

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11804

研究課題名（和文）歯根膜組織の再生・恒常性維持マシナリーに關与する新機能の探索および応用法の開発

研究課題名（英文）homeostatic regulation and regeneration of periodontal ligament tissues

研究代表者

長谷川 智一（HASEGAWA, Tomokazu）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・講師

研究者番号：50274668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：歯周組織の恒常性維持機構・再生機構の解析を行ってきた。歯根膜細胞および歯髓細胞におけるSDF-1のFGF-2による発現抑制には二次的な機構の存在が示唆された。歯髓細胞の発現するCCL11がFGF-2により発現抑制が認められ、その制御機構はFGF受容体からJNK経路を介することが明らかとなった。歯根膜細胞を低酸素環境下で培養した場合DNAの脱メチル化が認められ、そのmRNAの発現促進が認められた。

以上の結果から、歯根膜細胞および歯髓細胞においてサイトカインによる遺伝子発現の調節機構が相互に關与していることと、さらにエピジェネティックな調節機構も存在していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織や歯の恒常性維持機構・再生機構の解析において、歯根膜細胞および歯髓細胞において組織再生に有利なケモカインや、炎症反応に關与すると考えられるケモカインの発現調節機構について解析を行った。本申請の研究結果から歯根膜や歯髓組織において、サイトカインによる受容体から細胞内シグナルを介した直接的な遺伝子の発現調節機構だけでなく、他のサイトカインの受容体発現を抑制して二次的に遺伝子の発現を調節する機構も示唆された。さらにDNAの脱メチル化機構により遺伝子の発現調節が行われている可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）： To elucidate the maintenance of homeostasis and mechanism of regenerative medicine in periodontal tissues, we studied the effect of FGF-2 on expression of SDF-1 and CCL11 using with periodontal ligament (PDL) cells and pulp cells derived from deciduous teeth. Although it has been showed that FGF-2 could affect many effective function on PDL tissues and pulp tissues, both cells had expressed decreasing expression of SDF-1 which could induce migration of mesenchymal stem cells concentration-dependency manner treating with FGF-2. Together with the results of epigenetics of PDL cells in hypoxia, there are many systems for the maintenance of homeostasis and mechanism of regenerative medicine in PDL tissue and pulp tissue. Therefore,, we should choose adequate strategies for therapies of dental disease.

研究分野：小児歯科学

キーワード：歯周組織 歯髓組織 歯根膜細胞 歯髓細胞 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

永久歯の萌出によって自然脱落し廃棄される乳歯の歯髄や、いわゆる親知らずの歯髄および歯根膜には幹細胞が存在し、多分化能を示すことが報告された (Miura, et al., PNAS 2003,)。

そこで我々はヒト乳歯由来歯根膜細胞の不活化細胞株の樹立を行い、均一で安定した研究材料の作成に成功した。この細胞株は100回以上の分裂寿命を示し不活化していると考えられた。また歯根膜の既知の形質を示し、骨芽細胞、脂肪細胞への多分化能を示した。

本研究計画で使用するのは single cell cloning を行った不活化細胞株であり、細胞の質および数の安定的供給が可能である。また乳歯由来の歯根膜細胞の不活化細胞株は全世界でも我々のみしか所有していない。このため乳歯の歯根膜機能の安定した解析は他の研究グループでは不可能である。さらには歯周組織への再生医学研究などの応用研究においても、研究材料の安定的供給面からも我々は大きな優位性を持っている。

2. 研究の目的

歯髄や歯根膜に存在する幹細胞が再生医療のソースとして注目されている。我々は歯根膜細胞の産生する SDF-1 に注目し、歯髄や歯根膜が間葉系幹細胞の遊走を誘導し、再生および恒常性維持に関与する可能性を報告してきた。

また多細胞生物の体を構成する細胞は全て同一の塩基配列情報を持つにも関わらず、細胞種ごとに異なる表現型と遺伝子発現プロファイルを持つ。その制御機構はエピジェネティクスと呼ばれている。さらに2019年度のノーベル生理学賞は細胞が低酸素状態に適応する「低酸素応答」のメカニズムを解明した3人の研究者であった。咬合誘導時の歯の移動の際、圧迫側の歯根膜は低酸素状態になると考えられ、歯根膜細胞の低酸素環境への応答特性を知ることは重要である。そこで本研究の一部であるが、歯根膜細胞を低酸素環境に置いた時にエピジェネティックな変化が生じるか網羅的解析を行った。

本研究で得られた成果は歯周病の治療に応用可能であり、再生医療のソースである歯の保存の点からも今後の小児歯科医療にも大きく関わり、社会的意義は大きいと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 低酸素培養による細胞形態の観察

ヒト乳歯由来歯根膜細胞株 SH9 細胞を使用して、通常条件(5% CO₂, 95% air, 37℃, 100% humidity)または低酸素条件(5% O₂, 5% CO₂, 37℃, 100% humidity)で24時間培養後、位相差顕微鏡により細胞形態の観察を行った。

(2) 低酸素培養による mRNA 発現解析

ヒト乳歯由来歯根膜細胞株 SH9 細胞を使用して、通常条件(5% CO₂, 95% air, 37℃, 100% humidity)または低酸素条件(5% O₂, 5% CO₂, 37℃, 100% humidity)で24時間培養した状態で mRNA の抽出を行った。mRNA の抽出は TRIzol RNA™ Reagents (ThermoFisher, 15596026)を使用して通法に従って行った。抽出した mRNA に PrimeScript™ RT reagent kit (Perfect Real Time, Takara, RR037A)を使用して逆転写を行った。その後 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus, Takara, RR820A)と Thermal Cycler Dice® Real Time System (Takara, TP800)を使用して PrimerArray® cytokine-cytokine receptor interaction (Human) (Takara, PH001)により半網羅的に解析を行った。

(3) ゲノム DNA の調製および DNA メチル化解析

ヒト乳歯由来歯根膜細胞株 SH9 細胞を使用して、通常条件(5% CO₂, 95% air, 37℃, 100% humidity)または低酸素条件(5% O₂, 5% CO₂, 37℃, 100% humidity)で24時間培養した状態でゲノム DNA を回収した。ゲノム DNA の回収には NucleoSpin® Tissue (Takara, U0952Q)を使用して行った。回収したゲノム DNA はイルミナ社ビーズアレイを用いた DNA メチル化解析を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 低酸素培養による細胞形態の観察

培養開始から通常培養および低酸素培養で 24 時間の細胞形態を位相差顕微鏡を使用して観察した。培養開始から 24 時間後、それぞれの培養条件下で、培養開始時(図 1a)と開始後(図 1b, c)で細胞の増殖は認められたが、細胞形態に大きな変化は認められなかった。

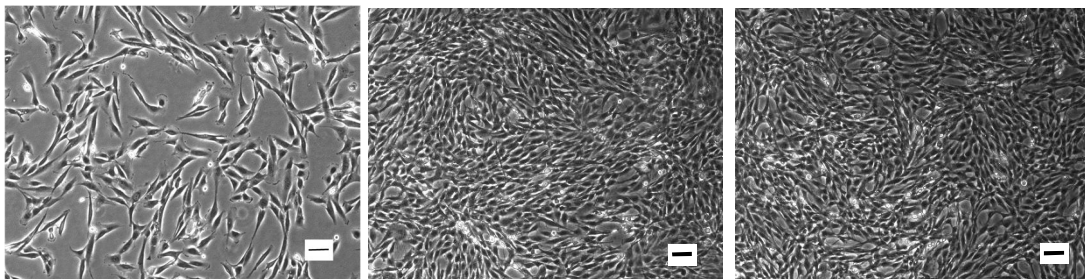


図 1a 培養開始時

図 1b 培養 24 時間後

図 1c 低酸素培養 24 時間後

通常培養時と低酸素培養時で形態的に大きな差はなかった(Bar = 100 μm)。

(2) 低酸素培養による mRNA 発現解析

PrimerArray[®] cytokine-cytokine receptor interaction による mRNA 発現解析によると、通常培養と比較して低酸素培養した細胞で約 10 倍以上の発現促進を認めた遺伝子は 10 個であった(図 2)。

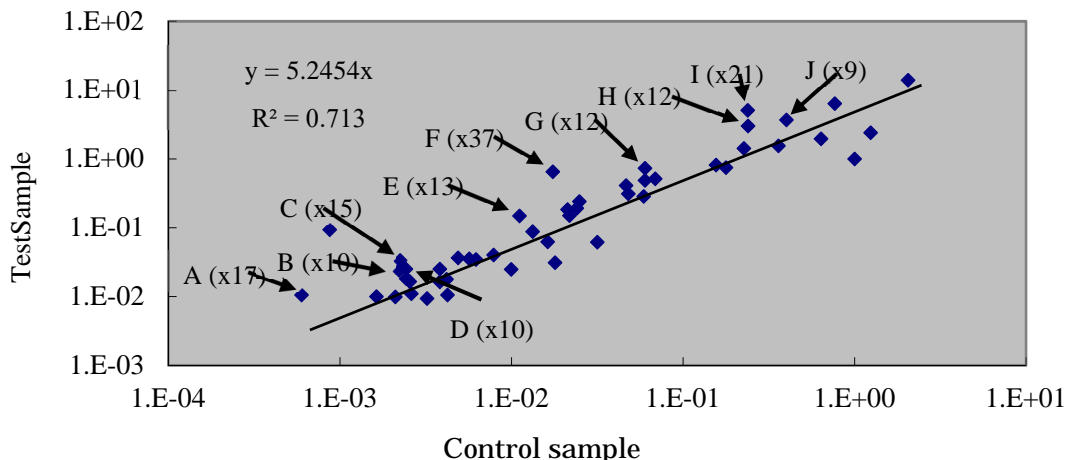


図 2 PrimerArray[®]の結果

低酸素培養時に 10 倍以上の発現量の異なる遺伝子は約 10 個であった。

(3) 低酸素培養による DNA メチル化解析

低酸素培養条件下で mRNA の発現促進を認めた遺伝子のうち、A、E、F、H および I について、イルミナ社ビーズアレイを用いて DNA メチル化解析を行った。その結果、遺伝子 A、H、I については DNA の脱メチル化傾向が認められた。また遺伝子 E、F については DNA のメチル化には差がなかった(表 1)。

gene	control	hypoxia	control	hypoxia
	BA0187_01_a.AVG_Beta	BA0187_02_a.AVG_Beta	(相対比)	(相対比)
A	0.260136333	0.24691	0.540585525	0.459414475
E	0.604552727	0.602964545	0.506465582	0.493534418
F	0.887264	0.885738	0.500432938	0.499567062
H	0.116502857	0.09073	0.565325024	0.434674976
I	0.413318571	0.413981429	0.557636272	0.442363728

表 1. DNA メチル化解析の結果

a.AVG_Beta はメチル化頻度を表す。0 = 完全非メチル化, 1 = 完全メチル化

【考察】

本研究で行った低酸素培養条件では通常培養とで細胞形態の違いはなかった。酸素濃度や培養時間で変化が生じる可能性はあるが今後の課題である。

また primerarray の結果から、5% O₂ に 24 時間という比較的マイルドな低酸素培養条件で、多数の遺伝子の mRNA 発現が促進されていることが明らかとなった。2019 年度のノーベル生理学・医学賞は酸素量検知機構である HIF(Hypoxia Inducible Factor, 低酸素誘導因子)システムを解明した 3 人に送られたが、今回の結果もおそらく HIF が関与している可能性が考えられる。

さらに今回のエピジェネティクスの解析から、遺伝子 A, H および I は低酸素条件で DNA の脱メチル化が生じ、発現が促進されている可能性も明らかとなった。逆に遺伝子 E および F は高度にメチル化されているため、今回のマイルドな低酸素条件では脱メチル化は生じなかったとも考えられる。すなわち遺伝子 A, H および I は HIF とエピジェネティクス制御の両面から遺伝発現が促進している可能性が考えられる。また遺伝子 E および F は HIF のみによる制御ではないかと考えられる。いずれにせよ、詳細な発現調節機構の解明には、今後の解析が必要と考えられた。

歯根膜細胞が低酸素環境下で多数の遺伝子発現が制御されているということは、歯に矯正力を加えて移動させている時の圧迫側でも、血管が圧迫されて同様な低酸素状態が生じている可能性がある。咬合誘導時の歯根膜組織の恒常性維持機構の解明という面で、非常に面白い結果が得られたと考えられる。今後はより詳細な解析を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashi Kifune, Hisanori Ito, Misa Ishiyama, Satoko Iwasa, Hiroki Takei, Tomokazu Hasegawa, Masatake Asano, and Tetsuo Shirakawa	4. 巻 60
2. 論文標題 Hypoxia-induced up-regulation of angiogenic factors in immortalized human periodontal ligament fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Oral Sci	6. 最初と最後の頁 519-525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.17-0441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hisanori Ito, Takashi Kifune, Misa Ishiyama, Satoko Iwasa, Hiroki Takei, Tomokazu Hasegawa, Masatake Asano, and Tetsuo Shirakawa	4. 巻 60
2. 論文標題 Effect of hypoxia on the expression of CCAAT/enhancer-binding protein and receptor activator of NF- κ B ligand in periodontal ligament cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Oral Sci	6. 最初と最後の頁 544-551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.17-0436	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimiko Ueda Yamaguchi, Keita Kawarabayashi, Aya Miyazaki, Rika Kurogohshi, Kokoro Iwata, Asuna Sugimoto, Yuki Akazawa, Tomokazu Hasegawa, Tsutomu Iwamoto	4. 巻 31
2. 論文標題 Prevention of Sports-related Dental Injuries in Children / Review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Health and Biosciences	6. 最初と最後の頁 68-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.20738/johb.31.1_68	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimiko Ueda Yamaguchi, Yuki Akazawa, Kawarabayashi Keita, Asuna Sugimoto, Hiroshi Nakagawa, miyazaki aya, Weih Falk, Kurogoushi Rika, Iwata Kokoro, Takamasa Kitamura, Yamada Aya, Tomokazu Hasegawa, Fukumoto Satoshi and Tsutomu Iwamoto	4. 巻 19
2. 論文標題 Combination of ions promotes cell migration via ERK1/2 pathway in human gingival fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 5039-5045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nan Ma, Di Yang, Hirohiko Okamura, Jumpei Teramachi, Tomokazu Hasegawa, Lihong Qiu, Tatsuji Haneji	4. 巻 2
2. 論文標題 Involvement of interleukin-23 induced by Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide in osteoclastogenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 559-566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2016.6041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshitaka Yoshimura, Takashi Kikui, Tomokazu Hasegawa, Mino Matsuno, Hajime Minamikawa, Yoshiaki Deyama and Kuniaki Suzuki	4. 巻 16
2. 論文標題 How much medium do you use for cell culture? Medium volume influences mineralization and osteoclastogenesis in vitro	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Med Rep	6. 最初と最後の頁 429-434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2017.6611	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugimoto Asuna, Miyazaki Aya, Kawarabayashi Keita, Masayuki Shono, Yuki Akazawa, Tomokazu Hasegawa, Kimiko Ueda Yamaguchi, Takamasa Kitamura, Yoshizaki keigo, Fukumoto Satoshi and Tsutomu Iwamoto	4. 巻 7
2. 論文標題 Piezo type mechanosensitive ion channel component 1 functions as a regulator of the cell fate determination of mesenchymal stem cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18089-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaaki Ikeda, Yoshitaka Yoshimura, Takashi Kikui, Mino Matsuo, Tomokazu Hasegawa, Kumu Fukushima, Takako Hayakawa, Hajime Minamikawa, Kuniaki Suzuki and Junichiro Iida	4. 巻 5
2. 論文標題 Release from optimal compressive force suppresses osteoclast differentiation	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 4699-4705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2016.5801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aya Miyazaki, Asuna Sugimoto, Keigo Yoshizaki, Keita Kawarabayashi, Kokoro Iwata, Rika Kurogohshi, Takamasa Kitamura, Kunihiro Ootsuka, Tomokazu Hasegawa, Yuki Akazawa, Satoshi Fukumoto, Naozumi Ishimaru and Tsutomu Iwamoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Coordination of WNT signaling and ciliogenesis during odontogenesis by piezo type mechanosensitive ion channel component 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51381-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 浅川剛吉、大川真澄、永田夏琳、長谷川智一、宮本洋一、吉村健太郎、笹清人、馬目瑤子、杉山智美、上條竜太郎、島田幸恵
2. 発表標題 Down症候群乳歯歯根膜由来細胞のDYRK1A発現解析
3. 学会等名 第56回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒厚子璃佳、長谷川智一、赤澤友基、杉本明日菜、河原林啓太、上田公子、岩本 勉
2. 発表標題 乳歯歯髓細胞におけるEotaxin-1の発現解析機構の解析
3. 学会等名 第56回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤澤友基、長谷川智一、岩本 勉
2. 発表標題 外傷により両側顎関節完全脱臼を呈した5歳男児の1例
3. 学会等名 第37回中四国地方会大会および総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田こころ、杉本明日菜、黒厚子璃佳、河原林啓太、宮寄 彩、藤島史帆、北村尚正、赤澤友基、尼寺理恵、上田公子、中川 弘、長谷川智一、岩本 勉
2. 発表標題 当科における初診患者の実態調査～平成における30年間の変遷～
3. 学会等名 第37回中四国地方会大会および総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒厚子璃佳、杉本明日菜、岩田こころ、宮寄 彩、河原林啓太、藤島史帆、赤澤友基、北村尚正、上田公子、尼寺理恵、長谷川智一、中川弘、岩本 勉
2. 発表標題 当科における5年間の障害児の初診時実態調査
3. 学会等名 第37回中四国地方会大会および総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉本明日菜、宮寄 彩、河原林啓太、岩田こころ、黒厚子璃佳、長谷川智一、北村尚正、赤澤友基、上田公子、中川 弘、岩本 勉
2. 発表標題 象牙芽細胞におけるピエゾ型イオンチャンネル1 (PIEZ01)の発現とその役割
3. 学会等名 第37回中四国地方会大会および総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeyoshi Asakawa, Yoichi Miyamoto, Kentaro Yoshimura, Kiyoto Sasa, Yoko Manome, Ryutaro Kamiyo, Tomokazu Hasegawa, Naoyuki Chosa, Akira Ishizaki, Masumi Ookawa, Tomomi Sugiyama, Masayasu Shige and Yukie Shimada
2. 発表標題 Establish of expression on differentiation periodontal ligament cells derived from human teeth-Cooperative analysis that SDF-1 regulation of expression on periodontal ligament cells derived from Down syndrome teeth
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒厚子璃佳、赤澤友基、長谷川智一、杉本明日菜、上田公子、岩本 勉
2. 発表標題 乳歯歯髓細胞におけるケモカインCCL11の発現解析
3. 学会等名 第36回中四国地方会大会および総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉本明日菜、赤澤友基、長谷川智一、宮寄 彩、河原林啓太、岩本 勉
2. 発表標題 PIEZ01は歯髓細胞の分化運命決定に関与し、象牙芽細胞への分化を促進させる
3. 学会等名 第55回小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木船 崇、伊藤寿典、石山未紗、岩佐聡子、武井浩樹、長谷川智一、白川哲夫
2. 発表標題 低酸素暴露が株化歯根膜細胞の血管新生因子産生に及ぼす影響
3. 学会等名 第55回小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮寄 彩、杉本明日菜、井上秀人、北村尚正、上田公子、河原林啓太、赤澤友基、長谷川智一、岩本 勉
2. 発表標題 当科における10年間の口唇口蓋裂児の実態調査
3. 学会等名 第55回小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林光一、村澤瑛里子、長谷川智一、岩本 勉
2. 発表標題 ヒト乳歯歯髓細胞によるSDF-1 の発現はTGF- を介してFGF-2により負に制御されている
3. 学会等名 四国歯学会第50回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤澤友基、長谷川智一、帖佐直幸、吉村善隆、浅川剛吉、杉本明日菜、河原林啓太、宮壽彩、石崎 明、岩本 勉
2. 発表標題 ヒト乳歯歯髓細胞のSDF-1発現調節機構におけるALK5の関与について
3. 学会等名 第55回小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤澤友基、上田公子、長谷川智一、岩本勉
2. 発表標題 低位下顎左側第二乳臼歯の再萌出を認めた1例
3. 学会等名 第35回日本小児歯科学会中四国地方会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 林光一、村澤瑛里子、長谷川智一、岩本 勉
2. 発表標題 ヒト乳歯歯髓細胞によるSDF-1 の発現はTGF- を介してFGF-2により負に制御されている
3. 学会等名 四国歯学会第50回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤澤友基、長谷川智一、帖佐直幸、吉村善隆、浅川剛吉、杉本明日菜、河原林啓太、宮寄彩、石崎 明、岩本 勉
2. 発表標題 ヒト乳歯歯髓細胞のSDF-1発現調節機構におけるALK5の関与について
3. 学会等名 第55回小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅川剛吉、久木野真純、長谷川智一、浅川麻美、吉村健太郎、笹清人、松島瞳、新田雅一、永田夏琳、若月宏之、杉山智美、島田幸恵、上條竜太郎、船津多敬弘
2. 発表標題 ダウン症候群永久歯歯根膜由来細胞のマイクロアレイ比較解析
3. 学会等名 第57回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊澤里莉、守谷 有紀、長谷川智一、赤澤 友基、岩本 勉
2. 発表標題 歯根膜細胞における低酸素環境下でのエピジェネティクス制御の解析
3. 学会等名 徳島県歯科医学大会・第56回四国歯学会例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮寄 彩、長谷川智一、岩本 勉
2. 発表標題 乳歯の早期萌出をみる ADAM17 欠損症の1例
3. 学会等名 第 58 回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	吉村 善隆 (YOSHIMURA Yoshitaka) (30230816)	北海道大学・歯学研究院・准教授 (10101)	
研究 協力者	赤澤 友基 (AKAZAWA Yuki)	徳島大学病院・小児歯科・助教	