

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15846

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集による新しい歯周組織再生分子標的薬の探索

研究課題名(英文) Feasible research for novel periodontal regeneration therapeutics by CRISPR/Cas9

研究代表者

山田 聡 (YAMADA, Satoru)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：40359849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Cas9を用いて歯周組織構成細胞のゲノムを編集することにより、歯周組織再生機構に重要な役割を担う遺伝子の同定・単離を試みた。まず、歯根膜機能に様々な役割を担っている遺伝子(PLAP-1、Decorin、Biglycan)を機能欠失させるsgRNA-CRISPR/Cas9発現プラスミドを構築した。歯根膜細胞株(MPDL22)を用いた遺伝子導入実験の結果、各遺伝子特異的sgRNA-CRISPR/Cas9発現プラスミドの導入効率が低いことが明らかとなった。そこで、複数のゲノム領域編集を容易にするため、現在、PLAP-1遺伝子ノックアウトマウスからの歯根膜細胞株樹立を行っている。

研究成果の概要(英文)：In order to develop novel periodontal regeneration therapeutics, we tried to develop genome editing in periodontal ligament cells using CRISPR/Cas9 system. First, we selected PLAP-1, Decorin and Biglycan genes as targets for CRISPR/Cas9 mediated gene editing. We constructed specific sgRNA-CRISPR/Cas9 expression plasmid and performed gene transfection into MPDL22 cells. Since gene transfer efficiency was not good enough for gene editing in MPDL22 cells, we are currently trying to establish primary periodontal ligament cells from PLAP-1 KO mice. The primary PLAP-1 KO cells will be helpful to edit single genomic locus of Decorin or Biglycan by CRISPR/Cas9.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯根膜 ゲノム編集 CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

医科領域においてサイトカインの医療への応用が急速に進展しており、本邦でも、FGF-2 を用いた歯周組織再生サイトカイン療法が臨床適応可能となっている。一方、その先を見据えたとき、サイトカインよりもさらに薬理効果が高く副作用も少ない分子標的薬が世界的な注目を集めており、歯周組織再生分野においても、次世代型の分子標的薬開発は喫緊の課題である。近年、部位特異的ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 を用いて、標的とする遺伝子を細胞内で自由自在に改変するゲノム編集技術が飛躍的に進歩している (Kim H and Kim JS. Nat Rev Genet 2014)。そこで、我々は、この革新的ゲノム編集ツール CRISPR/Cas9 を用いて様々な歯周組織構成細胞の遺伝子を網羅的にノックアウトし、細胞機能的なスクリーニングを行うことにより、細胞分化や細胞増殖など歯周組織再生機構に関わる重要な遺伝子を新たに同定・解析することで、歯周組織再生治療における新しい標的分子候補を見出すという挑戦的萌芽研究の着想に至った。歯周組織再生機能を指標とした CRISPR/Cas9 による細胞機能的ゲノミクスにより、新たな歯周組織再生制御遺伝子を同定、解析することで、サイトカイン療法よりもさらに効果的で副作用が低い次世代型の歯周組織再生分子標的薬の候補分子を探索に繋がる可能性もある。現在、医科においては、様々な疾患に対する特異抗体製剤やシグナル分子阻害薬といった次世代型の分子標的薬の研究開発、臨床応用が進められている。歯科においても次世代型の分子標的薬開発は非常に重要な研究テーマであり、本研究は、歯科における新型治療薬開発の新たなブレークスルーになり得る可能性を持つものと考えられる。

2. 研究の目的

ここ数年の急速な技術革新によって開発されたゲノム部位特異的ヌクレアーゼのなかでも、2013年に報告された CRISPR/Cas9 は、遺伝子配列に特異的な合成 sgRNA が結合したゲノム部位に DNA2 本鎖切断を起こし、その遺伝子をノックアウトする。その高い効率性と特異性から、21世紀の夢のバイオテクノロジーツールと言われている。ゲノム編集機能を有する CRISPR/Cas9 は、両対立遺伝子座の遺伝子ノックアウトが可能であり、既存の RNAi 技術と比較しても優れた遺伝子ノックアウトを完全に行うことができる。本研究では、この CRISPR/Cas9 を用いて歯周組織構成細胞のゲノムを自由自在に編集することにより、歯周組織再生機構に重要な役割を担う遺伝子を新たに同定・単離する。そこで、まず、この CRISPR/Cas9 エンドヌクレアーゼを用いて歯周組織構成細胞機能に重要な役割を担っている遺伝子を *in vitro* において機能欠失させることにより、歯周組織の恒常性維持や再生機構にどのよう

な影響が及ぶのかを明かとし、それらの機能解析することにより、将来的に、同遺伝子・分子群を候補分子ターゲットとした歯周組織再生分子標的薬の開発に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯周組織の恒常性維持遺伝子の特異的 sgRNA の設計について

歯周組織の恒常性維持や炎症制御に重要な機能を果たしている細胞外基質タンパク (ECM) に関連する遺伝子群 (PLAP-1、Decorin、Biglycan) のゲノム配列に特異的な遺伝子ノックアウト用の sgRNA プライマーを設計した。設計する際には、sgRNA の非特異的な効果 (バースタンド効果) が起きにくい部位を選択した。同プライマーを用いた PCR 法により、各遺伝子特異的 sgRNA シークエンスを増幅した。次に、ゲノム編集タンパクである CRISPR/Cas9 発現用プラスミドに同 sgRNA を組み込み、一つのプラスミドにて CRISPR/Cas9 と遺伝子特異的 sgRNA を同時に発現出来るようなプラスミドを遺伝子組換えにより作製した。

(2) CRISPR/Cas9 プラスミドの細胞への導入効率実験

(1) にて作製したプラスミドを電気的遺伝子導入法を用いて、293 細胞およびマウス歯根膜細胞株 (MPDL22) にトランスフェクションした。遺伝子導入後、24 時間後に、蛍光顕微鏡にて組換えタンパク質の発現をプラスミドに組み込んだ OFP (オレンジ蛍光タンパク) の発現を観察した。

(3) 歯根膜細胞におけるゲノム編集

MPDL22 細胞に、PLAP-1、Decorin、Biglycan のゲノム領域に対して各 sgRNA プラスミドを単独、あるいは同時に遺伝子導入することにより、同遺伝子の発現を抑制したダブルノックアウト、トリプルノックアウト細胞の樹立を試みた。同トランスフェクタントから、通法にしたがい、全 RNA を抽出、精製した。PLAP-1、Decorin、Biglycan 特異的な PCR プライマーを用いた Real-time PCR 解析により、各遺伝子の発現を比較検討した。

(4) PLAP-1 遺伝子改変マウス歯根膜細胞株の樹立

6~8 週齢の PLAP-1 ノックアウトおよび野生型マウスに全身麻酔を施した後、眼科用ピンセットにて上顎臼歯を抜歯した。次に、歯根表面の歯根膜組織をスケーリングにより採取した。同組織をコラゲナーゼ処理し、歯根膜構成細胞を遊離させ、同細胞を 96 マイクロウエルに単離播種した。培養培地に細胞増殖誘導作用を持つ FGF-2 (10 ng/ml) を添加し、長期培養した。ウエル内で増殖を認められた細胞を単離し、継代した。

4. 研究成果

(1) 歯周組織恒常性維持遺伝子特異的 sgRNA - CRISPR/Cas9 発現プラスミド

歯周組織の恒常性維持に重要な役割を担っていることが示されている PLAP-1、Decorin、Biglycan、それぞれに特異的なゲノム編集用 sgRNA-CRISPR/Cas9 発現プラスミドを遺伝子組換え技術にて作製することが出来た。同プラスミドは、各遺伝子のゲノム領域に特異的な sgRNA と、ゲノム編集エンドヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 を細胞内で同時に発現させることから、効率的なゲノム編集を誘導する有効なゲノム編集用プラスミドと思われる。

(2) 歯周組織恒常性維持遺伝子特異的 sgRNA - CRISPR/Cas9 発現プラスミドの導入効率

歯周組織恒常性維持遺伝子特異的 sgRNA - CRISPR/Cas9 発現プラスミドを 293 細胞へ遺伝子導入した結果、OFP の蛍光発色を指標とした場合、ほぼ 100% の遺伝子導入効率が認められた。そこで、各 sgRNA - CRISPR/Cas9 発現プラスミドを MPDL22 細胞へ遺伝子導入し、その導入効率を解析した。その結果、293 細胞においては認められた高い導入効率が、MPDL22 では、低いことが明らかとなった。様々な遺伝子導入条件を試すことで、MPDL22 への同 sgRNA 発現 CRISPR/Cas9 発現プラスミドの遺伝子導入効率の上昇を試みたが、293 細胞と比較して、その遺伝子導入、発現は低いことが明らかとなった。

(3) 歯根膜細胞におけるゲノム編集

歯根膜 ECM 遺伝子 (PLAP-1、Decorin、Biglycan) を特異的にゲノム編集することが出来ように設計した sgRNA - CRISPR/Cas9 発現プラスミドの遺伝子導入効率は、MPDL22 細胞において低いことが明らかとなったが、細胞クローンレベルでは、ゲノム編集が誘導され、遺伝子ノックアウトが起きている可能性が考えられた。そこで、各 sgRNA - CRISPR/Cas9 発現プラスミドを遺伝子導入した MPDL22 細胞から、全 RNA を抽出し、PLAP-1、Decorin、Biglycan 遺伝子の発現をコントロールプラスミドを導入した対照群と Real-time PCR 法にて比較検討したところ、各実験群において、特異的な遺伝子発現の低下は認められなかった。

次に、各 sgRNA - CRISPR/Cas9 発現プラスミドを同時に MPDL22 細胞へ遺伝子導入し、同トランスフェクタントから、全 RNA を抽出、精製し、PLAP-1、Decorin、Biglycan 遺伝子の発現をコントロールプラスミドを導入した対照群と Real-time PCR 法にて比較検討することで、ダブルノックアウト、トリプルノックアウトの誘導がされているか否かについて検討を行った。その結果、ダブ

ルノックアウト、トリプルノックアウトの誘導は、観察されなかった。

(4) PLAP-1 遺伝子改変マウスの歯根膜組織からの歯根膜細胞株の樹立

MPDL22 細胞において、歯周組織恒常性維持遺伝子特異的 sgRNA - CRISPR/Cas9 発現プラスミドによるゲノム編集の誘導は、同上の条件では難しいことが明らかとなったため、我々の研究室で保有している PLAP-1 ノックアウトマウスから歯根膜細胞株を樹立し、同細胞株において、Decorin および Biglycan 遺伝子特異的 sgRNA - CRISPR/Cas9 発現プラスミドを用いて、歯根膜 ECM のダブルノックアウト、トリプルノックアウトを誘導することを試みることにした。

マウス歯根膜組織からの歯根膜細胞株の単離には、幹細胞の増殖を強力に促進する FGF-2 を培養系に添加することで、out-growth する細胞の単離効率を高めた。現在、野性型マウスおよび PLAP-1 ノックアウトマウスの歯根膜から out-growth した細胞群を単離している。複数の細胞株を樹立後、歯根膜マーカーである PLAP-1、Periostin の発現解析、および硬組織形成細胞への分化誘導実験などを行うことで、得られた細胞株が、歯根膜細胞の特性を有しているかを解析していく予定である。

今後は、上記にて樹立された PLAP-1 ノックアウト歯根膜細胞株を用いて、Decorin および Biglycan 遺伝子特異的 sgRNA - CRISPR/Cas9 発現プラスミドによる歯根膜 ECM のダブルノックアウト、あるいはトリプルノックアウト細胞を確立することにより、同 ECM の欠損が、歯根膜細胞機能に及ぼす影響を、ゲノム編集技術を用いて明かしていく予定である。歯根膜の機能解析において、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集の有効性を高めることが出来れば、将来、網羅的な遺伝子機能スクリーニングへの適応や、ゲノム編集による歯周炎治療薬の創薬開発など、様々な研究応用への可能性に繋がることが期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

山田 聡、細胞外マトリックスによる歯周組織の恒常性維持と破綻の分子メカニズム、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年 9 月 16-17 日、松本歯科大学 (長野県塩尻市)

〔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 聡 (YAMADA, Satoru)
東北大学大学院歯学研究科・教授
研究者番号：40359849

(2)研究分担者

山下元三 (YAMASHITA, Motozo)
大阪大学歯学部附属病院・講師
研究者番号：90524984

竹立匡秀 (TAKEDACHI, Masahide)

大阪大学歯学部附属病院・講師
研究者番号：60452447

(3)研究協力者

木下昌毅 (KINOSHITA, Masaki)
大阪大学大学院歯学研究科・大学院生