

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11812

研究課題名(和文) 骨髄間質細胞由来因子による歯周組織再生療法の開発-Down症歯根膜細胞の解析-

研究課題名(英文) Development of the periodontal therapy by the stromal cell derived factor
-Analysis of periodontal ligament cells derived from Down's syndrome -

研究代表者

浅川 剛吉 (Asakawa, Takeyoshi)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20347884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、健康者歯根膜由来細胞とDown症候群歯根膜由来細胞にSV40, hTERTをトランスフェクションした結果、SV40, hTERTの発現と、80回を超える細胞分裂を認めるSTPDLとSTPDLDSを獲得した。遺伝子型解析では、初期培養した細胞でDown症候群の特徴である21番染色体トリソミーを確認し、トランスフェクション後のSTPDLDSにおいて、染色体の倍加を認めた。また、健康者初代培養細胞(pPDL)とSTPDL, STPDLDSは同様の遺伝子発現を認めた。今回、獲得した、STPDLDSはDown症候群患者の歯周疾患の解析に有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダウン症候群は合併症として、心室中隔欠損、白血病などの血液疾患を認める。これらは、21番染色体トリソミーにより、同染色体上にあるDSCR1の発現を活性させ、血管形成に関するカルシニューリンシグナル経路を阻害することが要因として考えられている。これらは、ダウン症候群の歯科的特徴である進行性の歯周炎などにも影響していると考えられる。本研究結果より獲得したSTPDLDSにおいてSV40 Positive, hTERTの有意な活性の上昇、Hayflick limitを超える細胞増殖、DSCR1発現の上昇、核型解析より、染色体の倍加を認めた。これらを解析し歯周疾患の効果的な治療方法を確立する。

研究成果の概要(英文)：We established immortalized periodontal ligament cells obtained from Down's syndrome patients by use of SV40T-Ag and hTERT gene transfection. Expressions of SV40T-Ag and hTERT were observed in periodontal ligament cell-derived immortalized cells established from healthy (STPDL) and Down's syndrome patient (STPDLDS). That showed cell doubling occurred more than 80 times. Simple karyotype analyses were performed to analyze ploidy, aneuploidy, and presence or absence of chromosome translocation. Primary cultured periodontal ligament cells obtained from the patients showed a three occurrences of chromosome 21, whereas STPDLDS samples showed a large number of abnormal chromosomes in those results. Gene expression analysis revealed that both STPDL and STPDLDS retained the same gene expression pattern as pPDL as periodontal ligament cells. These results suggest that the newly established STPDLDS cell line may be a useful tool for study of periodontal disease in Down's syndrome patients.

研究分野：小児成育歯科

キーワード：Periodontal ligament cell Down's syndrome SDF-1 DSCR-1 SV40 hTERT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国民の健康維持、増進のために、全身疾患とも関連のある歯周病の高罹患率を低減させることは、危急の課題である。申請者らはこれまで、ヒト歯根膜細胞の単離培養に成功し、その特徴について解析を行ってきた。中でも間葉系幹細胞誘導因子 Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)は、歯根膜修復において重要な因子でありヒト Down 症 (乳歯・永久歯) 由来歯根膜細胞では、健常者と比較して SDF-1 の発現が有意に低下している可能性を確認した。

Down 症は、染色体異常の中でも頻度の高い疾患であり合併症として、心室中隔欠損、白血病などの血液疾患がある。また歯の先天欠如や解剖学的形態、乳歯から永久歯への交換期遅延など、様々な歯科的特徴を認める。中でも進行性の歯周炎は Down 症患者の歯牙が早期に損失してしまう最大の要因ともなっており、専門家による歯周治療、プラークコントロールを行っても病状の進行を止めることが困難である。さらにサイトカインやケモカイン異常、好中球遊走異常や酸化ストレスと抗酸化物質のアンバランスなど、免疫応答やストレス応答にも特異性が認められるとの報告もあり、環境因子や微生物因子以外の生体因子においても原因があると考えられる。さらに、Down 症の原因遺伝子である 21 番染色体トリソミーは、同染色体上にある DSCR-1 の活性を亢進させ、カルシニューリンシグナル経路を阻害することで様々な器官への影響を認める。これは腫瘍による血管新生においても同様であり、結果として Down 症は、固形癌による死亡リスクが一般集団のわずか 10%である (Nature, 2009, 459:1126-1130.)。筆者は DSCR-1 の活性による血管新生の抑制は歯周疾患の治療をも困難にしていると考えている。

2. 研究の目的

本研究は自己治療能力を高めることによる歯周組織再生医療技術を確立することを目的として、重篤な歯周疾患を特徴とする Down 症と健常者歯根膜細胞を継続的に実験試料として使用するために、human telomerase reverse transcriptase および Simian Virus 40 large T antigen の遺伝子導入、single cell cloning を行う。健常者と Down 症患者のヒト歯根膜細胞を対比することにより分化能差やストレス応答差から血管新生に関与するタンパク質の発現制御機構、SDF-1 発現調節機構についてのリクルートメントを解明する。

3. 研究の方法

ヒト永久歯歯根膜由来細胞の分離培養

本学歯科病院において、歯科治療を目的として抜去された健常者・上顎第一小臼歯、上顎第三大臼歯から歯根膜組織を無菌的に分離培養し、永久歯歯根膜由来細胞 (pPDL) を獲得した。

ヒト Down 症候群永久歯歯根膜由来細胞の分離培養

本学歯科病院において、歯科治療を目的として抜去された Down 症候群患者・上顎第一小臼歯から歯根膜組織を無菌的に分離培養し Down 症永久歯歯根膜由来細胞を獲得した。

SDF-1 発現解析

SDF-1 mRNA 発現誘導を調べる目的で、fibroblast growth factor-2 (FGF-2) 10ng/ml の濃度で 24 時間、48 時間投与後、Trisol (Invitrogen) を使用して total RNA を抽出した。その後タカラの SYBR Green I 検出による 2 ステップ Real-time RT-PCR によって SDF-1 mRNA の発現を検討した。各遺伝子のプライマーは Perfect Real Time サポートシステムより調製したものを使用した (Table.1)。

DNA マイクロアレイ比較解析

永久歯根膜由来細胞と Down 症永久歯根膜由来細胞を confluent の状態で、Trisol(Invitrogen) を使用して total RNA を抽出し、Clariom Array(アフィメトリクス)による cDNA マイクロアレイ解析を行った。

hTERT, SV40 トランスフェクション

永久歯根膜由来細胞と Down 症永久歯根膜由来細胞に Simian virus 40 Large T (SV40) および human telomerase reverse transcriptase (hTERT) の発現ベクターを導入後、G418 選択培地にて培養、single cell cloning を行った。

RT-PCR 解析

pPDL、STPDL、STPDLDS それぞれを confluent の状態で、Trisol(Invitrogen)を使用して total RNA を抽出した。その後、PrimeScript™RT-PCR Kit(タカラバイオ)を用いて逆転写反応を行い cDNA の RT-PCR 解析を行った(two-step 法)。各遺伝子のプライマーは(Table.2)を用いた。

Gene name Primer Oligonucleotide sequence (5' -3')

SDF-1	F 5' -GAGCCAACGTCAAGCATCTCAA-3' /
	R 5' -TTAGCTTCGGGTCAATGCACAC-3'

Table.1

Gene name	Oligonucleotide sequence (5'-3')
GAPDH	F 5'-ACCACAGTCCATGCCATCCAC-3'/
	R 5'-TCCAC CACCCTGTTGCTGTA-3'
RUNX2	F 5'-CCCCACGACAACCGCACCAT-3'/
	R 5'-GTCCACTCCGGCCCACAAATC-3'
Osterx	F 5'-CCTGGCTGCGGCAAGGTGT-3'/
	R 5'-GATCTCCAGCAAGTTGCTCTGC-3'
ALP	F 5'-GCCTGGCTACAAGGTGGTG-3'/
	R 5'-GGCCAGAGCGAGCAGC-3'
OPN	F 5'-CCCTTCCAAGTAAGTCCAACGAAAGC-3'/
	R 5'-CTGGATGTCAGGTCTGCGAAACTTC-3'
OCN	F 5'-GGTGACGCTTTGTGTCCAAGC-3'/
	R 5'-GGCAAGGGGAAGAGGAAAGAAGG-3'
Periostin	F 5'-CACAACTGGAGACTGGAC-3'/
	R 5'-GTGTCTGCTGGATAGAGGAG-3'
EGFR	F 5'-CCCATTTCCTTCCCTCCACTCC-3'/
	R 5'-GCCTTCAAGACCTGGCCC-3'
Col XII	F 5'-CGGACAGAGCCTTACGTGCC-3'/
	R 5'-CTGCCCGGTCCGTGG-3'
α-SMA	F 5'-AGCAAGGGATCAAGAAGCAA-3'/
	R 5'-ATTCTGAGTCAACGGCATCC-3'

Table.2

4. 研究成果

健常者永久歯根膜細胞 (pPDL) および Down 症候群永久歯根膜細胞を無菌的に分離培養した。それぞれに Simian virus 40 Large T (SV40) および human telomerase reverse transcriptase (hTERT) の発現ベクターを導入後、G418 選択培地にて培養、single cell cloning し、株化永久歯根膜由来細胞(STPDL)と株化 Down 症永久歯根膜由来細胞(STPDLDS) を獲得した。

獲得した細胞の免疫染色を行い、STPDL と STPDLDS は共に SV40 positive hTERT 発現の上昇を確認した。また、population doubling level も 80 を超えて確認した。pPDL、STPDL、STPDLDS それぞれの RT-PCR 解析の結果、RUNX2、Osterix、ALP、OPN、OCN、Periostin、ECFR、ColmXII、-SMA、の発現を認めた(Fig.1)。SDF-1 発現解析の結果、FGF-2 を投与後、永久歯根膜細胞において 24,48 時間後には有意に SDF-1 の発現が抑制された。ま

た、Down 症歯根膜細胞では FGF-2 の影響を認めなかった(Fig.2)。

pPDL と Down 症候群永久歯歯根膜歯細胞のマイクロアレイ比較解析より、Down 症候群永久歯歯根膜歯細胞において RCAN1 の発現の上昇を確認した(Fig.3)。

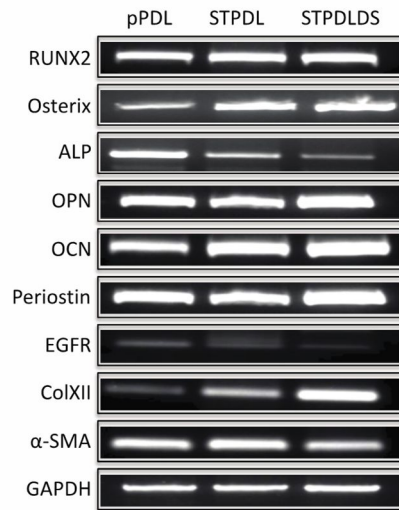


Fig.1

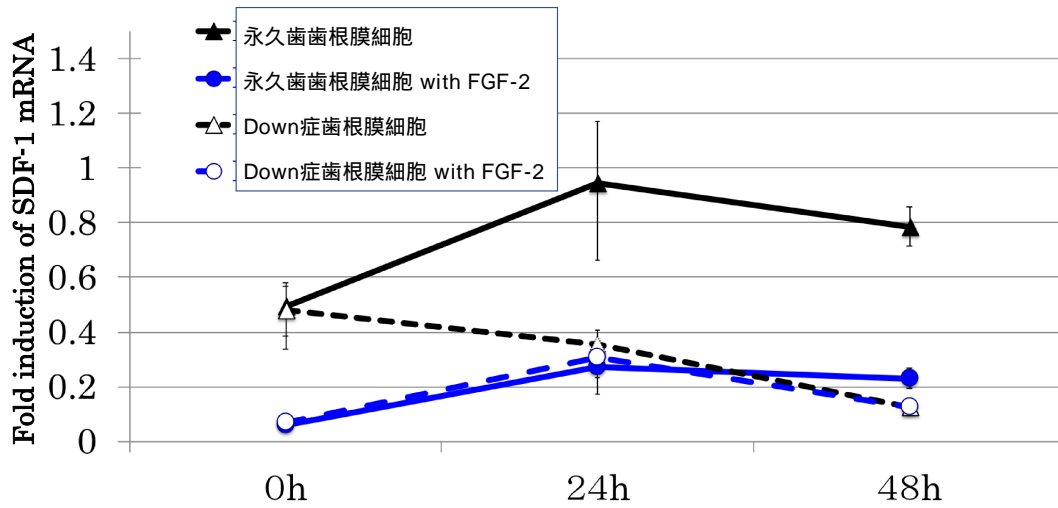


Fig.2

POSTN	periostin, osteoblast specific factor	7773.738	223078.9
RCAN1	regulator of calcineurin 1	1602.233	12879.44
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	123727.5	395754.9
OCLN	occludin	73.16888	148.0896
OPN3	opsin 3	149.4059	69.98627
TGIF2	TGFB-induced factor homeobox 2	108.8629	46.1914
BMP2K	BMP2 inducible kinase	7560.2	2439.46
OGN	osteoglycin	350.7849	31.19149
TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	46706.89	1789.152

Fig.3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 浅川 剛吉, 大川 真純, 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55回 日本小児歯科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeyoshi Asakawa, Yoichi Miyamoto, Atsushi Yamada, Kentaro Yoshimura, Sasa Kiyohito, Tomokazu Hasegawa*, Yoko Manome, Masumi Okawa, Masayasu Shiga, Tomomi Sugiyama, Ryutarō Kamijo and Yukie Shimada.
2. 発表標題 DSCR1 expression on periodontal ligament cell derived from Down syndrom
3. 学会等名 96th International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅川 剛吉
2. 発表標題 ヒト歯根膜由来細胞株の確立ーDown症候群由来細胞とのSDF1 発現解析ー
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeyoshi Asakawa
2. 発表標題 Establishing and SDF-1 regulation of expression on periodontal ligament cells derived from human teeth
3. 学会等名 国際歯科研究学会 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Asakawa Takeyoshi(Showa University), Miyamoto Yoichi, Yoshimura Kentaro, Sasa Kiyohito, Hasegawa Tomokazu, Chosa Naoyuki, Ishisaki Akira, Kadena Miki, Manome Yoko, Kuritani Miku, Kamijo Ryutarou, Funatsu Takahiro, Shimada Yukie
2. 発表標題 ヒトの歯に由来する歯周靭帯細胞株の樹立とSDF-1 の発現調節の分析(Establishing and SDF-1 Regulation of Expression on Periodontal Ligament Cells derived from Human Teeth)
3. 学会等名 国際小児歯科学会(国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Akazawa Yuki(Tokushima University), Hasegawa Tomokazu, Yoshimura Yoshitaka, Chosa Naoyuki, Asakawa Takeyoshi, Sugimoto Asuna, Kitamura Takamasa, Ueda Kimiko, Kawarabayashi Keita, Ishisaki Akira, Takahashi Riku, Suehiro Yoto, Iwamoto Tsutomu
2. 発表標題 歯髄細胞におけるFGF2によるSDF-1 の抑制の分子機序(Molecular Mechanisms of SDF-1 Suppression by FGF2 in Dental Pulp Cells)(英語)(会議録)
3. 学会等名 国際小児歯科学会(国際学会)
4. 発表年 2016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 健太郎 (Yoshimura Kentaro) (10585699)	昭和大学・口腔生化学・助教 (32622)	
研究分担者	宮本 洋一 (Miyamoto Youichi) (20295132)	昭和大学・口腔生化学・准教授 (32622)	
研究分担者	長谷川 智一 (Hasegawa Tomokazu) (50274668)	徳島大学・小児歯科・講師 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	上條 竜太郎 (Kamijo Ryutaro) (70233939)	昭和大学・口腔生化学・教授 (32622)	