



# マルチシグナル分子を標的とする象牙質再生創薬基盤の確立 ー象牙芽細胞賦活シグナルネットワーク解析ー

## 1. 研究の目的

- (1) 正常マウスおよび象牙芽細胞「枯渇」マウスを用いて、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子と、その標的受容体を同定する。
  - ①象牙芽細胞分化誘導シグナルの同定と修復象牙質の形成促進 (Dmp1-T2A-Creマウスの特性解析) :象牙芽細胞と骨細胞で任意の遺伝子を破壊可能なDmp1-T2A-Creマウスの特性について評価を行った。
  - ②象牙芽細胞分化誘導シグナルの同定と修復象牙質の形成促進 (メカニカルストレスによる石灰化促進メカニズムの解析) :象牙質損傷に伴って発生すると思われるメカニカルストレスが硬組織の石灰化をどのように促進するのか分子レベルで解明を試みる。
- (2) 象牙芽細胞の機能を制御するシグナルに対して直接作用を有する次世代型薬剤の創出を行い、修復象牙質形成における象牙芽細胞シグナルとの機能連関を明らかにする。
- (3) 歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化機構を探索し、象牙芽細胞の分化を制御するシグナルネットワークを明らかにする。
  - ① 遺伝子改変マウスを用いて象牙芽細胞の細胞死誘導モデル系を構築し、象牙芽細胞の細胞死による象牙芽細胞分化および修復象牙質形成に及ぼす作用を調べる。
- (4) 量的/質的な硬組織解析を駆使することで、本研究にて薬物投与および時間的変遷によって新生/吸収した硬組織について定量評価を行う。

## 2. 研究の計画

- (1) 正常マウスおよび象牙芽細胞「枯渇」マウスを用いて、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子と、その標的受容体を同定する。
  - ① Dmp1-T2A-Creマウスの特性解析:各組織におけるCreリコンビナーゼの発現をqPCRを用いて詳細に解析を行う。またT2Aによるバイシストロン性の発現が正常に行われているかどうかについてタンパク質レベルで確認を行う。
  - ② メカニカルストレスによる石灰化促進メカニズムの解析:間葉系幹細胞へ伸展刺激を負荷し、その際の遺伝子発現から石灰化促進に関与する分子の同定を試みる。
- (2) 象牙芽細胞の機能を制御するシグナルに対して直接作用を有する次世代型薬剤の創出を行い、修復象牙質形成における象牙芽細胞シグナルとの機能連関を明らかにする。
  - ① 細胞膜センサータンパク質に作用し石灰化を誘導する候補物質を絞り込み、実験的  
形成窩洞に投与し、その薬理作用の濃度・時間依存性を検討する。
  - ② 象牙質石灰化前線の環境を維持すると考えられるイオン輸送系について検討する。
  - ③ 感覚受容細胞としての象牙芽細胞機能で誘発される象牙質形成を検討する。
- (3) 歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化機構を探索し、象牙芽細胞の分化を制御するシグナルネットワークを明らかにする。
  - ①修復象牙質形成促進機構の解析: Col1-Cre; flox-stop-flox-DTRマウスを作製する。ジフテリア毒素投与により象牙芽細胞の細胞死を誘導し、修復象牙質形成への影響を調べる。
- (4) 材料工学的指標を用いた骨質解析および  $\mu$ CT を用いた硬組織の超微細構造解析は、In vivo/Ex vivo における定量評価に適しており、周囲環境とマイクロ/ナノ構造特性との関連性を高い精度で予測する。

### 3. 研究の成果

(1) 正常マウスおよび象牙芽細胞「枯渇」マウスを用いて、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子と、その標的受容体を同定する。

① Dmp1-T2A-Creマウスの特性解析： qPCRの結果、Creリコンビナーゼの硬組織における高発現を確認した。脳および性巣における発現リークが認められたが、本研究の遂行には問題がないレベルであると判断した。また、硬組織においてDmp1およびCreタンパク質が独立した分子として存在していたことから、T2Aを用いたバイシストロン性の遺伝子発現機構が正常に機能している事が確認できた。

② メカニカルストレスによる石灰化促進メカニズムの解析： 間葉系幹細胞に対するメカニカルストレス刺激が線維芽細胞増殖因子の発現を亢進する事を発見した。線維芽細胞増殖因子に対する中和抗体存在下では石灰化が顕著に抑制したことから、メカニカルストレスは線維芽細胞増殖因子の発現亢進を介して石灰化を促進することが明らかとなった。

(2) 象牙芽細胞の機能を制御するシグナルに対して直接作用を有する次世代型薬剤の創出を行い、修復象牙質形成における象牙芽細胞シグナルとの機能連関を明らかにする。

① 細胞膜センサータンパク質に作用する物質を同定した。この物質は濃度依存的に象牙芽細胞による石灰化を促進した。

② 象牙芽細胞の陰イオン輸送を明らかにした。

③ 感覚受容細胞としての象牙芽細胞機能で誘発される象牙質形成を検討したところ、機械刺激誘発石灰機構に独特な調節機構が見出された。

(3) 歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化機構を探索し、象牙芽細胞の分化を制御するシグナルネットワークを明らかにする。

① 象牙芽細胞の細胞死を引き金とした修復象牙質形成機構の存在が明らかになった。

② 象牙芽細胞死にともない歯髄細胞の象牙芽細胞様細胞への分化が誘導された。

③ 象牙芽細胞死により誘導された象牙芽細胞様細胞は修復象牙質の形成に寄与した。

④ 象牙芽細胞死により、歯髄細胞における副甲状腺ホルモン(PTH)受容体の発現が上昇した。

⑤ PTHの投与により、象牙芽細胞死にともなう修復象牙質形成が促進した。

(4) 高撮像分解能(0.5 $\mu$ m)を有する $\mu$ CTを用いた構造解析により、造成/吸収した硬組織の定量解析を順調に進めている。硬組織の質的因子は、生体アパタイト(BAp)結晶配向性とコラーゲン線維の走行異方性を中心に検索を進めている。

### 4. 研究の反省・考察

(1) 正常マウスおよび象牙芽細胞「枯渇」マウスを用いて、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子と、その標的受容体を同定する。

① Dmp1-T2A-Creマウスの特性解析： 硬組織特異的Creマウスとして使い勝手の良いマウスシステムの開発に成功した事が確認できたため、早急に論文化を進める。また、レポーターマウスとの交配が遅れているが、こちらも早急に進める。

② メカニカルストレスによる石灰化促進メカニズムの解析： 硬組織の再生とメカニカルストレスを結びつける新たな分子メカニズムを発見する事ができた。引き続き本経路の標的分子やその発現制御機構について解析を進める。

(2) 象牙芽細胞の機能を制御するシグナルに対して直接作用を有する次世代型薬剤の創出を行い、修復象牙質形成における象牙芽細胞シグナルとの機能連関を明らかにする。

① 象牙質形成物質の実験的成窩洞への投与方法に苦勞しており、現在、材質などの検討を行っている。

(3) 歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化機構を探索し、象牙芽細胞の分化を制御するシグナルネットワークを明らかにする。

① DMP1-Cre ; flox-stop-flox-DTRマウスを用いた象牙芽細胞枯渇実験について： COVID-

19の感染拡大により、動物飼育環境が制限されたために交配・作出が遅れている。

(4) 新生硬組織はいずれも石灰化度が低く、 $\mu$ CT画像をもとに二値化したデータのみを用いた解析は困難であり、同一部位あるいは相当部位における薄切切片とのキャリブレーションが最重要事項になると考えている。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

①Watanabe K, Nakamura T, Onodera S, Saito A, Shibahara T, Azuma T. A novel GNAS-mutated human induced pluripotent stem cell model for understanding GNAS-mutated tumors. *Tumour Biol.* 2020 Sep;42(9):1010428320962588. doi: 10.1177/1010428320962588.

②Kubo, S., Yamaguchi, A., Matsunaga, S. An Analysis of 949 Cases of Condylar Process Fracture of the Mandible. *IOSR-JDMS*, 19(4):47-53, 2020. (DOI: 10.9790/0853-1904134753)

③Ohno T, Nakamura T, Nakae S, Morita H, Matsumoto K, Saito H, Takeda K, Okumura K, Azuma T. TSLP is a negative regulator of RANKL-induced osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Sep 24;530(3):508-512. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.05.055. Epub 2020 Jun 26.

④Sato M, Aoki H, Nakamura T, Onodera S, Yamaguchi A, Saito A, Azuma T. Effects of intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) on osteoblastic differentiation and mineralization of mouse induced pluripotent stem cells in a 3D culture model. *J Periodontal Res.* 2020 Oct;55(5):734-743.

⑤Onodera S, Saito A, Hojo H, Nakamura T, Zujur D, Watanabe K, Morita N, Hasegawa D, Masaki H, Nakauchi H, Nomura T, Shibahara T, Yamaguchi A, Chung UI, Azuma T, Ohba S. Hedgehog Activation Regulates Human Osteoblastogenesis. *Stem Cell Reports.* 2020 Jul 14;15(1):125-139. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.05.008. Epub 2020 Jun 11.

⑥Nakamura T, Nakamura-Takahashi A, Kasahara M, Yamaguchi A, Azuma T. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Apr 9;524(3):702-709. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.136. Epub 2020 Feb 5.

⑦Hosoya A, Nazmus S, Takebe H, Fujii S, Seki Y, Mizoguchi T, Shimo T, Iijima M, Irie K. Stem cell properties of Gli1-positive cells in the periodontal ligament

*Journal of Oral Biosciences*, 62(4):299-305, 2020

⑧Satomi Kamata, Maki Kimura, Sadao Ohyama, Shuichiro Yamashita, Yoshiyuki Shibukawa. Large-conductance Calcium-activated Potassium Channels and Voltage-Dependent Sodium Channels in Human Cementoblasts. *Front. Physiol.* 12: 634846. 2021. doi: 10.3389/fphys.2021.634846.

⑨Ofusa W, Yamada Y, Ishida R, Ohkubo M, Higashikawa A, Kimura M, Shibukawa Y. Use of barometric pressure and electromyography measurement techniques to elucidate the mechanisms by which bolus passes from the oral cavity to the oropharynx during swallowing. *Physiol Behav.* 226:113-115, 2020. doi: 10.1016/j.physbeh.2020.113115.

⑩溝口利英, 西田大輔、「顎骨疾患プロジェクトからの情報発信」13. 歯髄環境による破歯細胞の分化調節メカニズム。 *歯科学報*, 120(04):381-390, 2020

⑪Nango H, Kosuge Y, Sato M, Shibukawa Y, Aono Y, Saigusa T, Ito Y, Ishige K. Highly Efficient Conversion of Motor Neuron-Like NSC-34 Cells into Functional Motor Neurons by Prostaglandin E2 Cells, 9:E1741, 2020. doi: 10.3390/cells9071741.

- ⑫Nakamura-Takahashi, A., Tanase, T., Matsunaga, S., Shintani, S., Abe, S., Nitahata-Kasaharae, Y., Watanabe, A., Hirai, Y., Millánh, JL., Narisawa, S., Okada, T., Shimada, T., Yamaguchi, A., Kasahara, M. High-level expression of bone targeted alkaline phosphatase induced by adeno-associated virus vector ameliorates femur formation and mineralization in hypophosphatasia mice. *Calcif Tissue Int*, 106:665-677, 2020 (doi: 10.1007/s00223-020-00676-5).
- ⑬Kasahara, M., Matsunaga, S., Someya, T., Kitamura, K., Odaka, K., Ishimoto, T., Nakano, T., Abe, S., Hattori, M. Micro- and nano-bone analyses of the human mandible coronoid process and tendon-bone entheses. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 108(7):2799-2806, 2020 (doi: 10.1002/jbm.b.34609.).
- ⑭Matsunaga, S., Odaka, K., Kasahara, N., Kasahara, M., Kitamura, K., Yamada, M. Structural characteristics of newly formed osteon-like structure in peri-implant bone. *Jpn J Clin Biomech*, 41:393-398, 2020.
- ⑮Odaka, K., Matsunaga, S., Kitamura, K., Kasahara, M., Kasahara, N., Yamada, M. 3-dimensional alignment of biological apatite crystallites around dental implant in beagle maxilla. *Jpn J Clin Biomech*, 41:399-402, 2020.
- ⑯Kasahara, N., Odaka, K., Kitamura, K., Kasahara, M., Yamada, M., Matsunaga, S., Hashimoto M. Analysis of microstructure in capybara's femur. *Jpn J Clin Biomech*, 41:271-276, 2020.
- ⑰Kitamura, K., Odaka, K., Kasahara, M., Kasahara, N., Yamada, M., Matsunaga, S. Three-dimensional analysis of growth process in embryonic laryngeal cartilage *Jpn J Clin Biomech*, 41:413-418, 2020
- ⑱Sugahara, K., Koyama, Y., Koyachi, M., Matsunaga, S., Odaka, K., Kitamura, K., Nakajima, K., Matsuzaka, K., Abe, S., Katakura, A. Relationship between the immunohistological examination and fluorescence visualization of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*, 20(3):2153-2160, 2020 (doi: 10.3892/ol.2020.11772).
- ⑲Koyachi, M., Sugahara, K., Odaka, K., Matsunaga, S., Abe, S., Sugimoto, M., Katakura, A. The accuracy of Le Fort I osteotomy combined with CAD/CAM technology and Mixed Reality. *Int J Oral Maxillofac Surg*, S0901-5027(20)30378-7, 2020 (doi: 10.1016/j.ijom.2020.09.026)
- ⑳Nakajima, K., Matsunaga, S., Morioka, T., Nakano, T., Abe, S., Furuya, Y., Yajima, Y. Effects of unloading by tail suspension on biological apatite crystallite alignment in mouse femur. *Dent Mater J*, 39(4):670-677, 2020 (<https://doi.org/10.4012/dmj.2019-187>).
- ㉑Sugahara, S., Koyachi, M., Odaka, K., Matsunaga, S., Katakura, A. A safe, stable, and convenient three-dimensional device for high Le Fort I osteotomy *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 42(1):32, 2020 (doi: 10.1186/s40902-020-00276-1).
- ㉒Sugahara, K., Koyachi, M., Koyama, Y., Sugimoto, M., Matsunaga, S., Odaka, K., Abe, S., Katakura, A. Mixed Reality and 3 Dimensional Printed Models for resection of maxillary tumor. *Quant Imaging Med Surg*, 11(5):2187-2194, 2020. (doi: 10.21037/qims-20-597)
- ㉓Sugahara, K., Matsunaga, S., Yamamoto, M., Odaka, K., Koyachi, M., Koyama, Y., Michiwaki, M., Noguchi, T., Morita, S., Kasahara, N., Abe, S., Katakura, A. Retromandibular vein position and course patterns in relation to the mandible: anatomical morphologies requiring particular vigilance during sagittal split ramus osteotomy. *Anat Cell Biol*, 31; 53(4):444-450, 2020. (doi: 10.5115/acb.20.236)
- ㉔Tasaka, A., Okano, H., Odaka, K., Matsunaga, S., Goto, T., Abe, S., Yamashita S. Comparison of artificial tooth position in dentures fabricated by heat-curing and additive manufacturing. *Aust Dent J*, 2021 (in press). (doi: 10.1111/adj.12817)

## (2) 口頭発表

- ① Takashi Nakamura, Molecular mechanisms of craniosynostosis in Apert syndrome. 68th Annual meeting of Japanese association for dental research. 2020年11月8日
- ② 溝口利英, Cre/loxP遺伝子情報改変技術を用いた硬組織研究, 第50回公益社団法人日本口腔インプラント学会記念学術大会、Back To The Basics 2020年, 9月19日-30日
- ③ 溝口利英, Cre/loxP遺伝子情報改変技術を用いた間葉系幹細胞の分化機構の解明, 第62回歯科基礎医学会学術大会, アップデートシンポジウム6, 骨芽細胞・象牙芽細胞分化研究のNew Horizon, 2020年, 9月28日-10月4日
- ④ 溝口利英, In Vivo Dynamics of Dental Tissue Regeneration, 第63回国際歯科研究会 日本部会 総会・学術大会, Symposium III: Pathophysiological approach from oral function to systemic diseases, 2020年, 11月8日
- ⑤ 溝口利英, フェイトマッピング解析から明らかになった骨髄間葉系幹細胞が司る骨代謝調節機構, 第44回長崎骨粗鬆症研究会, 2021年2月25日
- ⑥ 溝口利英, フェイトマッピング解析から明らかになった骨髄間葉系細胞が司る骨代謝調節, 第35回骨代謝セミナー, 2021年5月28日
- ⑦ 西田大輔, 荒井敦, 宇田川信之, 中村美どり, 堀部寛治, 小林泰浩, 高橋直之, 溝口利英, 破歯/破骨細胞形成を負に制御する歯髄環境の解析, 第5回日本骨免疫学会ウインタースクール, 2020年1月24日, 軽井沢(Hotelマロウド), 第5回日本骨免疫学会ウインタースクールプログラム抄録集, 28, WST8, 2020
- ⑧ 溝口利英, 趙麗娟, 荒井敦, 堀部寛治, 細矢明宏, 岡部幸司, 進正史, 小林泰浩, 宇田川信之, 高橋直之, 象牙芽細胞の枯渇は象牙芽細胞の分化と石灰化を誘導する, 第38回日本骨代謝学会学術集会2020年10月9日-11日
- ⑨ 関有里, 建部廣明, 溝口利英, 飯嶋雅弘, 入江一元, 細矢明宏, Gli1陽性歯根膜細胞は矯正学的歯の移動時における骨形成に寄与する, 第18回日本口腔ケア学会 総会・学術大会, 2021年4月17日-18日、Web開催
- ⑩ Yuri Seki1, Hiroaki Takebe, Toshihide Mizoguchi, Masahiro Iijima, Kazuharu Irie, Akihiro Hosoya, Gli1-positive periodontal ligament cells differentiate into osteoblasts during orthodontic tooth movement. 第1回国際口腔ケア学会 総会・学術大会, 2021年4月17日-18日
- ⑪ Toshihide Mizoguchi, Depletion of odontoblasts induces dental tissue regeneration, The 48th annual meeting of the European Calcified Tissue Society (ECTS) 2021, 2021年5月8日、Web開催
- ⑫ 澁川義幸, What we can learn from the textbooks: 下顎運動の末梢性・中枢性神経制御機構と下顎位、シンポジウム6: 欠損歯列における咬合再構成 - 適正な咬合高径をどのように求めるか - 日本補綴歯科学会 第129回学術大会 令和2年6月27日-28日
- ⑬ Shibukawa, Y. Why do we feel a "toothache" with nerve free dentin: Sensory transduction mechanism in dentinal sensitivity based on the special architecture of dentin-pulp complex". Symposium 16: The mouth is the gate of happiness! Common Factors between Oral Senses and Whole Body. the 98th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Virtual Experience, March 28-30, 2021

## (3) 出版物

- ① Kato S., Sawatsubashi S., Yokoyama A., Nakamura T., Kouzmenko A. Mechanisms of Osteoprotective Actions of Estrogens. Encyclopedia of Bone Biology 1<sup>st</sup> Edition, Academic Press, 18<sup>th</sup> June, 2020.
- ② 澁川義幸, 新人もベテランも知りたい! SRPで痛みが生じるサイエンス、歯科衛生士、44 (11) : 24-32、2020
- ③ 澁川義幸, 急性炎症時はSRPの痛みを感じやすいのでしょうか。読者が本当に聞きたいこと、全部答えます。歯科衛生士、45 (6) : 84、2021