

平成18年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 目 次

## 政策創薬総合研究

### 課題番号

KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二 …… 1
KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先 …… 12
KH23304	Toll様受容体 (TLR3) を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生 …… 26
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦 …… 37
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 …… 60
KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太 …… 66
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル …… 79
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一 …… 92
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディーの基礎的および応用的研究	川上浩司 …… 101
KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 …… 105
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴 …… 116
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介 …… 126
KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFcγ受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の 解明	藤室雅弘 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼニ量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

## 高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発

所属 国立長寿医療センター研究所 口腔疾患研究部  
研究者 庵原 耕一郎

研究要旨 歯の寿命を高めるために、抜髄後、免疫原性のない人工プロテオグリカンを根管内に充填し、根尖部歯周組織から血管を侵入させ歯髄を再生させる新しい治療法を開発する。これより、高齢者のQOLの向上、自立生活促進、医療・福祉経済の安定性にも寄与できる。

### A. 研究目的

齲蝕が深く歯髄にまで達している場合一般に抜髄が行われてきた。しかし歯髄は、修復象牙質形成による外来刺激の遮断というばかりでなく、知覚により齲蝕の進行を抑え、咬合感覚を与え硬いものを噛んで歯が破折することを防止する役割がある。また、代謝により象牙質蛋白質、水分を維持し、機械的強度、性質を保つ。免疫機能による感染防御機構の存在も知られている。歯内治療では根管形態の解剖学的複雑性から、完璧な抜髄、根管拡大・充填は不可能に近く、抜髄は後に根尖性歯周炎を導き、結果として歯を失う可能性も多いに秘めている。一方、高齢化社会においては歯の健康はますます重要性を帯びてくる。すなわち、歯の健康は食べることの楽しみ、生きがいにつながり、歯を失うとよく咬んで食感と味を楽しむこともできない。また、よく咬むことにより脳内刺激活性物質が分泌され認知症予防に役立つともいわれている。咬合不全は自立神経系や運動能力に支障をきたすこともある。高齢者の健康維持にはまず運動と食事が基本であることから、歯の健康が直結しているといえる。また、歯は発音や審美性に関係し、明るく豊かな社会生活を送るためにも重要である。したがって、歯の健康はQOLの向上に必須と考えられ、歯の寿命を高めるには歯髄をできるだけ保存する方法を開発する必要がある。私どもは生活歯髄切断面上に、Bone morphogenetic proteins (BMPs) を添加した歯髄幹細胞を移植し、切断面上の窩洞内に大量の象牙質を再生させることに成功した。しかしながら、歯髄炎が強度で疼痛を伴う場合には抜髄せざるをえない。

私共は以前よりブタ歯髄組織より Side Population (SP細胞)と呼ばれる細胞集団を分取し、自己複製能と多分化能を有することからこのSP細胞中に歯髄幹細胞が多く含まれる事を報告した。またSP細胞は象牙質再生に有効である事を明らかにした。一方、SP細胞はその局在性からperivascular originと考えられた。したがって、本研究ではまず、血管内皮前駆細胞および内皮細胞のマーカーであるCD31 およびCD146を用いてSP細胞をさらに分画し、血管および神経誘導能を検索し、歯髄再生に有効な歯髄幹細胞を検討する。次に、コア蛋白をホスファチジルエタノールアミンに代用して歯髄のグリコサミノグリカンを付着させる。これにより歯髄組織のものを模倣した免疫原性のない人工プロテオグリカンを作製する。さらに、I型およびIII型コラーゲンを組み合わせてゲル化し、抜髄後、歯髄幹細胞ならびに細胞成長因子とともに根管内に充填し、根尖部歯周組織から新たに血管を侵入させ歯髄組織を再生させる全く新しい治療方法を開発することを目的とする。

### B. 研究方法

ブタ歯髄CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup> SP細胞の分取  
ブタ歯胚より歯髄細胞を酵素分離後、Hoechst 33342 で70分ラベルし、さらにCD31-PE 及びCD146-FITC 抗体を1時間反応させた。フローサイトメーターにてHoechst 33342 を強く排出する画分(SP細胞)中のCD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup>、CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup>およびCD31<sup>-</sup>;CD146<sup>+</sup>細胞を分取した。それぞれの画分の形質維持に最適な培地および添加物を検討した。

### *in vitro* における増殖能および遊走能

VEGF-A (50ng/ml)を添加した EGM2 培地中に Tetra-color one®を加え、細胞数を 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 時間後に分光光度計で 450nm にて測定した。

遊走能を比較するために、24 well に PET-membrane を挿入し、 $5 \times 10^4$  細胞を播種し、well 内に 0, 5, 10, 100 ng/ml で VEGF-A 添加した DMEM 中で培養した。PET-membrane を通過した細胞を 0.2% trypsin-0.02% EDTA で剥離し、細胞数をカウントした。

### 軟骨、脂肪、神経、象牙質誘導能

CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞の軟骨、脂肪、神経誘導能を CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞と比較した。

軟骨誘導：5代目において、細胞数  $2.5 \times 10^5$  で CD31<sup>-</sup>; CD146<sup>-</sup> SP 細胞の pellet を形成し、通法に従い、10% 仔牛血清 Insulin-transferin-seleniteX, linoleic acid, BSA, dexamethason, L-ascorbic acid 2-phosphate, および 10ng/ml TGFβ3 を添加して三次元培養した。パラフィン切片を Alcian blue にて染色した。

脂肪誘導：細胞を 10% 仔牛血清を含む低グルコース DMEM 中でコンフルエントにした後、通法に従い、脂肪誘導処理を 3 ラウンド行った。7 日間維持培地で培養後、Oil Red O で染色した。

神経誘導：B27 supplement、EGF および bFGF を含む neurosphere medium (Neurobasal A) 中で 15 日間培養し、neurosphere を形成した。single suspension を作製し、laminin、fibronectin、L-glutamine、N<sub>2</sub> supplement、bFGF および EGF を含む neurodifferentiation medium 1 (Neurobasal A) で培養した。培地は 24 時間後に laminin、fibronectin、L-glutamine、N<sub>2</sub> supplement、neurotrophin-3 を含む neurodifferentiation medium 2 に交換した。14 日後、神経細胞の分化マーカーである neuromodulin (GAP-43) の免疫抗体染色を行った。

象牙質誘導：BMP2 存在下で 14 日間三次元培養を行い、*enamelysin* および *KLK4* mRNA 発現により象牙芽細胞への分化を確認した。また、基質形成能を検索した。

### 血管誘導能

EGM2 培地に VEGF を添加して血管内皮細胞への分化を誘導した。またマトリゲル上に播種し、管腔形成能を検索した。CEACAM1, vWF,

VE-cadherin, CD146 および occludin 抗体あるいは RNA probe を用いて蛍光抗体染色あるいは *in situ* hybridization を行い、血管内皮細胞への分化を確認した。内皮細胞の機能を示す ac-LDL 取り込みは、CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞 ( $10^4$  cells/ml) を EGM2 中で 14 日培養後、17 日および 21 日目で DiI-Ac-LDL を 2 時間添加し、蛍光顕微鏡下で観察した。また、内皮細胞のもうひとつの機能、ヒスタミンの添加による vWF の放出は、CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞を EGM2 中で 14 日培養後、37°C で 1 時間間 10 μM のヒスタミンを添加し、-20°C、2 分、メタノールで固定後、vWF 抗体で染色した。

### *in vivo* 血管新生能の検討

イヌ歯髄切断面上での歯髄再生

イヌ歯髄組織より CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞および CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞を分取した。3 代目の継代細胞  $2 \times 10^5$  を DiI で 15 分ラベル後、I 型コラーゲンを基質として pellet を形成し、24 時間後に歯髄切断面上に自家移植した。

(倫理面への配慮)

マウスの実験は国立長寿医療センター研究所の動物実験指針に従い、動物愛護を十分配慮し、完全全身麻酔下で無痛状態で行った。また、マウス歯髄マーカー遺伝子発現解析については当研究所の遺伝子組換え実験承認後行った。

### C. 研究結果

ブタ歯髄 CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞の分取

ブタ歯髄 SP 細胞中には CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup>、CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup>、CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup> の 3 つの画分がそれぞれ 50%、48%、2% の割合で含まれていた (Figs. 1A-B)。CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞は比較的長い突起を有する紡錘形態を呈し、CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞は内皮細胞様敷石形態を示していた。CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞は短い突起を有する不規則な形を呈していた。細胞表現型を維持する最適な培地および添加物を検討した。以後それぞれの画分においてこの最適な培地および添加物で培養を行った。

### 増殖能および遊走能

50 ng/ml の濃度で VEGF-A を刺激すると、CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup> 細胞は他の 2 画分と比較して非常に高い増殖能を示した (Fig. 2A)。

VEGF-A は濃度依存性に遊走を促進し CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞では CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> SP

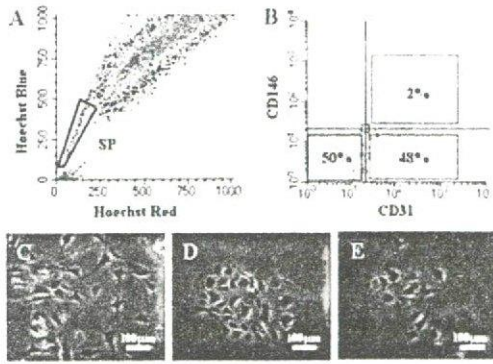


Figure 1.  $CD31^-;CD146^+;CD31^+;CD146^-$  および  $CD31^+;CD146^+$  SP 細胞のフローサイトメトリーによる分取  
 A. ブタ歯髄由来の SP 細胞。Hoechst33342 を抽出する画分 (SP) は全体の約 0.2%。  
 B. ブタ歯髄 SP 細胞を CD31 および CD146 抗体にてさらに分取。  
 $CD31^-;CD146^+;CD31^+;CD146^-;D31^+;CD146^+$  はそれぞれ 52%、48%、2% の割合で含まれる。  
 C.  $CD31^-;CD146^+$  SP 細胞, D.  $CD31^+;CD146^-$  SP 細胞, E.  $CD31^+;CD146^+$  SP 細胞の初代培養 7 日目。

細胞あるいは  $CD31^+;CD146^+$  SP 細胞に比べてより高い遊走能を有していた (Fig.2B)。

#### 軟骨、脂肪、神経、象牙質誘導能

$CD31^-;CD146^+$  SP 細胞は  $CD31^+;CD146^-$  SP 細胞に比べて強く軟骨細胞に誘導された (Figs. 3 A, B)。

脂肪への誘導能は  $CD31^-;CD146^+$  SP 細胞と  $CD31^+;CD146^-$  SP 細胞の間にあまり差はみられなかった (Figs. 3 C, D)。

$CD31^-;CD146^+$  SP 細胞に神経誘導を行うと neurosphere を形成し、さらに接着させて培養すると長い突起を伸ばし neuromodulin を発現していた。 $CD31^+;CD146^-$  SP 細胞を同様に神経誘導すると neuromodulin の発現は 1/3 以下の細胞にみられた (Figs. 3 E-H)。

$CD31^-;CD146^+$  SP 細胞に BMP2 による象牙質誘導を行うと 14 日後には *enamelysin* および *KLK4* mRNA を発現し、象牙芽細胞に分化していることが示唆された (Figs. 3 I-K)。

以上の結果より、 $CD31^-;CD146^+$  SP 細胞は  $CD31^+;CD146^-$  SP 細胞に比べて、より高い幹細胞活性を有することが示唆された。

#### 血管新生能

マトリゲル上で血管誘導を行うと

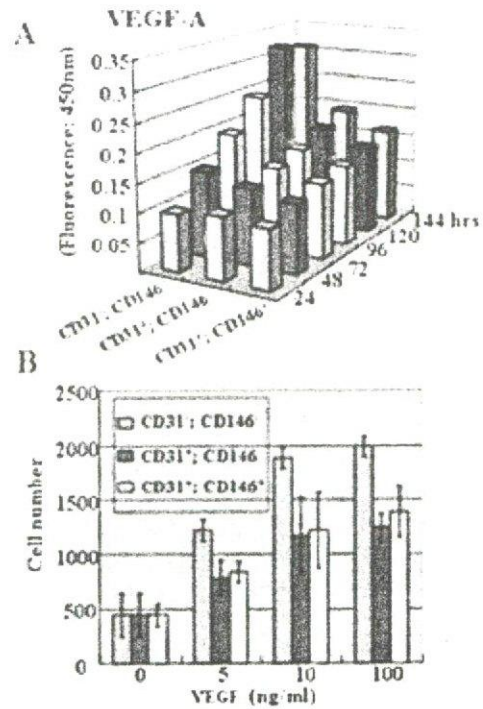


Figure 2.  $CD31^-;CD146^+$ ,  $CD31^+;CD146^-$ ,  $CD31^+;CD146^+$  SP 細胞の増殖能、遊走能の比較  
 $CD31^-;CD146^+$  SP 細胞は他の 2 画分と比較して高い増殖能(A)および遊走能(B)を示す。

$CD31^-;CD146^+$  SP 細胞は 24 時間後には網目状の管腔構造を呈した。 $CD31^+;CD146^-$  SP 細胞  $CD31^+;CD146^+$  SP 細胞は 24 時間後には網目状の管腔構造を呈した。 $CD31^-;CD146^+$  SP 細胞および  $CD31^+;CD146^+$  SP 細胞では明らかな管腔構造を形成しなかった (Figs. 4 A-C)。さらに 10 日後には  $CD31^-;CD146^+$  SP 細胞はマトリゲル内部に血管様構造を形成し (Fig.4D)、周囲の細胞は *CD31*, *CEACAMI*, および *occludin* mRNA の内皮細胞の分化マーカーを発現していた (Figs. 4 E-G)。

VEGF、bFGF 存在下で培養すると 10 日目には *CD31*, *vWF*, *VE-cadherin* の内皮細胞の分化マーカーを発現するようになった (Figs. 4 H-M)。

$CD31^-;CD146^+$  SP 細胞は、内皮細胞の機能的な性質であるヒスタミンによる *vWF* の放出 (Figs. 4 N, O) や *ac-LDL* の取り込み能を示した ((Figs. 4 P, Q)。

#### D. 考察

血管新生には遊走・増殖・内皮細胞への分化能を有する細胞が必要である。ブタ歯髄由来  $CD31^-;CD146^+$  SP 細胞は高い遊走・増殖能を示

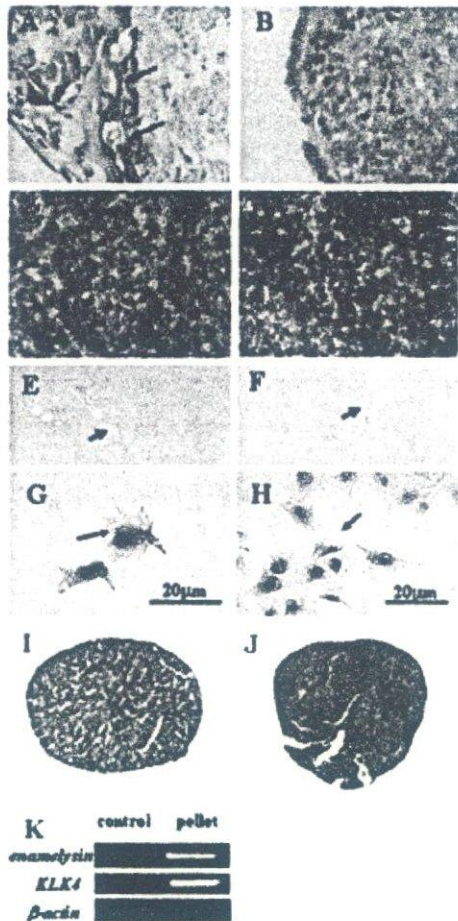


Figure 3. CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup>, CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup> SP 細胞の多分化能。

CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> (A)および CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup> SP 細胞(B)の軟骨誘導後 28 日目。CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> (C) および CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup> SP 細胞(D)の脂肪誘導後 21 日目。CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> (E, G)および CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup> SP 細胞(F, H)の神経誘導後 14 日目。neuromodulin による免疫染色(G, H)。CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> (I)および CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup> SP 細胞(J)の象牙質誘導後 14 日目(マッソントリクロム染色)。象牙質誘導後 14 日目の RT-PCR による象牙芽細胞分化マーカー *enamelysin*, *KLK4* mRNA の発現(K)。

し、血管、神経誘導能を有したことから、細胞導入法による歯髄再生の細胞源として有効である可能性が示唆された。現在、イヌの歯髄切断面上に CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup> SP 細胞を I 型コラーゲンとともに移植して、その切断面上における歯髄再生の検討を行っている。さらに来年度は、I 型、III 型コラーゲンおよび人工プロテオグリカン scaffold として、この CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup> SP 細胞を抜髄後の歯髄内に注

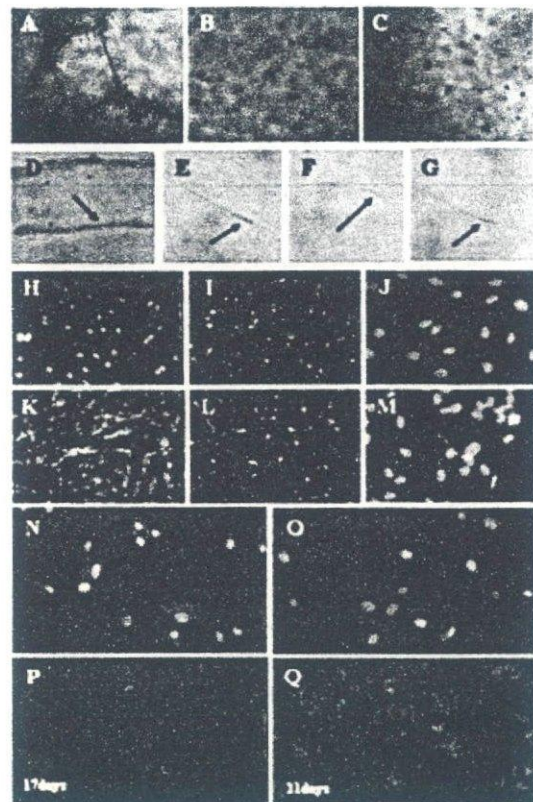


Figure 4. *in vitro* における CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞の血管誘導能の検索

マトリゲル上での血管誘導後 24 時間。CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> (A), CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup> (B), CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup> SP 細胞(C)。CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞マトリゲル上での血管誘導後 10 日目における *in situ* hybridization による内皮細胞の分化マーカー発現検索。CD31 (E), CEACAM1 (F), occludin (G)。VEGF, bFGF 存在下での血管誘導。蛍光抗体染色による内皮細胞の分化マーカー発現検索。培養 3 日目 CD31 (H), vWF (I), VE-cadherin (J)。培養 10 日目の CD31 (K), vWF (L), VE-cadherin (M)。VEGF, bFGF 存在下での血管誘導 14 日目。CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞のヒスタミンによる vWF の放出能の検索。ヒスタミンなし (N) 10ng/ml ヒスタミン添加 (O)。CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞の ac-LDL の取り込み能の検索。VEGF, bFGF 存在下での血管誘導 17 日目 (P)、21 日目 (Q)。

入し、歯髄全体を再生する方法の開発も行う予定である。

#### E. 結論

1. プタ歯髄 SP 細胞中には CD31<sup>-</sup>と CD31<sup>+</sup>が、ほぼ 1 : 1 で含まれ、前者は紡錘様、後者

は内皮細胞様形態であった。

2. CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup>は CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> および CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>+</sup> SP 細胞に比べ増殖能および遊走能が高かった。
  3. CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup>、CD31<sup>+</sup>;CD146<sup>-</sup> は象牙芽細胞への分化能を含む多分化能を有していた。
  4. CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞はマトリゲル上に播種すると、血管を新生した。VEGF 存在下で血管内皮細胞に分化し、ヒスタミン添加による vWF の放出および ac-LDL を取り込む血管内皮細胞の機能を有していた。
- 以上のことから CD31<sup>-</sup>;CD146<sup>-</sup> SP 細胞は細胞導入法による歯髄再生の細胞源として有効である可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M. The side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis and neurogenesis. *Stem Cells* 11: 2493-2503, 2006.
2. Nakashima M., Iohara K., Zheng L.: Gene therapy for dentin regeneration with bone morphogenetic proteins. *Current Gene Ther* 6: 551-560, 2006.

### 2. 学会発表

1. 庵原 耕一郎、松下 健二、引頭 毅、中島 美砂子. 歯髄 SP 細胞の分離と象牙質再生への有効性の検討 第 48 回歯科基礎医学会学術大会 横浜 2006. 9. 22
2. 庵原 耕一郎、松下 健二、中島 美砂子. 歯髄再生を目指した歯髄幹細胞 (CD31 陰性 SP 細胞) の血管新生能の検索. 日本歯科保存学会 鹿児島 2006. 11. 9
3. Nakashima M, Iohara K, Zheng L, Into T, Matsushita K Therapeutic Potential of CD31 Negative Dental Pulp SP Cells for Vasculogenesis in Dentin-Pulp Regeneration. The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting (San Diego, USA) 2006. 12. 13
4. 庵原 耕一郎、鄭 力、引頭 毅、松下 健二、中島 美砂子. 歯髄再生を目指した歯髄幹細胞 (CD31 陰性 SP 細胞) の血管新生能の検索 第 6 回日本再生医療学会総会 横浜 2007. 3. 14



---

平成18年度

政策創薬総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社