

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20631

研究課題名(和文) 歯周組織構成細胞の分化誘導に関する転写因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of transcription factors involved in the differentiation induction of periodontal tissue constituent cells

研究代表者

高井 英樹 (TAKAI, Hideki)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：30453898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯周組織再生療法の確立は歯周組織構成細胞の生物学的特性を理解するために重要である。私たちはHPDLが歯周組織で特異的に発現する転写因子を抑制することによってどのような表現型細胞に誘導されるかを調べました。歯周組織において特異的に発現する転写因子の抑制の結果、siTwist2はSox5 mRNAおよび5タンパク質レベルを増加させた。さらに、siKLF12はSox2およびKLF4 mRNAレベルを発現し、KLF4タンパク質レベルを増加させた。我々は、HPDLが、歯周組織における特異的に発現された転写因子を抑制することによって異なる性質の細胞に誘導され得ることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Establishment of periodontal tissue regeneration therapy is important to understand the biological properties of the periodontal tissue component cells. We were searched HPDL is induced to what kinds of phenotype cells by suppressed the specifically expressed transcription factors at periodontal tissue. Result of suppression the specifically expressed transcription factor at periodontal tissue, siTwist2 increased Sox5 mRNA and protein levels. moreover, siKLF12 increased Sox2 and KLF4 mRNA level, it increased KLF4 protein levels. we suggested that HPDL could be induced to different nature cell by suppressed the specifically expressed transcription factors at periodontal tissue.

研究分野：歯周治療学

キーワード：転写因子

1. 研究開始当初の背景

歯周組織再生療法確立には、歯周組織（歯槽骨、歯根膜、歯肉およびセメント質）を構成する細胞（歯周組織構成細胞）の生物学的特性を十分に理解する必要がある。歯周炎は、歯根膜の破壊と骨欠損を引き起こす疾患であり、歯周炎により生じた欠損部位を再生するために用いられるエナメルマトリックスタンパク質およびFGF2は歯周組織構成細胞の分化を制御している。FGF2は、骨芽細胞の分化と軟骨細胞の成熟に関与するRunx2の発現を増加させるが、骨芽細胞、軟骨細胞、筋芽細胞および脂肪細胞は、共通の間葉系細胞から分化し、骨芽細胞はRunx2とOsterix、軟骨細胞はSoxファミリー、筋芽細胞から筋管はMyoDファミリー、脂肪細胞はCEBPファミリーとPPAR γ 2がそれぞれ必須な役割を果たしている。そのため、転写因子の発現をコントロールする事で、ターゲット細胞を異なる性質の細胞に誘導できる可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

今回、研究期間内に患者から採取したヒト歯周組織構成細胞（歯根膜細胞および歯肉線維芽細胞）およびヒト骨芽細胞様細胞を用い、各々の細胞で優位に発現している転写因子を検索することにより、各々の細胞が表現型を維持するために重要な転写因子を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト歯根膜細胞（HPDL）、ヒト歯肉線維芽細胞（HGF）およびヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞（Saos2）は37℃、5%CO $_2$ インキュベーター内で培養する。Saos2は10%ウシ胎児血清および抗生物質（100unit/mlペニシリンおよび100 μ g/mlストレプトマイシン）を含むMinimum essential medium alpha medium (α MEM)、HPDLおよびHGFは10%ウシ胎児血清および抗生物質

（100unit/mlペニシリンおよび100 μ g/mlストレプトマイシン）を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培養液を用いる。100mmディッシュに播種し、コンフルエントまで培養後、細胞を回収し、全RNAを抽出し、Real-time PCRにて各種転写因子のRNAの発現量、を検索する。さらに歯周組織構成細胞特異的な転写因子をノックダウンするために、siRNAおよびnsRNAを導入する1日前に細胞を35mm (6-well plate) に播種した。細胞が40~60%コンフルエントの状態に達した時点で100 μ M siRNAおよびnsRNAをオリゴフェクタミンを用いて細胞内に導入した。その後10%FBSを含むDMEMで68時間細胞培養後、細胞を回収し、全RNAおよびタンパク質を抽出する。Real-time PCRにて各種転写因子のRNAの発現量、Western Blot法にてタンパク質量を検索し、各々の細胞がどのような細胞に分化誘導されるかを検索する。

4. 研究成果

HPDL、HGFおよびSaos2を100mmディッシュに播種し、コンフルエント後、細胞回収し、全RNAを抽出し、Real-time PCRにて各種転写因子のRNAの発現量を検索した結果、Saos2に比較してHPDLおよびHGFではTwist2、KLF12およびPax9 mRNA発現量が多かった（図1）。

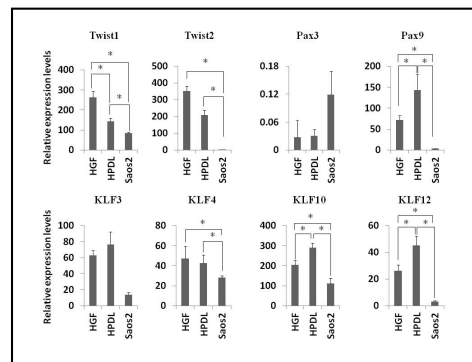


図1 歯周組織特異的転写因子 RNA の発現
このことから、歯周組織構成細胞で3つの転写因子が重要であると考えられた。そこでTwist2およびKLF12のsiRNAをHPDL

にトランスフェクションし、細胞の分化誘導について検索した。siTwist2 をトランスフェクションした結果、Sox5 mRNA およびタンパク質量が増加し、軟骨細胞特異的転写因子である ACAN mRNA が増加した(図 2、3)

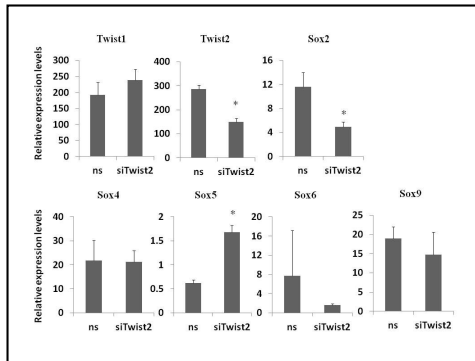


図 2 siTwist2 による転写因子 RNA の変化

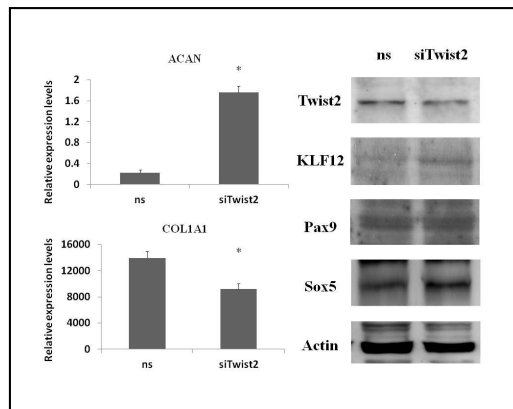


図 3 軟骨細胞特異的転写因子の発現

siKLF12 を HPDL にトランスフェクションした結果、Sox2 および KLF4 mRNA 量が増加し、Satb2 および Runx3 mRNA 量が減少した。また、ウエスタンブロットの結果、KLF4 タンパク質量が増加した。(図 4、5)

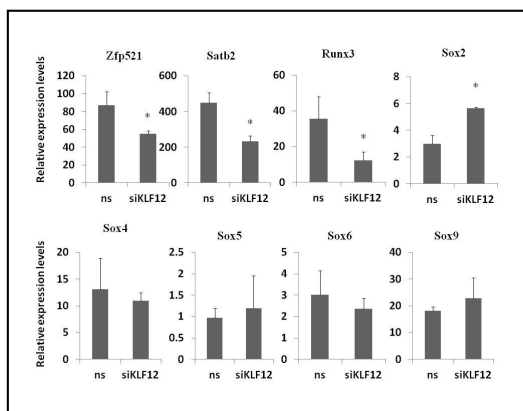


図 4 siKLF12 による転写因子 RNA の変化

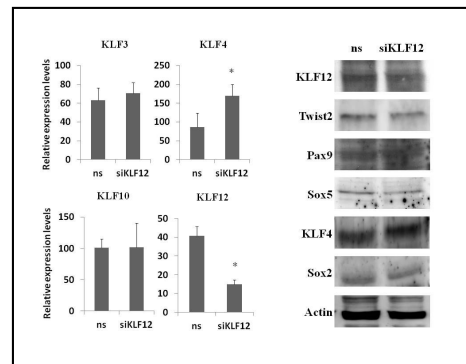


図 5 siKLF12 による KLF ファミリーの変化

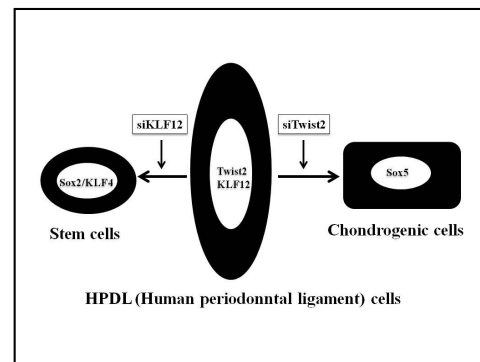


図 6 siRNA による転写因子の発現

以上の結果から HPDL は Twist2 を抑制すると軟骨細胞、KLF12 を抑制すると未分化幹葉系細胞に分化誘導されることが示唆された(図 6)

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 件)

[学会発表] (計 4 件)

高井英樹、能田佳祐、岩井泰伸、山崎瑞穂、小方頼昌、歯周組織構成細胞関連転写因子の抑制による軟骨および間葉系幹細胞への誘導、第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会、2016 年 10 月 7~8 日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県、新潟市)

Hideki Takai、Yorimasa Ogata、Inhibition of periodontal tissue-related transcription factors induces differentiation of chondrocyte、American Academy of Periodontology (AAP) 102nd Annual Meeting、2016 年 9 月 10~13 日、

SanDiego (America)

高井英樹、能田佳祐、岩井泰伸、山崎瑞穂、
小方頼昌、歯周組織構成細胞関連転写因子の
抑制による軟骨細胞への誘導、平成 28 年度
春季大会(第 144 回)、2016 年 6 月 9 ~ 10 日、
栃木県総合文化センター(栃木県、宇都宮市)

高井英樹、小方頼昌、歯周組織構成細胞関
連転写因子の抑制による軟骨芽細胞への誘
導、第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会、
2015 年 9 月 12 ~ 13 日、アクトシティー浜松
(静岡県、浜松市)

[図書] (計 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 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 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
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

高井 英樹 (TAKAI Hideki)
日本大学・松戸歯学部・専任講師
研究者番号 : 30453898

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :