増殖パターンとの相関を検索すると歯の構成細胞の増殖から分化のスイッチにも HSP-25 が重要な役割を果たすことが明らかになった。歯根形成においては多面的な作用を持つ因子として知られる IGF-I は、歯根形成後半にはヘルトビッヒ上皮鞘 (HERS) の伸長と基質形成に対しても促進作用を持つデータが得られつつある。一方、系統発生的に下等な脊椎動物更に化石種を含めて多くの動物についての歯の発生過程やエナメル質組織発生の研究が進み、立体構築像としてのデータが蓄積されたことは今後の研究の基礎となるものである。象牙質結晶の配向性や組成の関連性についての研究は歯の再生研究においてより自然な形態と機能を得るための結晶学的な取り組みの方向を示すものである。歯種の決定機構については、マウス遺伝子と相同の *Suncus* 遺伝子をクローニングして配列を決定し、*sFgf8*, *sBmp4*, *sShh* として DDBJ に登録し、それぞれの遺伝子の発現様式を比較したところ、E14 以後変化が見られたが、上顎と下顎では発現領域が異なることがわかった。このように種間での違いを詳細に調べることは多くの動物実験が行われるなかで、ヒトの歯の形態形成の特異性を明らかにする点で重要である。

## ＜問題点＞

当研究班には、形態学（解剖学）と機能研究（生化学および分子生物学）を担当するユニットの両方が含まれているが、その両者がもっと連絡し合う必要があると考える。そのためには、形態および機能を研究するユニットが1つの目標を定め、その目標の真理の追究のために、機能および形態の両面よりお互いに研究する必要があると考える。

### 1-1 口腔組織の分化・誘導に関する研究グループ

組織再生に関連する遺伝子の探索については、近年、再生医学に有用であることが判明し、実際に臨床応用が進められている骨髄由来間葉系幹細胞が注目されている。しかし、本研究ユニットでは主として歯周組織細胞に焦点を当てて研究を推進してきた。近年の体性幹細胞の考えから、歯髄細胞、骨髄間葉系幹細胞が再生医療に重要であると報告されつつあるが、本研究では進展していない。今後、歯髄細胞と骨髄間葉系幹細胞の研究が必要であろう。細胞培養系での実験から、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化に役立つような遺伝子群が、これまでの本研究によって同定できたが、動物実験による *in vivo* 系での実証はされておらず、今後、有用と認められた遺伝子産物の投与によって、実際に骨形成が誘導されるかどうかの細胞培養実験系での証明が必要である。NGFはPC12細胞の受容体であるTrkAに結合し神経突起を伸長させるが、PI3キナーゼ依存的なRac1の活性化とMAPキナーゼの関与が知られており、前者は数分以内におこる神経突起形成に関与し、後者は1時間以降の神経突起の長い伸長に必要であることがわかっている。bFGFはRac1との関与が報告されているが、詳細については不明である。

### 1-2 骨タンパク質に関する研究グループ

研究に供した材料はパラフィン固定・ギ酸脱灰されたものであるため、各種骨タンパク質に関する免疫組織化学的染色に対して、有用な結果を示さなかった。各材料が同一検索できていない。同一視点（免疫組織化学的検索、電顕による微細構造学的検索）による更なる検索が必要と考える。現在、頻繁に行われている分子生物学および生化学的方法（ノーザンブロット、ルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフト）のみでは、遺伝子発現調節のメカニズムを完全に明らかにすることは困難であり、免疫沈降法、クロマチン免疫沈降法、SiRNA、トランスジェニックマウス、ノックアウトマウス等の新規の方法を導入して、さらに転写調節のメカニズムを検索する必要がある。しかし、今までに行った研究の結果、骨シアロタンパク質（BSP）の転写の調節は、チロシンリン酸化とcAMPの両者により調節を受けていることが明らかになった。

### 1-3 歯の形態形成に関する研究グループ

歯の形成機構の研究には様々な取り組みが行われ、研究対象のレベルも、結晶、遺伝子、分子、細胞、組織構造、歯胚の形態そして細胞形態の変化、組織構造の変化、形成の場の問題、系統発生的なアプローチ等々多岐に渡っており、それぞれの分野における研究の進行状態もまた様々である。それぞれの成果を同じ目的のもとで議論し統合するには多くの困難が伴うが、全体から見て必要な研究領域の検討とお互いの協力が重要であり更に密接な連帯とそれを支えるしくみが必要である。例えば研究領域の問題では、歯根領域は歯胚周囲に歯根

膜と硬組織である歯槽骨に取り囲まれる複雑な環境を持つことから、実験発生学的研究が胎生期歯胚に比べ立ち遅れていることが指摘される。したがって本研究グループでは、研究集会でもこの領域の発展を目指した討論が展開されてきたがよりいっそうの協力と新しいテーマが求められよう。そのためにはまた、新たな実験手法の開発とその利用が必要となろう。胎生期歯胚の発生機序の解明に大きな役割を果たしてきた器官培養系を歯根形成期の器官培養系に応用した研究において、多くの情報が得られてきたのがよい例である。形態学的データとその解析においては、高度な画像処理と立体的な構築が行われてきたが、研究グループ内には各々の解析方法と表示方法の特徴を生かしての統一が図られるべきであろう。共通の変換プログラムの開発など他分野との新しい連帯の必要性も考えられる。また、新たな実験動物の開発も重要であることが指摘され、これまでのマウス、ラット以外に多くの種類が実験に供されてきた。しかし、どのような動物が目的とする実験系に合致するかを決定するにはより多くの情報の蓄積と交換が必要であり、まだまだ試行錯誤の状態が続いている。更に、系統発生学的観点から歯の形態形成を捉え他の研究分野との連携を探るといった試みについては、各種動物の遺伝子の配列を系統発生的に比較する研究、歯の組織構造を比較解剖学的に検索する試みは進展をみているが、まだ十分な成果をあげるに至っていないといえる。化石試料を含めて時系列的な検索を進める研究などには多くの制限がかかるものの、更なる方法の開発が求められよう。本研究グループは基礎的研究に重点をおいて研究が進められてきたが、最終の目標を再生医療の発展に置くならば臨床的な領域の研究との連携が必須であろう。この点は研究集会などの場でも必ずしも十分な議論がなされたとはいえない状況であった。残された大きな課題といえよう。

## ＜研究期間終了後の展望＞

再生医学の臨床応用，実用化に向けて骨髄由来間葉系幹細胞が研究対象として非常に重要である。また，最近では，歯の萌出前の歯嚢胞や歯根尖組織細胞中に有用性の高い幹細胞が発見され，実際に骨芽細胞への分化に成功したと報告されている。そこで，研究を継続し，歯嚢胞や歯根尖組織の幹細胞を応用した再生医学研究を行いたい。今後の研究方針としては，実際に幹細胞の存在の確認と，いろいろな分化過程の幹細胞株を樹立する。そして，目的とする種々の細胞にどのように分化させられるかを検討する。そのためには，幹細胞樹立株にSV40とテロメアー遺伝子の二重形質導入を試み，長期継代培養が可能な不死化細胞株を樹立することが必要である。本研究グループでは，すでに歯根膜細胞にテロメアー遺伝子のレトロウイルス感染による遺伝子形質導入系を応用してヒト歯根膜細胞の不死化細胞株を構築することに成功しており，性質の異なる種々の細胞株の樹立に成功している。正常ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて，骨芽細胞誘導培養系の培養下で，1-2日で紡錘形から敷石状に形態変化した。BMP 4の単独投与ではデキサメタゾン存在下で骨形成能が認められた。そして，デキサメタゾン添加下でBMP-2, 4, 7の3種の混合系がもっとも石灰化を増大させ，von Kossa染色によっても骨結節様の形成が確認できた。ヒト骨髄間葉系幹細胞に対して，高濃度のBMP-4単独でも軽度の骨形成が期待されるが，BMP-2, 4, 7が骨芽細胞への分化誘導，石灰化能の発現に効果が高いと示唆された。一方，妊娠時にカフェン摂取させたラット頭蓋骨から分離した骨芽細胞は骨結節の形成能が低下していること，胎盤細胞のAngiotensin II 2型受容体遺伝子の発現を増大させることを明らかにした。

骨芽細胞への骨髄間葉系幹細胞の分化過程に関与する遺伝子を解明するためにAffymetrix GeneChipシステムを用いて発現遺伝子を半網羅的に調べた。IGF-IIとIGFBP-2遺伝子は期待した通りヒト骨髄間葉系幹細胞の分化過程にしたがってmRNAレベルが増大していた。発現遺伝子の中に骨粗鬆症に有効と報告されているIGF-IIとIGFBP-2が見いだされた。これらの遺伝子発現を確認するために，リアルタイム・ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)およびエンドポイントPCR法で調べたところ，GeneChip解析結果と良く一致していた。このことからGeneChip解析法は，骨髄間葉系幹細胞の特異的細胞系列への分化を解明に有用であることが示唆された。ヒト骨髄間葉系幹細胞の分化促進と移植が骨再生療法に有用であることから，IGF-IIとIGFBP-2は，骨再生医療の骨形成促進物質として期待される。最近，骨粗鬆症ラットにIGF-IIとIGFBP-2の投与によって骨形成が促進されることが報告されており，動物実験を進めている。

顎・顔面領域の神経再生学的研究を先進的にかつ総合的に推進するには，神経関連細胞の分化・増殖に関与する条件，因子の同定が必要と考える。そこで，ヒト神経膠細胞(CCF-STTG1)を用い増殖能に対して，脳保護作用が報告されている静脈麻酔薬であるチオペンタールおよびプロポフォールを作用させた。結果，プロポフォールで増殖能抑制効果が示唆され，神経細胞の再生に関しては相反する効果と判断した。なお，アポトーシスを誘発したCCF-STTG1に対しては，プロポフォールは誘導傾向に，チオペンタールは抑制傾向に作用することも今回示唆された。

次に，神経細胞様に分化するラット副腎褐色細胞腫細胞であるPC12細胞を用いて神経突起伸長を促進する条件を探索した。PC12細胞は，血清存在下で培養すると増殖し，血清非存在下でNerve Growth Factor (NGF)が存在する環境では突起を伸長して神経細胞様に分化す

る。また、Fibroblast Growth Factors (bFGF) の存在する環境においても突起を伸長するといわれている。そこで、NGF および bFGF を同時に作用させ、神経突起の伸長に対する影響を確認した。結果、NGF50ng/ml+bFGF 5.0ng/ml 添加群は NGF50ng/ml 添加群と比較し、24 時間後において 1.26 倍の突起伸長が確認された。また、bFGF 5.0ng/ml 添加では 24 時間以内の突起伸長に大きな影響はなかった。以上より、NGF および bFGF の相加効果が示唆された。現段階では突起伸長に關与する遺伝子の探索までには至っていないが、今回の結果から NGF 及び bFGF の同時作用は再生医療に有用であった。

細胞の分化を決定するものは、以前は細胞外マトリックスであると考えられてきたが、核内に存在する転写因子が重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。当研究グループでは、歯周組織関連細胞の分化の過程で、どのような遺伝子が発現するかを検討することにより、将来の臨床応用の可能性を期待している。本プロジェクト終了後には、生検後に手術を行うこれら病変の症例に関しては、骨タンパク質の保持のための固定・脱灰液を工夫し、更には研究対象に悪性腫瘍の骨肉腫を追加し、検討を加える予定である。さらに、当プロジェクトは、新規転写因子の同定およびに BSP の転写調節機構解明等の目標があることから、研究の継続を行う予定である。研究にあたり、国内外の多くの研究者が協力者として参加し、RA として大学院生を中心とした若手研究者の参加・発表が行われ、今後さらなる発展が期待できる。特に、未分化な骨髄細胞培養系を臨床応用することは、近い将来可能になると、考えられる。

本プロジェクトには国内外の多くの研究者が協力者として参加しており、研究集会にも大学院生をはじめ多くの若手研究者の参加・発表が行われてきた。このような国際色の強いグループ編成にあつては主流となる研究テーマ以外にもそれぞれの国の実情を反映した多くの情報を直接に共有できるという効果がある。さらに、歯の再生研究を完成度の高いものにするためにはまだまだ息の長い研究が必要であり、次世代を担う若い研究者の確保は重要である。そのためには、魅力あるテーマと柔軟な組織体制、支援体制が求められ、本プロジェクトの遂行によって得られた経験をもとに新たな方法を取り入れて研究を継続することは新たな人材確保にとって有効である。これまでにない他分野との連携については、データの解析、表現を研究する分野があげらる。そして、臨床医学との接点を広げより実際的な研究のテーマを創設することが急務であり、この分野との連携は継続にあたっての重要な流れとなるものと考えられる。現在までの研究テーマから、継続にあたってのポイントとなる例がいくつかあげられている。例えば歯種の決定機構における遺伝子発現の場と機能の解明であるが、いくつもの仮説が提示されているにもかかわらず完全な一致は見られていない。仮説の検証と形態発現との関連の追求は正常な歯と歯周組織の再生には不可欠なテーマと思われる。また、組織型幹細胞のニッチと位置づけられた Apical bud の形態学的研究と分子生物学的研究においては、シグナルセンターとしてのエナメルノットとその周囲に存在する FGF-10 の発現様式が形態決定に重要性が指摘されたが、このような場をゲッ歯類の常生歯以外に求めて行く研究が再生医療においては必要である。さらに、エナメル質形成における転写因子、アポトーシス、カルシウム ATPase、樹状細胞とマクロファージに関する研究では多くの新知見を得たが、エナメル器の増殖期の場所である apical bud でもシスタチン C 陽性細胞が存在していることが指摘され、樹状細胞またはマクロファージが上皮幹細胞をふくむ未分化細胞の維持に関わっている可能性の追求はテーマ間の新たな協力関係の樹立と共に大きな展開が期待

される。また、歯根形成に関してはヘルトビツヒの上皮鞘に及ぼす IGF-I の影響について研究が進められてきたが、今後は対象を歯根形成期全域まで範囲を広げて詳細な検討を重ねる共に、他の成長因子の作用についても検索を進めることが求められよう。また、ストレスタンパク質などの多機能タンパク質はシャペロン機能、細胞骨格との相関、アポトーシスの抑制機能などが指摘されてきたが、今後それらの機能を直接解明する実験系が必要になる。それ以外の高分子の機能解析に大きな示差を与えるものと思われる。歯と歯周組織の形態形成を系統発生的に追求する試みは、広範な試料収集と協力体制が必要でありそこから新たな視点が生まれる可能性が期待される。

### <研究成果の副次的効果>

未分化間葉細胞から分化した細胞への分化の過程で、どの様な遺伝子が発現し、中心的な役割を果たすかを検索することにより、将来の創薬への可能性を有する。また、その分化過程で、どの様な遺伝子が発現するかを把握することにより、遺伝子治療の可能性も十分に考えられる。そして、再生医学に役に立つと思われる遺伝子の遺伝子産物を *in vivo* 系で投与することで再生を促進する療法を治験できると思われる。IGF-1/IGFBP2 投与がヒト骨髄間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を助けることが動物実験系でも効果が認められ、骨粗鬆症の治療にも大きな展開が期待される。また、本プロジェクトでの歯根再建医療用人工細胞外マトリックス代替材の開発との連帯で歯根再建医療における上顎洞内骨組織拡大などの再生医学応用研究にも活用できると考えられる。PC12 細胞を用いて神経突起伸長を促進する細胞培養条件を設定できたことからゲノムサイエンス先端技術を応用して、突起伸長に関与する遺伝子の探索を計画している。

骨タンパク質に関する研究内容には病的視点からの石灰化の研究も含まれるが、これらの結果を正常的石灰化と比較し、その相違を明確にすることにより、過剰な石灰化機構が硬組織欠損やインプラントなどの補填材への応用可能な副次的効果にもなるものとする。そして、患者血清を用いた骨髄細胞培養系にて、歯周組織再生誘導法を計画しているが、従来行われている骨髄細胞を骨芽細胞に分化誘導後に移植する方法ではなく、未分化な細胞を歯周組織に応用し、歯槽骨のみならず、歯根膜の再生も期待できる。