

歯髄再生治療法における遊走因子 bFGF の検討

竹 内 教 雄

愛知学院大学歯学部歯内治療学講座

(主任・指導：中村 洋教授)

愛知学院大学大学院歯学研究科博士（歯学）学位申請論文

**ALTERNATIVE MIGRATION FACTOR, BFGF IN STEM  
CELL THERAPY FOR PULP REGENERATION**

NORIO TAKEUCHI

Department of Endodontics,  
School of Dentistry, Aichi Gakuin University  
(Chief and Director : Prof. H.Nakamura)

The thesis submitted to the Graduate Faculty, School of Dentistry,  
Aichi Gakuin University for Ph. D. degree

## 目 次

I. 緒 言	1
II. 材料および方法	3
1. ヒト歯髄幹細胞分取	3
2. 細胞培養	4
3. 培養上清の調整	5
4. 遊走能、増殖能および抗アポトーシス作用の測定	5
5. 多分化能	6
6. マウス異所性歯根移植モデルにおける血管新生および歯髄再生	7
7. 再生歯髄組織の遺伝子解析	9
8. 統計学的解析	9
III. 結 果	10
1. <i>in vitro</i> における遊走因子の効果	10
2. 歯髄再生	12
3. 再生歯髄が歯髄であることの証明	13
IV. 考 察	13
V. 結 論	17
謝 辞	17
文 献	18

## I. 緒言

幹細胞移植による歯髄再生は、歯髄炎または根尖性歯周炎の治療のための有望なアプローチであり、歯の寿命を伸ばし、QOL (quality of life) の改善に役立つと考えられる<sup>1,2,3,4,5)</sup>。Iohara ら<sup>6)</sup>、Ishizaka ら<sup>7)</sup>は、これまで、イヌ抜髄後の根管内に幹細胞である歯髄 CD105<sup>+</sup>細胞または歯髄 CD31<sup>-</sup> side-population (SP) 細胞を SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) とともに移植し、歯髄を完全に再生させることに成功した。また、臨床応用をめざして、より安全性の高い歯髄膜分取細胞(MDPSCs)<sup>8)</sup>を医薬品である G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) とともに移植することによっても歯髄を完全に再生することに成功した<sup>9)</sup>。その再生メカニズムとして、G-CSF による周囲組織の幹細胞の遊走、増殖促進効果、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、血管新生促進作用および神経突起伸長効果が示唆されている<sup>8,9)</sup>。

一方、bFGF (basic fibroblast growth factor) はすでに熱傷や褥瘡の治療薬<sup>10)</sup>として製剤化され、アメリカ食品医薬品局 (FDA) や医薬品医療機器総合機構 (PMDA) によって承認されており、歯髄再生治療に臨床応用するための遊走因子の候補として安全面で有利と考えられる。また、bFGF は歯髄幹細胞に対して、*in vitro* における遊走促進作用<sup>11,12)</sup>、増殖促進作用<sup>12)</sup>、血管新生作用<sup>13)</sup>を有し、線維芽細胞に対して抗アポトーシス作用<sup>14,15,16)</sup>が知られている。また *in vivo* において bFGF はプラスミノゲン活性化因子の活性化<sup>17)</sup>により血管基底膜の溶解、血管内皮細胞の遊走および増殖<sup>18)</sup>、細管形成、毛細血管再生と

いう血管再生のために必要な反応を促進し<sup>19,20</sup>、肉芽組織形成促進作用を有することが知られている<sup>21</sup>。下肢虚血疾患モデルにおいては血流の回復が認められる<sup>22</sup>。また、耳介軟骨欠損モデルにおいて軟骨組織を誘導する<sup>23</sup>ことから、軟骨再生にも有効であることが示唆されている。さらに、骨折において、間葉系幹細胞の増殖および分化を促進することにより治癒を促進することが報告されている<sup>24</sup>。慢性虚血性心疾患に対しては、心筋由来幹細胞を bFGF とともに移植すると心機能が回復することが報告され、bFGF は移植細胞の生着率を向上させ血管新生を促進する効果を有することが示唆されている<sup>25</sup>。

一方、歯科領域においては、歯周疾患の歯槽骨欠損モデルの骨欠損部位へ bFGF を添加すると、歯根膜細胞に対して遊走、増殖が生じ、血管が新生され、骨組織の分化誘導による効果から歯周組織の再生が起こる<sup>26</sup>。bFGF を露髄面へ添加すると、血管組織の回復、歯髓細胞の遊走により歯髓組織の再生が起こり、その表面に新生象牙質が再生されると報告されている<sup>27</sup>。さらに歯髓再生に関しては、bFGF と NGF (nerve growth factor) あるいは BMP7 (bone morphogenetic protein 7) を混合し、抜髄したヒトの抜去歯根管内に注入し、異所性に移植すると、血管が新生され歯髓が再生されることから<sup>28</sup>、bFGF は歯髓再生に重要な細胞遊走作用を有することが示唆されている。また、bFGF のみを同様にヒトの抜去歯根管内に注入し、異所性に移植すると、細胞が侵入し結合組織が認められると報告されている<sup>29</sup>。

以上のように、bFGFはG-CSFと、遊走・増殖促進、血管新生、抗アポトーシス作用などの類似した作用を有することが示唆されている。Ioharaら<sup>9)</sup>はすでに、G-CSFを歯髄幹細胞とともに用いた歯髄再生治療法の非臨床研究の安全性および有効性試験に成功し、さらに現在臨床研究を開始している。しかしながら、これまで、bFGFと歯髄幹細胞の併用による歯髄再生に対する相加効果はいまだ明らかではない。よって、本研究の目的は、*in vitro*および*in vivo*におけるbFGFの効果とG-CSFと比較し、歯髄再生治療に用いる最適な遊走因子を検討することである。

## II. 材料および方法

### 1. ヒト歯髄幹細胞分取

同意を得た後にヒト第3大臼歯より即座に歯髄を摘出し、0.04 mg/ml リベラーゼ溶液 (Roche, Mannheim, Germany) で 37°C、1 時間酵素消化して歯髄細胞を分離し、10%ヒト血清 (同意を得た健常成人より採取) 含有の Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 培地に  $2-4 \times 10^4$  の細胞数で 35mm ディッシュ (Asahi Techno Glass Co., Chiba, Japan) 上に播種した。

膜遊走分取器としては、上部構造として、セルカルチャー・インサート (Polycarbonate Membrane) Transwell® Inserts を、下部構造として 24 well plate に挿入して用いた。ただし、膜は、細胞が接着しないように表面修飾処

理した。この表面処理は安全性を考慮し、医療機器承認されたものを用いた。この膜上部に、ヒト3代目歯髄細胞を  $1 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ l 播種し、下部構造体の24 well 中に10%ヒト血清を含むDMEM中に遊走因子G-CSF(Neutrogin®) (Chugai Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) を最終濃度が100 ng/mlになるよう入れ、48時間後に上部構造を取り除き24wellの培地を、10%ヒト血清含有DMEMに培地交換した。24 wellに付着した細胞数を位相差顕微鏡下で測定した。さらに培養して、70%コンフルエント後に継代した。この細胞をヒト遊走歯髄膜分取幹細胞(MDPSCs)として使用した。

なお、この研究は愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認(承認番号: AGUD291)を得て行われた。

## 2. 細胞培養

MDPSCsは10%ヒト血清含有DMEMにて培養した。ヒト歯根膜線維芽細胞(Human Periodontal Fibroblasts、PdLF)(clone 3F1611)はLonza(Muenchensteinerstrasse, Switzerland)より購入し、bFGF及びIGF含有のSCGM™ SingleQuots®(Lonza)にて培養した。骨髄由来間葉系幹細胞(Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell、BM)(clone JCRB1160)はヒューマンサイエンス研究資源バンク(Tokyo, Japan)より購入し、Powered By 10(GP bio science, Sapporo, Japan)にて培養した。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells、HUVEC)(clone 7F3415)はLonzaより購入し、10% fetal bovine serum (FBS)(Life

Technologies Co., Carlsbad, CA) 含有の EGM2 (Lonza) にて培養した。ヒト神経芽細胞腫 (human neuroblastoma cell, TGW) (clone JCRB 0618) はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入し、10%FBS 含有 DMEM にて培養した。全ての細胞は 37°C、5%CO<sub>2</sub> 湿潤下にて培養を行った。

### 3. 培養上清の調製

MDPSCs を、50% コンフルエントの状態にて無血清培地に変え、24 時間後、培養上清 (CM) として回収した。その上清を amicon ultra-15 centrifugal filter unit with ultracel-3 membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) にて約 25 倍に濃縮し、proteinase inhibitors (Halt™ proteinase inhibitor cocktail EDTA-free, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) に添加した。得られた CM は -80 °C にて保管した。CM 中のタンパク濃度は、BradfordUltra™ (Expedeon, Cambridge, UK) により定量した。CM は、細胞の出す trophic 効果と同様の効果をもつとされており、*in vitro* においてコントロールとして用いた。

### 4. 遊走能、増殖能および抗アポトーシス作用の測定

MDPSCs、HPdLF、BM、HUVEC、TGW の bFGF (Fiblast Spray®) (Kaken Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan)、G-CSF および CM に対する遊走能を比較するために、TAXIScan-FL (Effector Cell Institute, Kanagawa, Japan) を用いて解析を行った。TAXIScan-FL は、エッチングしたシリコン基板と平坦なガラスプレートから構成され、両者は、6 μm の深さのマイクロチャンネルを有す

る二つのコンパートメントを形成する。各細胞 ( $10^5$  cells/ml を  $1\ \mu\text{l}$ ) を、ステンレススチールホルダーを備えたデバイスが結合した単一の孔に注入し、 $10\ \text{ng}/\mu\text{l}$  の遊走因子  $1\ \mu\text{l}$  を一定濃度勾配が形成させるように反対側の孔に注入した。細胞遊走のビデオ画像を 24 時間にわたって撮影し、画像解析により遊走細胞数を測定した。

増殖能については、歯髄幹細胞 5 代目を 96 well に  $1 \times 10^3$  cells で播種し、DMEM 中に、最終濃度  $50\ \text{ng}/\text{ml}$  になるように bFGF、G-CSF あるいは CM (タンパク質濃度  $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を培地に添加し培養した。 $10\ \mu\text{l}$  の Tetra-color one® (Seikagaku Kogyo, Co., Tokyo, Japan) を 96 well plate に添加し、細胞数を 2、12、24、36、48 時間で経時的に吸光度 ( $450\ \text{nm}$ ) を測定した。細胞を含有しない条件を negative control とした。

抗アポトーシス作用に関しては  $500\ \text{nM}$  staurosporine (St) (Sigma-Aldrich) 含有 DMEM 中に、最終濃度  $100\ \text{ng}/\text{ml}$  の bFGF、G-CSF あるいは CM (タンパク質濃度  $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加し 3 時間作用させた。その後、Annexin V-FITC と propidium iodide (Roche) で 15 分反応させ、アポトーシス細胞を標識した後フローサイトメトリーにて測定した。

## 5. 多分化能

bFGF および G-CSF の分化促進作用 (血管内皮細胞分化促進作用、神経突起伸長促進作用、象牙質誘導促進作用) を比較した。

血管内皮細胞分化促進作用における bFGF および G-CSF の分化促進作用を



比較した。血管誘導培地として 5 µg/ml アスコルビン酸 (Lonza)、5 µg/ml ヘパリン (Lonza) および 5 µg/ml ハイドロコルチゾン (Lonza) 含有 DMEM 100 µl に最終濃度 100 ng/ml になるよう bFGF、G-CSF あるいは CM (タンパク質濃度 5 µg/ml) を加えたものを用意した。その培地で HUVEC を  $3 \times 10^3$  cells/100 µl になるよう懸濁し、matrigel™ (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) 上に播き培養した。1 時間および 5 時間後に、管腔形成を倒立顕微鏡を用いて観察した (Leica, 6000B-4, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)。また、管腔形成量は suit V3 software (Leica) を用いて測定した。

神経突起伸長促進作用は Murakami ら<sup>8)</sup>の方法で測定を行った。

象牙質誘導促進作用においては、象牙質分化誘導培地 (50 µg/ml アスコルビン酸、1mM リン酸および 10%FBS 含有 DMEM) 2 ml に最終濃度 100 ng/ml になるよう bFGF、G-CSF あるいは CM (タンパク質濃度 5 µg/ml) のいずれかを添加し、14 日間培養した。また、ポジティブコントロールとして 50 ng/ml BMP2 を添加した系にて行った。さらに、象牙質分化誘導を分子生物学的に解析するために象牙質誘導マーカーである *DSPP*, *enamelysin* の mRNA 発現を real-time RT-PCR にて解析した。

## 6. マウス異所性歯根移植モデルにおける血管新生および歯髄再生

ブタの歯根を長さ 6 mm に切断し、直径 1 mm 幅に拡大し、片側をリン酸亜鉛セメントにて封鎖した。最終濃度 15 µg/ml bFGF、G-CSF またはブタ遊走歯髄膜分取細胞 (5 代目) をコラーゲン TE (Nitta Gelatin, Tokyo, Japan) と混

合し、ブタ歯根の根管内に注入した。これらを 5 週齢の SCID マウス (CB17, CLEA, Tokyo, Japan) に皮下移植した。

移植 21 日後、移植歯を取出し、4%パラホルムアルデヒド (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan) にて 4°C で一晩浸漬固定し、Kalkitox™ (Wako, Osaka, Japan) にて 4°C で 1 週間脱灰した。縦断面 5 μm のパラフィン切片を作製し、HE 染色後、形態学的に観察した。サンプルにおける再生歯髓の相対量は、実体顕微鏡 (Leica, M 205 FA, Wetzlar, DE, USA) で歯の全体画像を取得し、測定した。

bFGF、G-CSF および細胞を移植したそれぞれ 3 本ずつの各歯について、150 μm の間隔をおいた 3 つのセクションを解析した。再生歯髓組織の輪郭をトレースし、根管におけるこの輪郭の表面積を、Leica Application Suite software を用いて解析した。根管面積に対する再生歯髓面積の比率は、各歯の 3 つのセクションそれぞれにおいて算出し、平均値を決定した。

再生歯髓面積における新生血管面積の比率は、蛍光顕微鏡 (Leica, TSC-SP5) 付属の Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) software (Leica) にて解析し、各歯の 3 つのセクションにおいて計算し、平均値を決定した。

再生歯髓組織の象牙芽細胞への分化を解析するために、*enamelysin* に対するプローブを用いて *in situ hybridization* を行った。イヌ *enamelysin* (195 bp) の cDNA を SpeI および NcoI でそれぞれ酵素処理し、線状にし、アンチセンスおよびセンスプローブを作製した。パラフィン切片をこれらのプローブと反応

させ、TSA キット (PerkinElmer, Boston, MA, USA) を用いて DIG シグナルは検出した。また、歯髄のマーカーである thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme (*TRH-DE*)<sup>30)</sup>を *in situ* hybridization にて確認した。

血管新生を解析するために、一次抗体マウス抗ラット Recl (Sanbio BV, Uden, The Netherlands) 及び二次抗体ビオチン化ウマ抗マウステキサスレッド (Vector, Burlingame, CA, USA) を用い免疫染色を行った。これらの標本は、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP5 倒立顕微鏡, Leica) を用いて観察し、LAS AF software を用いて、三次元構造を再構築した。

## 7. 再生歯髄組織の遺伝子解析

bFGF、G-CSF あるいは細胞を移植後 21 日間経過した合計 9 本の歯を使用し、Real-time RT-PCR にて解析を行った。それぞれの再生歯髄組織から RNA を抽出し、歯髄のマーカーである *TRH-DE* と、象牙芽細胞のマーカーである *enamelysin* を Real-time RT-PCR にて解析した。ネガティブコントロールとしてはコラーゲンのみ移植したものをを用いた。

なお、上記動物実験は愛知学院大学歯学部および国立長寿医療研究センターの動物実験指針に基づいて、動物実験倫理委員会の承認 (承認番号:AGUD156) を得て行われた。

## 8. 統計学的解析

データは平均±標準偏差で表した。統計処理には一元配置分散分析および多重比較テスト (*Tukey* 法) を用い SPSS 21.0 (IBM, NY, USA) にて解析した。

### Ⅲ. 結果

#### 1. *in vitro* における遊走因子の効果

これまで、歯髄再生のメカニズムとして、遊走因子は移植細胞のアポトーシスを抑制し、歯周囲組織から在来の幹細胞を根管内に遊走させ、増殖、アポトーシスを抑制し、さらに血管新生、神経突起伸長、象牙質再生を促すことが知られている。したがって、最初に *in vitro* において、遊走、増殖、抗アポトーシス、血管内皮分化、神経突起伸長および象牙質誘導作用に対する bFGF および G-CSF の作用を比較検討した。歯髄が再生する際には、歯根膜細胞、骨髄細胞、血管内皮細胞、神経細胞などの細胞が根管内に遊走してくると考えられるため、本研究では、歯根膜細胞として PdLF (ヒト歯根膜線維芽細胞、Human Periodontal Fibroblasts)、骨髄細胞として BM (骨髄由来間葉系幹細胞、Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell)、血管内皮細胞として HUVEC (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞、Human Umbilical Vein Endothelial Cells)、神経細胞として TGW (ヒト神経芽細胞腫、human neuroblastoma cell) を用いた。また、移植する歯髄幹細胞として MDPSCs (遊走歯髄膜分取細胞、Dental pulp stem cells mobilized by G-CSF) を用いた。

まず遊走促進作用に関して、TGW 以外の細胞で bFGF および G-CSF による遊走促進作用が認められた。MDPSCs、PdLF、BM および HUVEC において、CM、G-CSF、bFGF の順で遊走促進作用があった。また bFGF と G-CSF の遊

走促進作用には有意差はなく、CMと比較するとbFGFおよびG-CSFは有意に少なかった。増殖促進作用に関して、すべての細胞でbFGFおよびG-CSFによる増殖促進作用が認められた。すべての細胞においてCM、bFGF、G-CSFの順で増殖促進作用があった。またbFGFとG-CSFの間に有意差はなく、CMと比較するとbFGFおよびG-CSFは有意に少なかった。抗アポトーシス効果に関して、全ての細胞でbFGFおよびG-CSFによる抗アポトーシス効果が認められたものの、bFGFとG-CSFの間に有意差はなく、CMと比較するとbFGFおよびG-CSFは有意に少なかった。血管内皮細胞分化促進作用に関して、血管誘導培地（アスコルビン酸、ヘパリン、ヒドロコルチゾン含有DMEM）にbFGFおよびG-CSFを添加することで分化促進が認められた。CM添加群においても分化促進が認められたが、分化培地のみでは分化促進は認められなかった。管腔形成量を統計学的に解析すると、bFGFとG-CSFの間に有意差はなく、CMと比較するとbFGFおよびG-CSFは有意に少なかった。神経突起伸長促進作用において、TGWにGDNF（glial cell line-derived neurotrophic factor）を添加すると伸長促進作用があると言われており、本実験においても同様であった。GDNFにbFGFおよびG-CSFを添加した群は伸長促進作用が認められた。しかし、単体で添加した場合、促進作用がないことが認められた。神経突起伸長作用を統計学的に解析すると、bFGF添加群とG-CSF添加群の間に有意差は認められなかった。象牙質誘導促進誘導条件下において、誘導培地（アスコルビン酸、リン酸含有DMEM）にG-CSFを添加すると石灰化を促進

するが、bFGF を添加すると石灰化抑制効果が認められた。Real-time RT-PCR 解析においても bFGF では *DSPP*、*enamelysin* の発現は認められなかった。その他の添加群においては発現が認められた。

## 2. 歯髄再生

SCID マウスに移植した際の、各遊走因子での再生能を比較した。bFGF、G-CSF および MDPSCs の移植において、移植後 21 日目に歯髄様組織の再生が認められた。再生歯髄量を統計学的に解析すると、bFGF と G-CSF の間に有意差は認められなかったものの、MDPSCs を移植した場合、bFGF および G-CSF を移植した場合よりも有意に多かった。また、再生歯髄組織の細胞密度を統計学的に解析すると、bFGF と G-CSF の間に有意差は認められなかったものの、MDPSCs を移植した場合、bFGF および G-CSF を移植した場合よりも有意に多かった。標本を Recal で染色したところ、すべての移植において再生組織中に血管新生が生じていることが認められた。血管新生密度を統計学的に解析すると、bFGF と G-CSF の間に有意差は認められなかったものの、MDPSCs を移植した場合、bFGF および G-CSF を移植した場合よりも有意に多かった。再生組織中の *enamelysin* の発現はすべての移植において再生組織中に象牙芽細胞の新生が生じていることが認められた。象牙細管内への象牙芽細胞突起伸長が認められた。象牙質壁 1 mm 当たりの陽性細胞数を統計学的に解析すると、bFGF と G-CSF の間に有意差は認められなかったものの、MDPSCs を移植した場合、bFGF および G-CSF を移植した場合よりも有意に

多かった。

### 3. 再生歯髄が歯髄であることの証明

歯髄で高発現することが知られている *TRH-DE* の発現は、すべての再生組織において、正常な歯髄組織と比較して、同様に発現していることが認められた。Real-time RT-PCR において、bFGF、G-CSF および MDPSCs を移植したもののすべてに *TRH-DE* の発現が認められた。また、象牙芽細胞マーカーである *enamelysin* も移植したもののすべてに発現が認められた。

## IV. 考察

FGF は、線維芽細胞に対して増殖活性を有する因子として精製された因子である<sup>31)</sup>。FGF シグナルは、組織の修復及び再生に対して重要な役割を有することが知られている。bFGF は未分化間葉系細胞に対して強い血管誘導作用および増殖促進作用を有する<sup>32)</sup>。特に血管新生作用は、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) や血小板由来成長因子 (PDGF) などの血管形成因子よりも高いとされている<sup>33)</sup>。bFGF は発生期から成熟期に至るすべての過程において広く発現されている。中枢神経系の発達期間に、神経発生、軸索成長と分化に重要な役割を果たし<sup>34)</sup>、また、成人の脳の機能維持にとっても重要である<sup>35)</sup>。FGF は、FGFR2b、3b を除く全ての FGFR に結合することが明らかとなっており<sup>36)</sup>、様々な細胞種に効果を示していることが明らかにされている。リコンビナントヒト bFGF は製薬として、皮膚、骨・軟骨、心筋、歯周など様々な治療へ

の開発が進んでいる。日本では bFGF は褥瘡性潰瘍に対しすでに使用されている<sup>10)</sup>。bFGF は血管形成<sup>19,20)</sup>と線維芽細胞の増殖を促進し、創傷治癒の初期段階に傷の欠損部位を補填する肉芽組織形成を促進する<sup>21)</sup>。bFGF は組織再構成の際に、細胞の遊走に直接作用する。臨床研究としては、bFGF はすでに、骨折<sup>24)</sup>や歯周組織再生治療<sup>26)</sup>に用いられている。

一方、G-CSF はサイトカインの一種で、骨髄系前駆細胞の増殖、分化、生存などを促進することが知られている<sup>37)</sup>。G-CSF は骨髄幹細胞や成熟好中球に対して動員作用を有することから、現在、臨床において化学療法後の好中球減少症や造血幹細胞移植などの際に製薬として広く用いられている。また、急性心筋梗塞モデルにおいては、G-CSF はアポトーシスを抑制し、骨髄幹細胞や血管内皮前駆細胞を動員させることにより血管新生を促進させ、心機能低下を抑制することが報告されている<sup>38)</sup>。さらに、G-CSF は心筋細胞の増殖を促進することが知られている<sup>39)</sup>。造血幹細胞が G-CSF 投与により動員されるメカニズムは、交感神経から放出されるカテコールアミンが骨細胞や骨芽細胞を抑制し、骨芽細胞ニッチから幹細胞が放出されやすくなるためと考えられている<sup>40)</sup>。

したがって、bFGF と G-CSF は、間葉系幹細胞に対して類似した作用を持つ可能性が示唆されるため、本研究においては、歯髓再生に対する最適な遊走因子を検討するために、*in vitro* および *in vivo* の両方において bFGF の効果を G-CSF と比較した。

*in vitro* において、本研究では、bFGF、G-CSF とともに、歯髓幹細胞である



MDPSCs、歯根膜由来である PdLF、骨髄由来である BM、および血管内皮由来である HUVEC に対して、遊走促進、増殖促進および抗アポトーシス作用を有し、その効果に有意な差がないことを明らかにした。また、神経前駆細胞の性質を有する TGW に対して bFGF および G-CSF の増殖促進および抗アポトーシス作用を明らかにした。さらに、bFGF、G-CSF ともに、HUVEC に対して血管内皮細胞分化促進作用を有し、また TGW に対して神経突起伸長促進作用を有することを明らかにした。これまで bFGF の遊走促進および増殖促進作用は、歯髄細胞に対して知られており<sup>12)</sup>、抗アポトーシス作用は線維芽細胞に対して知られていた<sup>14,15,16)</sup>ように、bFGF が血管内皮細胞分化促進作用<sup>41)</sup>、および神経突起伸長促進作用<sup>42)</sup>を有することは知られていた。しかしながら、本研究のように、様々な細胞に対する bFGF と G-CSF の種々の作用を同時に比較検討した研究は未だ報告されておらず、また bFGF と G-CSF の *in vitro* における作用が類似しているという報告も他にない。

また、本研究では、*in vivo* における bFGF および G-CSF の再生能を異所性歯根移植モデルを用いて比較した。これまで、異所性歯根移植モデルにおいて、bFGF を用いて歯髄再生を試みた研究が報告されているが<sup>28,29)</sup>、再生組織が歯髄であることを形態学および分子生物学的に明らかにした報告はない。また、*in vivo* において、bFGF と G-CSF の歯髄再生に対する効果を比較した報告はない。本研究では、異所性歯根移植モデルにおいて再生組織量、再生組織内細胞密度、血管新生密度および象牙芽細胞数に有意差はみられなかった。また、

歯髄マーカーの *TRH-DE*<sup>30)</sup> の mRNA 発現に有意差がないことから、再生された組織は歯髄でありその質的差はないことが明らかとなった。Iohara<sup>9)</sup> は、すでに、実際の歯内治療に類似したイヌの抜髄後根管内に歯髄幹細胞と G-CSF を移植して歯髄を再生させることに成功している。以上のことから、根管治療後の歯髄再生治療に用いる遊走因子として、bFGF は G-CSF の代替として使用できる可能性が示唆される。今後さらに、イヌ抜髄後歯髄再生モデルに歯髄幹細胞と bFGF を移植し、歯髄幹細胞と G-CSF の移植の場合と比較して、再生される歯髄組織を質的および量的に、さらに歯髄組織の経時的変化も検討する必要がある。

さらに、象牙質誘導に関しては、*in vitro* において bFGF は歯髄幹細胞の石灰化を抑制したが、G-CSF は石灰化を促進するという相反作用がみられた。象牙質マーカーである *DSPP* および *enamelysin* の mRNA 発現においても同様の所見が得られた。この *in vitro* における bFGF の石灰化抑制作用は Morito<sup>43)</sup> によっても報告されている。一方 *in vivo* においては、G-CSF と同様に、象牙質側壁に沿って分化した象牙芽細胞が観察された。これは、*in vitro* と *in vivo* における違いによるものと考えられる。最近の研究では、微小環境が幹細胞へ影響を及ぼし、分化誘導することが報告されている<sup>44)</sup>。よって、歯の微小環境が象牙質への分化を促進している可能性があり、象牙質の中に含まれる可溶性のタンパク質<sup>45,46)</sup>や、DMP1 などの非コラーゲン性タンパク質<sup>47)</sup>の関与が示唆されるが詳しいメカニズムは不明である。

## V. 結論

本研究は、歯髄再生治療時に用いる最適な遊走因子を検討するため、*in vitro* および *in vivo* における bFGF の効果を G-CSF の効果と比較し、以下の結論を得た。

- 1) *in vitro* において、bFGF および G-CSF において遊走促進作用、増殖促進作用、抗アポトーシス作用、血管内皮細胞分化促進作用、神経突起伸長促進作用において有意な差は認められなかった。
- 2) *in vivo* において、bFGF および G-CSF において歯髄再生能に有意な差は認められなかった。

以上より、歯髄再生治療法に用いる遊走因子として、bFGF も G-CSF と同様に有用であると考えられる。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し御指導を賜りました愛知学院大学歯内治療学講座中村洋主任教授、国立長寿医療研究センター歯科口腔先進医療開発センター再生歯科医療研究部中島美砂子部長に深く感謝いたしますと共に、ご協力いただいた先生方に心から御礼申し上げます。

なお本論文の要旨は、第 137 回日本歯科保存学会秋季学術大会（平成 24 年 11 月 22 日、広島市）、第 9 回世界歯内療法会議（平成 25 年 5 月 26 日、東京）、第 139 回日本歯科保存学会秋季学術大会（平成 25 年 10 月 17 日、秋田市）にて発表した。

### 引用文献

- 1) Nakashima M, Akamine A: The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J. Endod*, **31**(10): 711-718, 2005.
- 2) Nakashima M, .George T.- J.Haung: Pulp and dentin regeneration. *Stem cells in Craniofacial development and regeneration*. Wiley Online Library, (Hoboken, NJ, USA), 459-482, 2013.
- 3) Nakashima M, Iohara K, Murakami M: Dental pulp stem cells and regeneration. *Endodontic Topics*, **28**(1): 38-50, 2013.
- 4) Murray PE, Godoy FG, Hargreaves KM: Regenerative endodontics: A review of current status and a cell for action. *J. Endod*, **33**(4): 377-390, 2007.
- 5) Hargreaves KM, Geisler T, Henry M, Wang Y: Regeneration potential of young permanent tooth: What does the future hold?. *J. Endod*, **34**(7): 51-56, 2008.

- 6) Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, Watanabe A, Nabekura J, Ito M, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M: Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A*, **17**(15-16): 1911-1920, 2011.
- 7) Ishizaka R, Hayashi Y, Iohara K, Sugiyama M, Murakami M, Yamamoto T, Fukuta O, Nakashima M: Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp. *Biomaterials*, **34**(8): 1888-1897, 2013.
- 8) Murakami M, Horibe H, Iohara K, Hayashi Y, Osako Y, Takei Y, Nakata K, Motoyama N, Kurita K, Nakashima M: The use of granulocyte-colony stimulating factor induced mobilization for isolation of dental pulp stem cells with high regenerative potential. *Biomaterials*, **34**(36): 9036-9047, 2013.
- 9) Iohara K, Murakami M, Takeuchi N, Osako Y, Ito M, Ishizaka R, Utsunomiya S, Nakamura H, Matsushita K, Nakashima M: A novel combinatorial therapy with pulp stem cells and G-CSF for total pulp regeneration. *Stem Cells Trans Med*, **2**(7): 521-533, 2013.
- 10) Akita S, Akino K, Imaizumi T, Hirano A: Basic fibroblast growth factor accelerates and improves second-degree burn wound healing. *Wound Repair Regen*, **16**(5): 635-641, 2008.

- 11) Howard C, Murray PE, Namerow KN: Dental pulp stem cell migration. *J Endod*, **36**(12):1963-1966, 2010.
- 12) Shimabukuro Y, Ueda M, Ozasa M, Anzai J, Takedachi M, Yanagita M, Ito M, Hashikawa T, Yamada S, Murakami S: Fibroblast growth factor-2 regulates the cell function of human dental pulp cells. *J Endod*, **35**(11): 1529-1535, 2009.
- 13) Mullane EM, Dong Z, Sedgley CM, Hu JC, Botero TM, Holland GR, Nör JE: Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. *J Dent Res*, **87**(12): 1144-1148, 2008.
- 14) Jin X, Beck S, Sohn YW, Kim JK, Kim SH, Yin J, Pian X, Kim SC, Choi YJ, Kim H: Human telomerase catalytic subunit (hTERT) suppresses p53-mediated anti-apoptotic response via induction of basic fibroblast growth factor. *Exp Mol Med*, **42**(8): 574-582, 2010.
- 15) Akasaka Y, Ono I, Kamiya T, Ishikawa Y, Kinoshita T, Ishiguro S, Yokoo T, Imaizumi R, Inomata N, Fujita K, Akishima-Fukasawa Y, Uzuki M, Ito K, Ishii T: The mechanisms underlying fibroblast apoptosis regulated by growth factors during wound healing. *J Pathol*, **1**(3): 285-299, 2010.
- 16) Liu J, Xu X, Feng X, Zhang B, Wang J: Adenovirus-mediated delivery of bFGF small interfering RNA reduces STAT3 phosphorylation and

induces the depolarization of mitochondria and apoptosis in glioma cells U251. *J Exp Clin Cancer Res*, **30**(1): 2011.

- 17) Presta M, Moscatelli D, Joseph-Silverstein J, Rifkin DB: Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol Cell Biol*, **6**(11): 4060-4066, 1986.
- 18) Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G: Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev*, **8**(2): 95-114, 1987.
- 19) Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science*, **235**(4787): 442-447, 1987.
- 20) Saksela O, Moscatelli D, Rifkin DB: The opposing effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta on the regulation of plasminogen activator activity in capillary endothelial cells. *J Cell Biol*, **105**(2): 957-963, 1987.
- 21) Okumura M, Okuda T, Nakamura T, Yajima M: Effect of basic fibroblast growth factor on wound healing in healing-impaired animal models. *Arzneimittelforschung*, **46**(5): 547-551, 1996.
- 22) Nitta N, Nitta-Seko A, Sonoda A, Watanabe S, Tsuchiya K, Murata K,

- Tabata Y: Vascular regeneration by pinpoint delivery of growth factors using a microcatheter reservoir system in a rabbit hind-limb ischemia model. *Exp Ther Med*, **4**(2): 201-204, 2012.
- 23) Morotomi T, Wada M, Uehara M, Enjo M, Isogai N: Effect of local environment, fibrin, and basic fibroblast growth factor incorporation on a canine autologous model of bioengineered cartilage tissue. *Cells Tissues Organs*, **196**(5): 398-410, 2012.
- 24) Kawaguchi H: [Bone fracture and the healing mechanisms. Fibroblast growth factor-2 and fracture healing]. *Clin Calcium*, **19**(5):653-659. 2009
- 25) Takehara N: Cell therapy for cardiovascular regeneration. *Ann Vasc Dis*; **6**(2): 137-144, 2013.
- 26) Murakami S: Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol 2000*, **56**(1): 188-208, 2011.
- 27) Ishimatsu H, Kitamura C, Morotomi T, Tabata Y, Nishihara T, Chen KK, Terashita M: Formation of dentinal bridge on surface of regenerated dental pulp in dentin defects by controlled release of fibroblast growth factor-2 from gelatin hydrogels. *J Endod*, **35**(6):858-865, 2009



- 28) Kim JY, Xin X, Moioli EK, Chung J, Lee CH, Chen M, Fu SY, Koch PD, Mao JJ: Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Eng Part A*, **16**(10):3023-3031, 2010.
- 29) Suzuki T, Lee CH, Chen M, Zhao W, Fu SY, Qi JJ, Chotkowski G, Eisig SB, Wong A, Mao JJ: Induced migration of dental pulp stem cells for in vivo pulp regeneration. *J Dent Res*, **90**(8): 1013-1018, 2011.
- 30) Yamamoto T, Murakami M, Ishizaka R, Iohara K, Kurita K, Nakashima M: Identification of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH)-Degrading Enzyme as a Biomarker for Dental Pulp Tissue. *Dentistry*, **2**:1, 2012.
- 31) Burgess WH, Maciag T: The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem*, **58**: 575-606, 1989.
- 32) Suga H, Eto H, Shigeura T, Inoue K, Aoi N, Kato H, Nishimura S, Manabe I, Gonda K, Yoshimura K: IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Stem Cells*, **27**(1): 238-249, 2009.
- 33) Cao R, Bråkenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P, Cao Y: Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and

- FGF-2. *Nat Med*, **9**(5):604-613, 2003.
- 34) Reuss B, von Bohlen und Halbach O: Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res*, **313**(2):139-157, 2003.
- 35) Zechel S, Werner S, Unsicker K, von Bohlen und Halbach O: Expression and functions of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in hippocampal formation. *Neuroscientist*, **16**(4): 357-373, 2010.
- 36) Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A: Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*, **7**(3): 165-197, 2000.
- 37) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, **410**(6829): 701-705, 2001.
- 38) Takano H, Qin Y, Hasegawa H, Ueda K, Niitsuma Y, Ohtsuka M, Komuro I: Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *J Mol Med (Berl)*, **84**(3): 185-193, 2006.
- 39) Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, Hattori F, Tanaka T, Hara M, Ohno Y, Chen H, Egasgira T, Seki T, Yae K, Koshimizu U, Ogawa S, Fukuda K: G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo

- and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell*, **6**(3): 227-237, 2010.
- 40) Asada N, Katayama Y, Sato M, Minagawa K, Wakahashi K, Kawano H, Kawano Y, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Tanimoto M: Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Stem Cell*, **12**(6): 737-747, 2013.
- 41) Marui A, Kanematsu A, Yamahara K, Doi K, Kushibiki T, Yamamoto M, Itoh H, Ikeda T, Tabata Y, Komeda M: Simultaneous application of basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor to enhance the blood vessels formation. *J Vasc Surg*, **41**(1): 82-90, 2005.
- 42) Allodi I, Casals-Díaz L, Santos-Nogueira E, Gonzalez-Perez F, Navarro X, Udina E: FGF-2 low molecular weight selectively promotes neuritogenesis of motor neurons in vitro. *Mol Neurobiol*, **47**(2): 770-781, 2013.
- 43) Morito A, Kida Y, Suzuki K, Inoue K, Kuroda N, Gomi K, Arai T, Sato T: Effects of basic fibroblast growth factor on the development of the stem cell properties of human dental pulp cells. *Arch Histol Cytol*, **72**(1): 51-64, 2009.
- 44) Re'em T, Cohen S: Microenvironment design for stem cell fate determination. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2011

- 45) Sloan AJ, Smith AJ: Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis*, **13**(2): 151-157, 2007.
- 46) Silva TA, Rosa AL, Lara VS: Dentin matrix proteins and soluble factors: intrinsic regulatory signals for healing and resorption of dental and periodontal tissues? *Oral Dis*, **10**(2): 63-74, 2004.
- 47) Qin C, D'Souza R, Feng JQ: Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. *J Dent Res*, **86**(12): 1134-1141, 2007.

論文提出先：愛知学院大学大学院歯学研究科委員会

(名古屋市千種区楠元町 1-100)