

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20617

研究課題名(和文) ヒト歯根膜由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に関与する新規遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of novel genes involved in osteoblastogenesis of human periodontal ligament-derived mesenchymal stromal cells

研究代表者

山田 梓 (YAMADA, AZUSA)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：30708847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯根膜由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化時に発現する新規遺伝子の探索および作用の解明を目的として解析を行なった結果、EGFL6 (EGF like domain multiple 6) 遺伝子に有意な発現変化を認めた。EGFL6は間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に関連する新たな制御因子である可能性が考えられ、骨再生治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To identify the mechanism of osteoinductive medium (OIM)-induced osteoblastic differentiation of human periodontal ligament-derived mesenchymal stromal cells (hPDL-MSCs), whole transcriptome analysis and RT-PCR were performed. As a result, EGF like domain multiple 6 (EGFL6) was suggested to be involved in osteoblastic differentiation of hPDL-MSCs. Transfection of siEGFL6 significantly up-regulated the ALP activity of hPDL-MSCs in all samples. Knockdown of EGFL6 enhanced the expression of osteogenic genes, such as RUNX2, BSP, and OPN. Therefore, EGFL6 might be a novel regulator of osteogenesis in hPDL-MSCs.

研究分野：歯周組織再生学

キーワード：間葉系幹細胞 骨芽細胞分化

1. 研究開始当初の背景

ヒト歯根膜 (hPDL) には間葉系幹細胞が含まれ (Seo et al., Lancet, 2004) 歯根膜細胞を動物モデルに移植することにより良好な歯周組織再生が得られることから (Liu et al., Stem Cells, 2008) 有用な細胞ソースと考えられる。hPDL から作製した細胞シート (歯根膜シート) は動物モデルにおいて骨・歯根膜を含む歯周組織再生に有効であることが示されており (Iwata et al., Biomaterials, 2009; Tsumanuma et al., Biomaterials, 2011) すでに臨床試験も実施されている。歯根膜シートによる歯周組織再生は、既存の方法に代わる新たな治療法となり得る。歯根膜シート作製時には骨芽細胞分化誘導培地 (OIM) にて骨芽細胞分化誘導を行っているが、OIM によるヒト歯根膜由来間葉系幹細胞 (hPDL-MSCs) の骨芽細胞分化メカニズムには明らかでない点も多い。そこで申請者らは骨形成と深く関与する WNT シグナルに注目し、hPDL-MSCs の骨芽細胞分化における WNT 関連遺伝子発現の解析を行った (Yamada et al., Biomaterials, 2013)。OIM により誘導されるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性上昇は WNT シグナル・カノニカル経路の阻害剤である XAV939 (Huang et al., Nature, 2009) により濃度依存的に抑制されたことから、hPDL-MSCs の ALP 活性上昇は WNT シグナル・カノニカル経路を介することが示された。hPDL-MSCs を OIM で培養し遺伝子発現を探索した結果、WNT リガンドの細胞外アンタゴニストである secreted frizzled-related protein 3 (SFRP3) の発現は経時的に上昇したが、SFRP4 の発現は抑制された。また loss- and gain-of-function 実験により、SFRP3 は hPDL-MSCs の骨芽細胞分化を促進する一方、SFRP4 は抑制した。さらに SFRP3 はノンカノニカル経路の代表的リガンドである WNT5A と結合したことから、SFRP3 はノンカノニカル経路を抑制するこ

とにより間接的にカノニカル経路が増強され、hPDL-MSCs の骨芽細胞分化を促進する可能性が示された。一方、SFRP4 はカノニカル経路の WNT リガンドと結合することが示唆されており (Jones SE et al., Bioessays, 2002) SFRP4 の発現が抑制されることにより SFRP4 によるカノニカル経路の阻害が解除されカノニカル経路が活性化し骨芽細胞分化が促進する可能性が示唆された。これらの結果より、SFRP3 および SFRP4 はそれぞれノンカノニカル経路およびカノニカル経路を介し、hPDL-MSCs の骨芽細胞分化を制御する可能性が示された。

上記の様に SFRP3 および SFRP4 はそれぞれノンカノニカル経路およびカノニカル経路を介し、hPDL-MSCs の骨芽細胞分化を制御する可能性が示されたが、WNT シグナルの作用は多岐にわたり、また他のシグナル伝達経路との相互作用も考慮する必要がある。間葉系幹細胞の骨芽細胞分化においては Runx2, Osterix をはじめとする転写因子やサイトカインが重要な役割を担うことが明らかとなっているが (Harada and Rodan, nature, 2003) 骨芽細胞分化に関与するシグナル伝達経路には未だ不明な点も多い。骨芽細胞分化調節に関与する分子の同定は治療標的となり得るため、骨再生治療の観点からも重要と考えられる。

2. 研究の目的

これまでの研究から SFRP3 により骨芽細胞分化は促進されるため、SFRP3 は歯周病・骨粗鬆症・関節リウマチなどの骨減少性疾患に対する新規の治療法への応用が期待される。同様に新規遺伝子の発見は OIM による hPDL-MSCs の骨芽細胞分化メカニズムの解明につながるとともに、新たな骨再生療法開発の基盤となるものと期待される。

よって本研究は、hPDL-MSCs の骨芽細胞分化時に発現する新規遺伝子を同定し、機能解析を行うことにより候補遺伝子の骨芽細胞

分化における作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

健康なドナーの第三大臼歯より採取したヒト歯根膜組織をコラゲナーゼ・ディスパーゼにて酵素処理後、初代培養を行い、継代数4～7にて使用した。colony forming assay、differentiation assay (骨・脂肪)を行い、使用する細胞が間葉系幹細胞様性質を持つことを確認した。hPDL-MSCs をアスコルビン酸・グリセロリン酸・デキサメサゾンを含む骨芽細胞分化誘導培地 (OIM) で5日間培養後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性測定を行い、14日間培養後にアリザリンレッド S 染色を行なった。骨芽細胞分化誘導有りまたは無しにおいて4日・14日間培養後、total RNA を採取した。リボソーム RNA 除去および濃縮後、次世代シーケンサーにより骨芽細胞分化時に発現する遺伝子の探索を網羅的に解析した。

次世代シーケンサーにより有意に発現の変化が認められた遺伝子 (EGF like domain multiple 6; EGFL6,) について機能解析を行った。抗生剤無添加 10%FBS 含有 MEM 培地にて歯根膜細胞を播種し24時間培養後、濃度 40 nM で siRNA (STEAP4, EGFL6, PIP) をトランスフェクションし、ALP 活性の変化を検討した。またトランスフェクション4日後に RNA を抽出し骨形成関連遺伝子 (RUN2, OPN, BSP) について qRT-PCR により遺伝子発現解析を行なった。

4. 研究成果

まず、今回使用した細胞が間葉系幹細胞様の性質を有しており、OIM により ALP 活性が上昇することを確認した。

次世代シーケンサーの解析結果より、hPDL-MSCs の骨芽細胞分化誘導において EGF like domain multiple 6 (EGFL6) に有意な発現の変化を認めため、解析を行った。siRNA に

より EGFL6 ノックダウンを行なった結果、骨形成関連遺伝子である Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN) の発現上昇が認められた。また、EGFL6 ノックダウンにより ALP 活性の上昇や石灰化ノジュール形成が促進された。

実験結果より、骨芽細胞分化において EGFL6 ノックダウンにより ALP 活性の上昇および骨形成関連遺伝子の発現上昇が認められたことから、EGFL6 はヒト歯根膜由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を負に制御している可能性が示唆された。EGFL6 は歯周組織再生治療に使用するエムドゲインゲルによりその発現が上昇すること (Barkana et al., J Clin Periodontol. 2007) や angiogenesis と関与することが報告されており (Chim et al., J Biol Chem. 2011)、骨を含む歯周組織再生に深く関与している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Allogeneic Transplantation of Periodontal Ligament-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Sheets in Canine Critical-Size Supra-Alveolar Periodontal Defect Model.

Yuka Tsumanuma, Takanori Iwata, Atsuhiko Kinoshita, Kaoru Washio, Toshiyuki Yoshida, Azusa Yamada, Ryo Takagi, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Yuichi Izumi

BioResearch Open Access, Volume 5.1, 2016, 22-36 査読あり

DOI: 10.1089/biores.2015.0043

〔学会発表〕(計 1 件)

Periodontal Regeneration with
Autologous Periodontal
Ligament-derived Cell Sheets.

Takanori Iwata, Masayuki Yamato,
Kaoru Washio, Yuka Tsumanuma, Azusa
Yamada, Satoru Onizuka, Yuichi Izumi,
Tomohiro Ando, Teruo Okano, Isao
Ishikawa

Tissue Engineering and Regenerative
Medicine International Society- Asia
Pacific Meeting

2016年9月 台湾

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 梓 (YAMADA, Azusa)

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建
学系歯周歯内治療学分野・助教

研究者番号: 30708847

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()