

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) 本申請は継続3年目である。初年度・継続2年目研究で得られた知見を更に発展させる。
 - ①歯髄幹細胞・iPS細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子および標的受容体の同定を行う。
 - ②象牙芽細胞の細胞膜センサータンパク質を活性化する物質のin Vivoでの象牙質再生効果を明らかにする。
 - ③象牙芽細胞の機能と分化を制御するシグナルネットワークに対する直接的な作用を有する次世代型象牙質再生薬剤の分子創薬基盤を確立する。

2. 研究の計画

- (1) 2年目から継続の研究：
 - ①歯髄幹細胞・iPS細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子の同定：iPS細胞から象牙芽細胞への分化を促す因子を同定する。また、象牙芽細胞を死滅させたマウスにおいて象牙芽細胞局所分化を促進する因子を特定する。
- (2) 継続3年度からの研究：象牙芽細胞の機能と分化を制御するシグナルネットワークに対する直接的な作用を有する次世代型象牙質再生薬剤の分子創薬基盤を確立する。
 - ①すでに見出している象牙芽細胞の細胞膜センサータンパク質を活性化し、細胞内酵素を触媒する物質（物質“X”）のin Vivoでの象牙質再生効果を、マイクロCT・組織化学イメージングを用いて評価する。

3. 研究の成果

- (1) 2年目から継続の研究：
 - ①歯髄幹細胞・iPS細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子の同定：マウス歯胚間葉系細胞で、象牙芽細胞分化に関与する候補転写因子を同定した（in Preparation）。これらを歯胚間葉系細胞に発現させ、歯胚間葉系細胞の象牙芽細胞形質発現を促進する、または形質脱分化を抑制する効果を検証した。
 - ②象牙芽細胞特異的に発現するdentin matrix protein-1 (DMP1) の遺伝子座にT2A配列とCre遺伝子を挿入しEGFPをレポーターとしたDmp1-T2A-Creノックインマウス系統を作製した。象牙芽細胞分化を追跡したところ、canonical Wnt/ β -cateninとfibroblast growth factor 8 (FGF8)シグナルが歯胚における象牙芽細胞分化に重要であることが示された（Kimura et al. 2022）。
 - ③象牙芽細胞の亜集団に着目した象牙芽細胞の発生学的起源の解析から、象牙芽細胞の局所分化因子と考えられる新規Z因子（未発表データの為具体的名称の表記を避ける）を推定した。歯髄細胞中にはZ因子を発現する細胞が存在し、歯髄内の未分化間葉系細胞から象牙芽細胞への分化マーカーであろうことが示唆された（in Preparation）。このZ因子を発現する細胞は、Aイオンチャネル（未発表データの為具体的名称の表記を避ける）と共陽性を示した（Z因子陽性Aチャネル陽性細胞）。加えて、ジフテリア毒素投与により象牙芽細胞の枯渇が誘発されたtype1(2.3kp)-collagen Cre/flox-stop-flox-difteria toxin receptor (DTR) マウス(Zhao et al. 2021)を用いた実験では、歯髄細胞稠密層にZ因子陽性細胞の増殖を認め、象牙芽細胞前駆マーカーであるNestinやAイオンチャネルと免疫陽性を認めた。
- (2) 継続3年度からの研究：象牙芽細胞の機能と分化を制御するシグナルネットワークに対

する直接的な作用を有する次世代型象牙質再生薬剤の分子創薬基盤を確立する。

①象牙芽細胞は高pHに感受性を持ち、象牙質形成を促進する(Kimura et al. 2016; Kimura et al. 2018)。そこで求電子反応性を有するイソチオシアネート (ITC) 基を有し、生体への安全性が高い「わさび (*Eutrema Japonicum*)」の抽出成分であるwasabi sulfinylの一つである6-MSITC (6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate) の象牙質形成能を検討した。6-MSITCは、象牙芽細胞による濃度依存的な石灰化を促進した。一方で6-MSITC存在下で、炭酸脱水酵素阻害薬を同時投与すると、6-MSITC単独投与による石灰化能が有意に減少した。加えて、6-MSITCによる石灰化は、細胞膜カルシウムイオン排出系である細胞膜カルシウムATPaseの阻害薬(Kimura et al. 2021)、ナトリウム-カルシウム交換体の阻害薬で有意に減少した。以上の結果から、6-MSITCは、細胞膜センサータンパク質の活性化をもたらし、細胞膜Ca²⁺/HCO₃⁻輸送を促進する結果、第3象牙質形成を促進することが示唆された(特許出願中)。本物質をラット臼歯に作成した窩洞に充填し、数週間後に、その第三象牙質形成能をマイクロCTで評価したところ、明らかな第3象牙質形成が観測された。本物質を臨床応用することで、目的とする象牙質再生分子創薬が確立できた。

4. 研究の反省・考察

(1) 2年目から継続の研究：

①歯髄幹細胞・iPS細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子の同定：同定された象牙芽細胞分化に関与する候補転写因子は、象牙質再生の標的物質候補としての可能性が高い。今後、in Vivoで動物の臼歯に作成した窩洞に充填し、その象牙質形成能を評価したい。

②発生学的な象牙芽細胞分化の本質的なマスター因子として、Wnt/ β -cateninとfibroblast growth factor 8 (FGF8)シグナルが同定された。同様に、今後、in Vivoで動物の臼歯に作成した窩洞に充填し、その象牙質形成能を評価したい。

③推定された象牙芽細胞の局所分化因子と考えられる新規Z因子は、象牙芽細胞の局所再生に関与する象牙芽細胞分化誘導マスター因子である可能性が示された。Z因子陽性細胞は象牙芽細胞直下に存在することから、歯髄損傷に伴う象牙芽細胞の局所分化(self-renewal)に関与するであろう。このことは、臨床的歯髄損傷時に、この物質を応用することで急速な第3象牙質形成が期待できる事を示唆している。象牙芽細胞の局所再生因子の解明は、臨床的な第3象牙質形成促進因子の創薬標的としての可能性が極めて高い。

(2) 継続3年度からの研究：象牙芽細胞の機能と分化を制御するシグナルネットワークに対する直接的な作用を有する次世代型象牙質再生薬剤の分子創薬基盤を確立する。

①6-MSITCは、細胞膜センサータンパク質の活性化をもたらし、細胞膜Ca²⁺/HCO₃⁻輸送を促進する結果、第3象牙質形成が促進されることが示された(特許出願中)。本物質を臨床応用することで、目的とする象牙質再生分子創薬が確立できた。今後、同物質を広く社会に還元することが急務であろう。

5. 研究発表

(1)学会誌等

①Inoue H, Kuroda H, Ofusa W, Oyama S, Kimura M, Ichinohe T, Shibukawa Y. Functional Coupling between the P2X₇ Receptor and Pannexin-1 Channel in Rat Trigeminal Ganglion Neurons. *Int J Mol Sci*. 22:5978. 2021. doi: 10.3390/ijms22115978.

②Kimura M, Mochizuki H, Satou R, Iwasaki M, Kokubu E, Kono K, Nomura S, Sakurai T, Kuroda H, Shibukawa Y. Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase in Rat and Human Odontoblasts Mediates Dentin Mineralization. *Biomolecules*. 2021 Jul 10;11(7):1010. doi: 10.3390/biom11071010.

- ③ Matsunaga M, Kimura M, Ouchi T, Nakamura T, Ohyama S, Ando M, Nomura S, Azuma T, Ichinohe T, Shibukawa Y. Mechanical Stimulation-Induced Calcium Signaling by Piezo1 Channel Activation in Human Odontoblast Reduces Dentin Mineralization. *Front Physiol.* 2021 Aug 24;12:704518. doi: 10.3389/fphys.2021.704518.
- ④ Odaka K, Sato S, Abe Y, Takizawa H, Matsunaga S, Takano N. Probabilistic finite element analysis of fatigue life of additively manufactured clasp. *Dent Mater J*, 41:286-294, 2021.
- ⑤ Matsumoto T, Matsunaga S, Kasahara M, Kasahara N, Nakano T, Ishimoto T, Nishii Y. Effect of sustained horizontal load on bone surrounding orthodontic anchor screws. *J Hard Tissue Biol*, 2021 (Accepted).
- ⑥ Kimura M, Saito A, Onodera S, Nakamura T, Suematsu M, Shintani S, Azuma T. The concurrent stimulation of Wnt and FGF8 signaling induce differentiation of dental mesenchymal cells into odontoblast-like cells. *Med Mol Morphol.* 2022 Mar;55:8-19.
- ⑦ Aoki H, Suzuki E, Nakamura T, Onodera S, Saito A, Ohtaka M, Nakanishi M, Nishimura K, Saito A, Azuma T. Induced pluripotent stem cells from Runx2-deficient mice show poor response to vitamin D during osteoblastic differentiation. *Med Mol Morphol.* in Press
- ⑧ Takada K, Odashima A, Onodera S, Saito A, Aida N, Furusawa M, Azuma T. Optimal Combination of Signaling Factors for Odontoblast Differentiation from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. *Med Mol Morphol.* in Press
- ⑨ Nakamura Y, Onodera S, Takano M, Katakura A, Nomura T, Azuma T. Development of a targeted gene panel for the diagnosis of Gorlin syndrome. *Int. J. Oral & Maxillo Surgery.* in press
- ⑩ Onodera S, Morita N, Nakamura Y, Takahashi S, Hashimoto K, Nomura T, Katakura A, Kosaki K, Azuma T. Orphanet J Rare Dis. 2021;16(1):443. doi: 10.1186/s13023-021-02033-7.
- ⑪ Okumura K, Shiwaki Y, Hamai R, Mizoguchi T, Tsuchiya K, Takahashi T, Suzuki O. Differentiation of committed osteoblast progenitors by octacalcium phosphate compared to calcium-deficient hydroxyapatite in Lepr-cre/Tomato mouse tibia. *Acta Biomater*, 2022, in press. doi: 10.1016/j.actbio.2022.02.016.
- ⑫ Nagashima T, Ninomiya T, Nakamura Y, Nishimura S, Ohashi A, Aoki J, Mizoguchi T, Tonogi M, Takahashi T. p53 deficiency promotes the regeneration of bone defect by functional regulation of mesenchymal stromal cells and osteoblasts. *J Bone Miner Metab*, 142:332, 2022. doi: 10.1007/s00774-022-01314-w.
- ⑬ Hiraga T, Ito S, Mizoguchi T. Opposing Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor on the Initiation and Progression of Breast Cancer Bone Metastases. *Mol Cancer Res*, 19(12):2110, 2021.
- ⑭ Wu JW, Jung Y, Yeh SA, Seo Y, Runnels JM, Burns CS, Mizoguchi T, Ito K, Spencer JA, Lin CP. Intravital fluorescence microscopy with negative contrast. *PLoS One*, 16(8):e0255204, 2021
- ⑮ Zhao L, Ito S, Arai A, Udagawa N, Horibe K, Hara M, Nishida D, Hosoya A, Masuko R, Okabe K, Shin M, Li X, Matsuo K, Abe S, Matsunaga S, Kobayashi Y, Kagami H, Mizoguchi T. Odontoblast death drives cell-rich zone-derived dental tissue regeneration. *Bone*, 150:116010, 2021
- ⑯ Mizoguchi T, Ono N. The diverse origin of bone-forming osteoblasts. *J Bone*

Miner Res, 36(8):1432, 2021

⑰ Islam S, Kitagawa T, Azuma T, Kuramitsu Y. *Anticancer Res.* 2021;41(10):4979-4984. doi: 10.21873/anticancerres.15311.

⑱ Ito S, Kasahara N, Kitamura K, Matsunaga S, Mizoguchi T, Htun MW, Shibata Y, Abe S, Takano M, Yamaguchi A. Pathological differences in the bone healing processes between tooth extraction socket and femoral fracture. *Bone Rep.* 16:101522. doi: 10.1016/j.bonr.2022.101522.

⑲ Tasaka 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*, 66(2):182-187, 2021.

⑳ Morita S, Moriishi T, Matsunaga S, Kitamura K, Abe S, Yamaguchi A. Characteristic Distribution of Hematopoietic Cells in Bone Marrow of *Xenopus Laevis*. *Bull Tokyo Dent Coll*, 8;62(3):171-180, 2021

㉑ Kusaba G, Matsunaga S, Kitamura K, Kasahara M, Shimoo Y, Abe S, Nakano T, Ishimoto T, Hikita A, Nojima K, Nishii Y. Micro/nanostructural characteristic changes in the mandibles of rats after injection of botulinum neurotoxin. *J Hard Tissue Biol*, 30(2):183-192, 2021 (doi.org/10.2485/jhtb.30.183).

㉒ Aoki K, Matsunaga S, Ito S, Shibahara T, Nomura T, Matsuzaki H, Abe S, Yamaguchi A. Persistent bone resorption lacunae on necrotic bone distinguish bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw from denosumab-related osteonecrosis. *J Bone Miner Metab*, 39: 737-747, 2021. (doi:10.1007/s00774-021-01223-4.)

㉓ Okamura M, Suzuki T, Oomura Y, Matsunaga S, Nomura T. Effect of bacterial infection on bone quality and structure in osteonecrosis of the jaw by Bisphosphonate (BP) administration. *J Hard Tissue Biol*, 30(3):323-330, 2021. (doi.org/10.2485/jhtb.30.323)

㉔ Kasahara N, Matsunaga S, Yamamoto M, Morita S, Odaka K, Abe S, Yamamoto H. Comparative study of the morphology and distribution of valves in the human retromandibular vein. *Bull Tokyo Dent Coll*, 4;62(2):99-106, 2021 (doi: 10.2209/tdcpublication.2020-0046.).

㉕ Otsu Y, Matsunaga S, Furukawa T, Kitamura K, Kasahara M, Abe S, Nakano T, Ishimoto T, Yajima Y. Structural characteristics of the bone surrounding dental implants placed into the tail-suspended mice. *Int J Implant Dent*, 7:89, 2021.

(2) 口頭発表：55 篇

(3) 出版物

① 澁川義幸 他, 歯痛制御から歯を再生誘導できるか: 歯髄/象牙質疾患への分子創薬の挑戦: 「歯髄」をめぐる基礎と臨床の架け橋 歯界展望, 138(6), 1120-1126, 202

② 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

③ 澁川義幸、生理学実習書 第3版、岩田幸一・井上富雄・船橋誠・加藤隆史・重村憲徳・篠田雅路・小野堅太郎編、医歯薬出版、2022、ISBN978-4-263-45869-3