結合組織増殖因子 CTGF/CCN2 が歯胚間葉細胞の 象牙芽細胞分化に与える影響

志 茂 剛・佐々木 朗

Effects of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) on the differentiation of tooth germ mesenchymal cells into odontoblasts

SHIMO Tsuyoshi · SASAKI Akira

Abstract: Recent studies using novel bioengineering techniques have demonstrated the regeneration of mammalian dental tissues from tooth-derived cells. In this study, we established a novel in vitro culture system with the use of undifferentiated dental mesenchymal cells from bovine bell-staged tooth germs and promoted differentiation of these cells into functioning odontoblasts. During the 21-day culture period, the dental mesenchymal cells were exposed to 5 μ g/ml ascorbic acid and 1 mM β -glycerophosphate (β -GP). These undifferentiated mesenchymal cells exhibited characteristics of odontoblasts at all stages of differentiation, starting from the immature stage to the terminal mineralization stage. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is a potent growth factor that regulates proliferation and differentiation of both chondrocytes and osteoblasts. Since CTGF is also expressed in differentiating preodontoblasts, we examined if CTGF can promote odontoblast differentiation. Recombinant CTGF (rCTGF), in the presence of ascorbic acid and β -GP, stimulated the expressions of the early odontoblast differentiation marker alkaline phosphatase (ALP) and collagen type I mRNA. In addition, the maturation markers osteopontin and dentin sialophosphoprotein (DSPP) mRNA were also expressed during the 9-day culture period. Histological and histochemical analyses confirmed that rCTGF, in the presence of ascorbic acid and β -GP, stimulated high alkaline phosphatase activity, calcium incorporation, and hydroxyapatite deposition. These findings demonstrated that our novel culture system can maintain the osteogenic potential of undifferentiated dental mesenchymal cells and promote their differentiation into functional odontoblasts. Furthermore, rCTGF is capable of promoting the differentiation of tooth germ mesenchymal cells into odontoblasts, suggesting that CTGF may be therapeutically useful in the future for promoting tooth regeneration.

Key words: connective tissue growth factor (結合組織増殖因子), tooth germ mesenchymal cells (歯胚間葉細胞), odontoblast (象牙芽細胞)

緒 言

バイオサイエンスを応用した新しい医療が展開されるなか、歯科医療の分野でも従来の義歯やインプラントに変わる新たな治療法の開発が期待されている。歯の発生過程では口腔上皮に由来する上皮と頭部神経堤細胞由来の間葉細胞

の相互作用をとおり、エナメル質および象牙質産生細胞が分化誘導される。これまでの研究成果により、多くの因子が歯胚の各発生段階において特異的な発現様式を示し、それらの遺伝子の発現調節、およびそれらの機能が細胞および組織レベルで報告されてきた。近年、結合組織増殖因子 (CTGF/CCN2) は発生初期の歯胚に誘導され、蕾状期では間葉組織の凝集部位に移行し、帽状期、鐘状期にはエナメル結節、前エナメル芽細胞に発現し、歯胚の発生初期から後期において上皮-間葉の相互作用を調節していることが初めて報告された¹⁾。歯の組織の再生を試みる場合、歯胚由来の未分化細胞を利用し、しかも上皮-間葉相互作用を担う因子で細胞分化を誘導させるのが最適であると考えられる。そこで本研究では、ウシ胎仔鐘状期歯胚由

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯顎口腔病態外科学分野
(主任: 佐々木 朗教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, and
Biopathological Science, Okayama University Graduate School
of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences (Chief:
Prof. SASAKI Akira)

受付日: 2005 年 5 月 27 日

採択日: 2006 年 2 月 28 日

表1 RT-PCRに用いたプライマーの塩基配列

I型コラーゲン	(S) 5'-GCCGAATTCTGGATGGATTRAAGGGACAG-3' (AS) 5'-GCCCTCGAGGAGACCCACAGGRCCTTCTT-3'
ALP	(S) 5'-GCCGAATTCACCCTGAAAAATGCCCTGAG-3' (AS) 5'-GCCCTCGAGCATACTCCACATCGGTTCTG-3'
オステオポンチン	(S) 5'-GCCGAATTCATTTGCTTGTGCCTCTTKGG-3' (AS) 5'-GCCCTCGAGACTMTCTAATTCATGAGAAA-3'
DSPP	(S) 5'-GCCGAATTCCTCATGCAAGGAGATGATCCC-3' (AS) 5'-GCCCTCGAGACTTGCTRTCTGCTGTCTAC-3'
GAPDH	(S) 5'-GCCGAATTCCTTTGTGATGGGYGTGAACC-3' (AS) 5'-GCCCTCGAGCATACTTGGCAGGTTTCTCC-3'

来の間葉細胞を用い、象牙芽細胞に分化誘導させる培養系を確立した。さらに組み替え CTGF タンパク質 (rCTGF) を歯胚間葉細胞に直接作用させ、CTGF による象牙芽細胞への分化誘導の有効性を検討した。

材料と方法

1. 細胞培養

90 日齢ウシ胎仔顎骨より、鐘状期歯胚を単離した。歯胚を 1.2U/ml ディスパーゼ (Boehringer Mannheim 社製) で氷上 30 分間処理を行い、上皮と間葉組織に分離を行った。分離した間葉系組織を細切後、0.25 %トリプシン (Sigma 社製)、0.1 %コラゲナーゼ I (Sigma 社製) で 3 時間、37 °C で処理後、孔径 20 μ m のナイロンフィルター (FALCON 社製) で濾過して分離した。分離した間葉系細胞は 2×10^5 個/well/12 穴プレートまたは 1×10^6 個/60mm プレートに播種し、15 %ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS, Sigma 社製) と 1 %ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco BRL 社製) を含む Dulbecco 変法 Eagle 培地 (DMEM, GIBCO 社製) 中で 37 °C、5 % CO₂ 気相下にて培養した。90 日齢ウシ胎仔鐘状期歯胚由来の初代間葉細胞が象牙芽細胞へ分化する能力を調べるため、基質産生を促進させる 5 μ g/ml アスコルビン酸 (Sigma 社製) または基質と石灰化を促進させるため 5 μ g/ml アスコルビン酸と 1mM β -glycerophosphate (β -GP, Sigma 社製)、さらに 50ng/ml rCTGF 存在下で 9 日間培養を行った。なお rCTGF は、立体構造を維持させるため、バキュロウイルス発現システムで昆虫細胞に産生させ、さらにヒスチジンタグカラムにより精製したものを使用した¹⁾。

2. アルカリホスファターゼ (ALPase) 活性の測定

ALPase 活性の測定は Bessey ら²⁾ の方法に準じ行った。すなわち、細胞層を PBS にて 3 回洗浄した後、0.2 % TritonX-100 を含む 0.9 % NaCl で回収し、氷中でホモジナイズし、細胞懸濁液を 12,000xg で 15 分間遠心し、上清を

回収した。これを 0.5mM パラニトロフェニルリン酸 2 ナトリウム (pNP; 和光純薬社製)、0.5mM の MgCl₂ を含む 0.5M Tris-HCl (pH9.0) 中で 37 °C、30 分間インキュベートし、1M NaOH を全体の 1/4 量添加して反応を停止し、分光光度計にて 410nm の吸光度を測定した。標準曲線の作成にはパラニトロフェノール (和光純薬社製) を使用した。ALPase 活性は 30 分間に 1 μ g 蛋白あたりに水解される基質 pNP の量 (nmol) で評価した。蛋白定量は Lowry 法³⁾ に準じて、ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma 社製) を標準物質として測定した。

3. total RNA の調整

歯胚間葉細胞より、total RNA を酸性フェノール法に準じ、TRIzol (Invitrogen 社製) を使用して行った。抽出した total RNA は 20 μ g 当わりに 0.8U の DNaseI (Promega 社製) を用いて、37 °C、30 分間処理した。RNA の定量は分光光度計 (DU-640, Beckman 社製) で 260nm の吸光度を測定することにより行った。

4. ノーザンブロット

ウシ cDNA: I 型コラーゲン (856bp), ALP (604bp), オステオポンチン (807bp), Dentin sialophosphoprotein (DSPP) (495bp), CTGF (824bp), GAPDH (376bp) の塩基配列を基に特異的プライマーを作製した。プライマーの塩基配列は表 1 に示す。ウシ歯胚より得られた total RNA の逆転写および増幅は Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit (Invitrogen 社製) を用い、サーマルサイクラー (PC-700, アステック社製) にて反応させた。次に PCR 増幅物を pBluescriptII SK (+) クローニングベクター EcoRI と XhoI 部位にサブクローニングを行った後、シーケンスを行って各 cDNA 配列が目的産物であることを確認した。これらの cDNA 断片は [α -³²P] dCTP (Amersham 社製) で標識したものをプローブとして用いた。標識には Random Primer DNA Labeling Kit (Amersham 社製) を使用した。前述の方法に従い細胞から total RNA を抽出し、200 μ g/ml のプロテナーゼ K (Gibco BRL 社製)

を含む HB 緩衝液 [50mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH7.5), 5mM EDTA (pH8.0), 0.5 % SDS (Bio-Rad 社製)] 中で, 37 °C, 1 時間処理した後, DNaseI 処理を行い, このうち 15 μ g の total RNA を使用し, ホルムアルデヒド変性 1 % アガロースゲルで電気泳動した. 泳動後, RNA をナイロンメンブレン (Bio-Rad 社製) に転写した. 転写後, メンブレンを 80 °C, 2 時間ベイクし RNA を固定した後, 5 × SSC, 1 % SDS, 1 × Denhardt 溶液 (Amersco 社製) 中に行った. 次に, 0.02M Tris-HCl (pH8.0), 0.75M NaCl, 2.5mM EDTA, 1 × Denhardt 溶液, 1 % SDS, 50 μ g/ml 熱変性サケ精子 DNA (Sigma 社製), 2 × 10⁶cpm/ml の濃度の標識 DNA プローブを含んだハイブリダイゼーション溶液中にて 65 °C で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った. 次に, メンブレンを 2 × SSC, 0.1 % SDS にて, 室温で 5 分, 0.2 × SSC, 0.1 % SDS にて, 65 °C で 30 分洗浄後, フィルム (Hyper film, Amersham 社製) に感光させた.

5. ALPase, アリザリンレッド染色

rCTGF で刺激した歯胚間葉細胞の細胞形態を ALPase 染色とアリザリンレッド染色を行って検討した. ALPase 染色は細胞を PBS で 2 回洗浄した後, 0.5mg/ml naphthol AS-BI (Sigma 社製) と, 50mM Tris-HCl (pH9.5), Fast Red trisodium salts (Sigma 社製) で 37 °C, 2 分間インキュベートを行った. 一方アリザリンレッド染色は細胞を PBS で 2 回洗浄した後, 80 %ホルマリン PBS で 15 分間室温で処理後, PBS で洗浄を行い, 1 %アリザリンレッド (Sigma 社製) で 5 分間室温で作用させた.

6. カルシウム濃度の測定

細胞を, 0.9 % NaCl, 10mM Tris-HCl (pH7.4) を用いて 3 回洗浄を行い, 1M HCl を 500 μ l/well 添加し 30 分間室温で作用させた. 抽出されたカルシウム濃度は 0.1 % LaCl₃ (Sigma 社製) 存在下でマイクロプレートリーダー (ARVO, Perkin-Elmer 社製) を用いて吸光度を測定し解析した.

7. *in situ* ハイブリダイゼーション

90 日齢ウシ胎仔鐘状期歯胚パラフィン包埋連続切片を 1 μ g/ml プロテアーゼ K (Sigma 社製) 含有 50mM リン酸緩衝液に 1 分間処理を行った後, 4 %パラホルムアルデヒドにて 10 分間固定し, 2mg/ml グリシン (Sigma 社製) 含有 1 × PBS にて 10 分間洗浄を行った. 切片は ³⁵S ラベルしたアンチセンスプローブ (1 × 10⁶DPM/切片) と 50 °C で 16 時間ハイブリダイゼーション終了後, 50 %ホルムアルデヒド含有 2 × SSC にて 50 °C で 20 分間洗浄し, 20 μ g/ml RNaseA で 30 分間処理を行い, 0.1 × SSC にて 50 °C で 10 分間洗浄を行った. 切片を 70, 90, 100 %エタノールを 5 分間ごと処理し脱水を行った後, Kodak 社製 NBT-3 溶液をコートし 10 日から 14 日間感光させた. Kodak 社製 D19 を 20 °C で 3 分間処理し増感を行った後, ヘマトキシ

リン, エオジン (HE) 染色を行った.

結 果

1. 象牙芽細胞分化過程における CTGF, DSPP, ALP, I 型コラーゲン mRNA の局在

ウシ胎仔鐘状期歯胚における CTGF mRNA の発現は歯胚間葉細胞ではわずかであったが, 象牙質産生直前の象牙芽細胞において上昇し, その後, 成熟象牙芽細胞にも維持された (写真 1B). DSPP の発現は歯胚間葉細胞ではみられず, 象牙質を産生している象牙芽細胞にきわめて強く発現した (写真 1C). 一方, ALP mRNA と I 型コラーゲン mRNA 発現は歯胚間葉細胞にも認められたが, その発現は象牙質産生象牙芽細胞において上昇した (写真 1D, E). これらの結果より, ALP と I 型コラーゲン mRNA の発現を象牙芽細胞の分化初期の, また, オステオポンチン遺伝子とともに DSPP 遺伝子の発現を成熟象牙芽細胞のマーカー遺伝子として以下の実験に用いた.

2. 歯胚間葉細胞の象牙芽細胞分化能に関する検討

コントロール (写真 2G) と比較してアスコルビン酸添加により細胞外基質の密なネットワークが形成され (写真 2H) ALPase 染色にて強染されることがわかった (写真 2B, H). しかしながらアスコルビン酸単独の添加では石灰化が全く起こらないことがアリザリンレッド染色により明らかになった (写真 2E, K). アスコルビン酸と β -GP を同時に添加したものはアリザリンレッド染色にて強染され (写真 2F, L), 石灰化した細胞外マトリックスの結節形成が認められることがわかった (写真 2L). それぞれの石灰化した結節は徐々に増大し, 融合し, 21 日目ではむらのない石灰化組織が形成された (データ未発表). アスコルビン酸と β -GP を添加したものはコントロールと比較して ALPase 染色は強染され (写真 2C), 石灰化したマトリックスの間隙の細胞に ALPase 活性が認められることがわかった (写真 2I). しかしながらアスコルビン酸と β -GP ともに添加しないものは弱い ALPase 染色 (写真 2A, G) が認められるものの, アスコルビン酸単独添加したものと同様に石灰化は全く誘導されないことが明らかとなった (写真 2D, J).

アスコルビン酸, β -GP の象牙芽細胞分化におよぼす影響を ALPase 活性とカルシウムの蓄積により検討した (図 1A, B). ALPase 活性はアスコルビン酸単独添加では 15 日目まで急速に上昇しピークに達した. 一方, ALPase の活性はアスコルビン酸と β -GP 同時に処理すると, ALPase の活性は 6 日目まで上昇するものの 9 日目からプラトーに達していることがわかった. 一方未処理した細胞は経時的に ALPase の活性化が起こっているものの上昇率は低いこと

写真1 ウシ鐘状期歯胚における CTGF, DSPP, ALP, I 型コラーゲン mRNA の局在

ウシ 90 日齢鐘状期歯胚組織切片を HE 染色 (A), 放射線ラベルした CTGF (B), DSPP (C), ALP (D), I 型コラーゲン (E) アンチセンスプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。なお写真中の ab ; エナメル芽細胞, ob ; 象牙芽細胞, dm ; 歯胚間葉細胞, si ; 中間層, バーは 100 μ m を示す。

写真2 ウシ歯胚間葉細胞分化に対するアスコルビン酸と β -GP の影響

ウシ歯胚間葉細胞に 5 μ g/ml のアスコルビン酸 (Asc) (B, E, H, K) または Asc と 1mM β -GP (C, F, I, L) を添加し, 培養 12 日目に ALPase 染色 (A-C, G-I) またはアリザリンレッド染色 (D-F, J-L) を行った。A, D, G, J は無添加コントロールウェルを示す。A-F は 12 穴ウェルの写真, G-L は A-F の位相差顕微鏡による写真を示す。写真中のバーは 100 μ m を示す。

がわかった。細胞外基質に蓄積されたカルシウムは, 未処理の細胞とアスコルビン酸処理した細胞ではほとんど検出できなかったが, アスコルビン酸と β -GP を同時添加した細胞では 9 日目より急速に増加し (図 1B), さらにノーザンブロット法により 3 日目より DSPP mRNA 発現が認めら

れた (写真 3)。

3. CTGF が歯胚間葉細胞に与える影響

歯胚間葉細胞を無添加条件で 9 日間培養すると, ALP, I 型コラーゲン mRNA 発現はほとんど検出できなかったが, rCTGF を単独添加するとコントロールと比較して I 型

図1 ウシ歯胚間葉細胞のALPase活性、カルシウムの蓄積に対するアスコルビン酸と β -GPの影響
ウシ歯胚間葉細胞に5 μ g/mlのアスコルビン酸(Asc)または1mM β -GPを添加した。培養3, 6, 9, 15, 21日目に細胞を回収し、ALPase活性と細胞外基質に蓄積されたカルシウムを測定した。ALPase活性はnmol p-NP/ μ g protein/minで示し(A)、カルシウムの蓄積は μ g/ml/ウェルで示す(B)。

写真3 ウシ歯胚間葉細胞分化に対するCTGFの影響

ウシ歯胚間葉細胞に5 μ g/mlのアスコルビン酸(Asc), 1mM β -GP, または50ng/ml rCTGFを添加した。培養1, 3, 9日目にtotal RNAの回収を行った後ノーザンブロットを行った。プローブとしてALP, I型コラーゲン(Coll I), オステオポンチン(OPN), dentin sialophosphoprotein(DSPP), 内部標準としてGAPDHを用いた。

コラーゲン mRNA の発現は3日目より著しく上昇した。オステオポンチン mRNA は無添加条件で9日目で上昇したが, rCTGF を単独添加すると3日目より有意な上昇を認め9日目でさらに増加することがわかった(写真3)。

アスコルビン酸単独添加では無添加群と比較してALP mRNA は3日目より, I型コラーゲン mRNA は1日目より有意な上昇が認められ, これらの発現は rCTGF の同時添加でさらに有意に上昇することが明らかとなった。興味あることにオステオポンチン mRNA はアスコルビン酸

単独添加では無添加群と比較してその発現は抑制され, rCTGF をここに添加するとその発現は回復することが明らかとなった(写真3)。

アスコルビン酸と β -GPを同時に添加すると, ALP, I型コラーゲン mRNA は3日目よりわずかながら発現上昇が認められ, オステオポンチン mRNA 発現は3日目より著しく上昇することが明らかとなった。さらに象牙芽細胞特異的な最終分化マーカーである DSPP 発現も3日目より上昇した。一方, アスコルビン酸, β -GP と rCTGF の同時

写真4 ウシ歯胚間葉細胞のALPase活性、基質の石灰化に対するCTGFの影響

ウシ歯胚間葉細胞に5 μ g/mlのアスコルビン酸(Asc), 1mM β -GP, または50ng/ml rCTGFを添加した。培養9日目に細胞をALPase染色(A, B, E, F, I, J)またはアリザリンレッド染色(C, D, G, H, K, L)を行った後、位相差顕微鏡により細胞の写真を撮影した。A-Dはコントロール, E-Hはアスコルビン酸添加, I-Lはアスコルビン酸+ β -GPを示す。写真中のバーは100 μ mを示す。

添加により, ALP, I型コラーゲン mRNAだけでなく成熟象牙芽細胞マーカーであるオステオポンチンとDSPP mRNA発現も3日目から有意に上昇することが明らかとなった(写真3)。

9日間培養後の無添加群では敷石状にコンフルエントに達した細胞が認められ, 細胞外基質の蓄積はほとんど認められず, ALPase染色は乏しいことがわかった(写真4A)。rCTGFを添加し培養すると敷石状に密になった細胞上に細胞外基質がまばら状に覆っていることが観察され, ALPase染色で無添加群と比較して強染された(写真4B)。またアスコルビン酸単独添加群では敷石状にコンフルエントに達した細胞上に網目状に覆いつくした細胞外基質が認められ, ALPase染色で無添加群と比較して強染された(写真4E)。アスコルビン酸とrCTGFとの併用添加では, アスコルビン酸単独添加群と比較して著しく細胞外基質の充進が認められ, 一部帯上に広がったマトリックス凝集塊を形成していることが明らかとなった(写真4F, H, 矢印)。アスコルビン酸と β -GP同時添加すると, 敷石状に密になった細胞上に石灰化した細胞外基質結節形成が認められることが明らかとなり(写真4I 矢印), それに一致した部位でアリザリンレッド陽性基質が認められた(写真4K 矢印)。アスコルビン酸, β -GPと同時にrCTGFを添加すると細胞上に大きな石灰化細胞外基質結節形成が観察され

(写真4J, L 矢印), ALPase染色(写真4J), アリザリンレッド染色(写真4L, 矢印)で強染されることがわかった。以上の結果からCTGFは歯胚間葉細胞のALPaseの活性化を促進し(表2, 写真4B, F, J), またアスコルビン酸存在下で細胞外基質産生を上昇させ(写真4F, H, 矢印), さらにアスコルビン酸と β -GP両存在下では石灰化した細胞外マトリックスの結節形成を促進することが明らかとなった(表2, 写真4J, L 矢印)。

考 察

本研究では初代ウシ胎仔鐘状期由来の歯胚間葉細胞をアスコルビン酸と β -GP存在下で培養することで象牙芽細胞に分化誘導させる細胞培養系を確立した。本培養系では, ウシ胎仔鐘状期の歯胚を用いているため, 象牙質産生細胞が混入することなく, さらに, 歯胚を水中で酵素処理することで上皮細胞を混入させることなく間葉組織を完全に分離できた⁴⁾。これら細胞群は若干の血管内皮細胞, 神経細胞を含んだ集団であると考えられるが, 興味深いことに培養期間中に象牙芽細胞へ分化する細胞群が多くを占めるようになった。さらに, 上皮-間葉相互作用は, エナメル質および象牙質産生細胞の分化誘導に必須であるとされているが, 本培養系では, 間葉細胞単独で象牙質産生細胞の分

表2 ウシ歯胚間葉細胞の ALPase 活性, カルシウムの蓄積に対する CTGF の影響

Cell Population	rCTGF	ALPase	SD	Ca	SD
Control	—	2.18	0.14	0	0
	+	3.74	0.21	0	0
+ Asc	—	4.22	0.15	0	0
	+	7.51	0.05	0	0
+ Asc + β GP	—	3.31	0.16	5112	385
	+	5.35	0.32	8857	284

ウシ歯胚間葉細胞に $5\mu\text{g/ml}$ のアスコルビン酸 (Asc), 1mM β -GP, または 50ng/ml rCTGF を添加した. 培養9日目に細胞を回収し, ALPase 活性と細胞外基質に蓄積されたカルシウムを測定した.

化を誘導することができた. このことは, 常に初代の細胞を使用することで本来細胞に備わる分化能を保持させたことによると思われる. さらに, 血清中の微量因子も無視できないものの, アスコルビン酸と β -GP を添加した培養条件が歯胚間葉細胞の象牙芽細胞への分化に有効に奏したものと考えられる.

CTGF はヒト臍帯静脈血管内皮細胞の培養上清中から, 抗血小板由来成長因子 (PDGF) 抗体に交叉反応を示すタンパク質として⁵⁾, また肥大軟骨細胞が特異的に発現する遺伝子産物として見出された分子量 38kDa のヘパリン結合性の分泌タンパク質である⁶⁾. CTGF はこれまで培養細胞レベルで, 軟骨細胞⁷⁾, 骨芽細胞⁸⁾ の増殖, 分化, 接着能に重要な役割を担っていることが示された. 最近では, CTGF 欠損マウスによる固体レベルでその機能が解析され, 肥大軟骨細胞が骨細胞に置換される内軟骨性骨化の最終段階の過程が障害されることが報告された⁹⁾. 近年, 興味あることに CTGF は血小板中に高濃度で存在したことから¹⁰⁾, 骨, 軟骨組織が損傷された際の再生過程にも関与することが示唆されている^{11, 12)}. 以前, 著者らは, マウス胎仔鐘状期の乳臼歯歯胚において, CTGF はおもに前エナメル芽細胞により産生されるが, その遺伝子産物は前象牙芽細胞にも分布していることを報告した¹⁾. CTGF はマウス胎仔鐘状期の歯胚においては前象牙芽細胞にも弱い発現は確認されるが¹⁾, 前エナメル芽細胞によりパラクラインシステムで前象牙芽細胞に供給されている可能性が高い. これまで CTGF の特異的受容体は単離されていないが, 他の細胞系では $\alpha\text{v}\beta3$ などのインテグリンと結合し, 細胞の機能に影響を与えることが報告されている¹³⁾. 歯の発生過程においても複数のインテグリンが前エナメル芽細胞および前象牙芽細胞に発現していることが報告されており¹⁴⁾, これらのインテグリンを介して CTGF のシグナルが伝達されている可能性がある. 興味あることに, 象牙質, エナメル質の基質産生が開始され, 両細胞間で直接の相互作用

がなくなると, CTGF の発現は前エナメル芽細胞では消失するが, 反対に象牙芽細胞では上昇する^{1, 15)}. 象牙芽細胞は生体の細胞のなかでも非常に安定な細胞群であるが, 齶蝕などによる歯質の損傷時には, 活性化され象牙質基質を産生し始めることが知られている. CTGF の発現が象牙芽細胞で上昇することは, オートクラインシステムで象牙芽細胞の維持に関与している可能性がある. さらに, 歯根の形成は, 歯根の形成をもって完了する. CTGF は歯根の形成に重要な役割をになうヘルトビッチ上皮鞘にも発現しており¹⁾, 歯根形成期の上皮-間葉相互作用を制御し, セメント芽細胞, 歯根象牙芽細胞および骨芽細胞の誘導, 分化にも関与している可能性がある.

CTGF をウシ胎仔歯胚間葉細胞に作用させると, 分化マーカーのなかでも ALPase 活性が早期に上昇した. このことは未分化細胞から前象牙芽細胞へいたる初期の分化過程を反映しているものと考えられる⁴⁾. さらに象牙芽細胞に成熟する最終過程においても高い ALPase 活性が認められた. これらの結果から, ALPase 活性は歯胚間葉細胞の象牙芽細胞への初期分化および成熟マーカーとして用いることができるとともに, CTGF の機能判定基準として有用であると考えられる.

CTGF は象牙芽細胞の分化の初期段階から最終段階にわたり I 型コラーゲンおよびオステオポンチンなどの細胞外基質遺伝子群の発現を有意に増加させた (写真 3). CTGF はマウス骨芽細胞 MC3T3-E1 においても, I 型コラーゲンとオステオポンチン遺伝子の発現を調節することにより, 石灰化を制御していることが報告されている⁸⁾. CTGF は象牙質形成前, および形成中の象牙芽細胞において, これらの細胞外基質成分の産生を制御することにより, 基質産生に引き続いて起るハイドロキシアパタイトの形成に関与しているものと思われる.

DSPP 欠損マウスでは, 象牙質の形成が障害されており, その石灰化の過程における DSPP の重要性が報告されてい

る¹⁶⁾。CTGFは単独では歯胚間葉細胞にDSPP遺伝子発現を誘導できなかったが、アスコルビン酸と β -GPの同時添加によって優位に促進させた。このことは、CTGFは単独では象牙芽細胞の最終分化を誘導できないが、その機能は象牙芽細胞の最終分化を調節している他の因子(群)の存在下で初めて発揮されるのかもしれない。CTGFによるDSPPの発現調節のメカニズムは今後の課題である。

将来、歯科領域で展開される再生医療は、歯組織由来の上皮および間葉細胞を用い、歯胚の発生過程を再現させ、新たに歯を再生させるという戦略に基づいたものであろう。この考えに立脚し、本研究では、歯胚より最終分化に至っていない分化段階の間葉細胞を単離し、機能を維持させたまま培養し、成熟した象牙芽細胞にまで分化させ、象牙質特有の基質を産生させた。さらに、上皮-間葉相互作用に関与しているCTGFで、象牙芽細胞への最終分化を容易にした。

結 語

1. ウシ胎仔鐘状期歯胚由来の間葉細胞を用い、象牙芽細胞に分化誘導させる新たな培養系を確立した。

2. CTGFは歯胚間葉細胞の初期分化マーカーであるアルカリホスファターゼ、I型コラーゲン、さらに成熟象牙芽細胞のマーカーであるオステオポンチン遺伝子発現を増加させることがわかった。さらに、CTGFはアスコルビン酸と β -GP存在下でDSPP遺伝子発現を増加させた。

3. CTGFは歯胚間葉細胞の基質産生、石灰化物の産生を促進させることが明らかとなった。

4. 歯胚由来間葉細胞に上皮-間葉相互作用を担うCTGFで細胞分化を誘導させる手法は、歯の組織の再生に有効な手段になり得ると思われる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う貴重な御援助と御助言を頂きました米国トーマスジェファーソン大学整形外科講座の小山英樹助教授に感謝の意を表します。

引 用 文 献

- Shimo, T., Wu, C., et al.: Expression, gene regulation, and roles of Fisp 12/CTGF in developing tooth germs. *Dev Dyn* 224: 267-278 2002.
- Bessey, O.A., Lowry, O.H., et al.: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 164: 321-329 1946.
- Lowry, O.H., Losenbrough, N.J., et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275 1951.
- Koyama, E., Wu, C., et al.: Development of stratum intermedium and its role as a Sonic hedgehog-signaling structure during odontogenesis. *Dev Dyn* 222: 178-191 2001.
- Bradham, D.M., Igarashi, A., et al.: Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 114: 1285-1294 1991.
- Takigawa, M., Nakanishi, T., et al.: Role of CTGF/HCS24/ecogenin in skeletal growth control. *J Cell Physiol* 194: 256-266 2003.
- Nakanishi, T., Nishida, T., et al.: Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture. *Endocrinology* 141: 264-273 2000.
- Nishida, T., Nakanishi, T., et al.: Effects of CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells in vitro. *J Cell Physiol* 184: 197-206 2000.
- Ivkovic, S., Yoon, B.S., et al.: Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 130: 2779-2791 2003.
- Kubota, S., Kawata, K., et al.: Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. *J Biochem* 136: 279-282 2004.
- Nishida, T., Kubota, S., et al.: Regeneration of defects in articular cartilage in rat knee joints by CCN2 (connective tissue growth factor). *J Bone Miner Res* 19: 1308-1319 2004.
- Shimo, T., Koyama, E., et al.: Retinoid signaling regulates CTGF expression in hypertrophic chondrocytes with differential involvement of MAP kinases. *J Bone Miner Res* 20: 867-877 2005.
- Gao, R. and Brigstock, D.R.: Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin α (v) β (3) and heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 279: 8848-8855 2004.
- Lucchini, M., Couble, M.L., et al.: Alpha v beta 3 integrin expression in human odontoblasts and co-localization with osteoadherin. *J Dent Res* 83: 552-556 2004.
- Kanyama, M., Shimo T., et al.: CCN proteins, expression and roles of CCN2 during odontogenesis. Imperial College Press, London, 2005, p81-94.
- Sreenath, T., Thyagarajan, T., et al.: Dentin sialoprophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem* 278: 24874-24880 2003.