

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20669

研究課題名(和文) 脂肪組織由来多系統前駆細胞移植による歯周組織再生誘導におけるIGFBP6の役割

研究課題名(英文) The role of IGFBP6 in periodontal tissue regeneration by adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cell transplantation

研究代表者

沢田 啓吾 (Sawada, Keigo)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70733054

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)：本研究課題では、IGFBP6が歯根膜細胞(HPDL)の分化を促進的に制御する分子機序について、IGF依存のおよびIGF非依存の経路の両面から解析を行った。まず、HPDLの分化誘導時にIGF2を添加したが同細胞の分化には影響が認められず、一方で、ADMPCが分泌するIGF2の濃度はIGFBP6の濃度よりも低いことが明らかとなった。また、ADMPCはIGFBP6だけでなく、様々な細胞外基質タンパクを発現していることが明らかとなった。これらの結果から、ADMPCが分泌するIGFBP6はIGF以外の液性因子と協調的に作用することで歯根膜細胞を活性化し、組織再生を誘導する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the molecular mechanism of IGFBP6 promoting the differentiation of periodontal ligament cells (HPDL) from both aspects of IGF-dependent and IGF-independent pathway. First, IGF2 was added at the time of differentiation induction of HPDL, but no effect was observed. In addition, it was revealed that the concentration of IGF2 secreted by ADMPC is lower than the concentration of IGFBP6. It was also revealed that ADMPC express not only IGFBP6 but also various extracellular matrix proteins. These results suggested that IGFBP6 secreted by ADMPC acts cooperatively with humoral factors other than IGF, thereby activating periodontal ligament cells and inducing tissue regeneration.

研究分野：歯周組織再生医学

キーワード：歯学 再生医学 歯周再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

現在行われている歯周組織再生療法は、歯周組織内在性の幹細胞を活性化することで、歯周組織の再生誘導をはかる治療法である。しかしながら、組織内在性の幹細胞数は加齢により減少することや、その増殖能や分化能も低下することが知られている。そこで、他の組織より幹細胞を採取し、同幹細胞を歯周組織欠損部へ移植することにより、組織再生を誘導することが有用と考えられる。

申請者らは、犬実験的歯周病モデルにおいて、間葉系幹細胞である脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC: Adipose tissue Derived Multi lineage Progenitor Cell) を足場材のフィブリンゲルとともに歯周組織欠損部位に移植することで、ADMPC 移植による組織再生誘導効果を明らかにした。また、同再生療法における組織再生機序を明らかにするために、ADMPC 由来 Trophic 因子 (液性因子) について解析を行い、同因子が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進的に制御すること、また同制御に IGFBP6 (Insulin Like Growth Factor Binding Protein 6) が関与することを明らかにしてきた。しかしながら、ADMPC 由来の IGFBP6 が如何なる分子機序により歯根膜細胞の分化を制御するのか、ADMPC が分泌する IGFBP6 が他の歯周組織構成細胞に作用するかどうか、また分化以外の細胞機能を制御するのか、については全く情報がない。IGFBP は IGF と選択的に結合する分子で、IGFBP1 から 7 までがクローニングされている。IGFBP は、体内の様々な細胞での発現が報告されており、血液や組織中の IGF (Insulin like growth factor)-1、2 と結合し、IGF 受容体との結合性を制御することで、IGF の半減期や組織への移行性を調節し、その活性制御に重要な役割を果たすことが報告されている。特に、IGFBP6 は IGF-2 と特異的に結合する分子であることが報告されていることから、IGFBP6 の作用機序として、IGF-2 の機能制御による IGF 依存的経路の存在が考えられる。すなわち、ADMPC 由来の IGFBP6 が、IGF-2 との結合性を調節することで、歯根膜細胞の分化の制御に関与することが考えられる。一方で興味深いことに、IGFBP6 が骨芽細胞のビタミン D 受容体 (VDR) に結合し、VDR シグナルの制御に関与することが報告されている。また、歯根膜細胞の分化における VDR シグナルの重要性が報告されていることから、IGFBP6 による分化制御作用が VDR の活性化制御を介した IGF 非依存的経路による可能性についても示唆されている。

以上のことから、歯周組織再生において、間葉系幹細胞の産生する IGFBP6 が歯周組織構成細胞を活性化し、細胞機能を賦活化することで、再生を促進的に制御していると推察されるが、IGF 依存的経路、IGF 非依存的経路のいずれの経路がその機序に関与しているかについては明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、IGFBP6 が歯根膜細胞 (HPDL) の分化を促進的に制御する分子機序について、IGF 依存的経路と IGF 非依存的経路の両面から解析を行う。この両者の知見から、間葉系幹細胞の Trophic 因子 (液性因子) による組織再生誘導効果の分子機序を解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) IGFBP6 による歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化促進メカニズムにおける IGF 依存的経路の解析

IGFBP6 による HPDL の硬組織形成細胞への分化促進作用が、HPDL の IGF 依存的経路を介したものであるかを明らかにするために、HPDL の硬組織形成細胞への分化誘導時にリコンビナント IGF-2 の添加を行い、さらに、リコンビナント IGF-2 と IGFBP6 を同時に添加し、HPDL の硬組織形成関連遺伝子の発現について解析を行った。つまり、6well Plate に HPDL を播種し、サブコンフルエントになるまで培養した後に、硬組織分化誘導培地 (10mM  $\beta$ -グリセロリン酸、50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸含有  $\alpha$ -MEM) にて培養を行い、硬組織形成細胞分化関連遺伝子の発現について検討を行った。

次に、ADMPC に含まれる IGF-2、IGFBP6 の濃度の検討を行った。すなわち、10cm dish に ADMPC、HPDL を播種し、サブコンフルエントになるまで培養を行った後、10%FCS 含有 D-MEM を添加し、3日間培養を行った。その後、同培養上清を回収し、さらに遠心分離を行い、上清を回収したものを ADMPC-CM、HPDL-CM とし、培養上清中の IGF-2 濃度を ELISA にて解析を行った。

(2) ADMPC 培養上清の網羅的プロテオーム解析による IGF 非依存的経路の解析

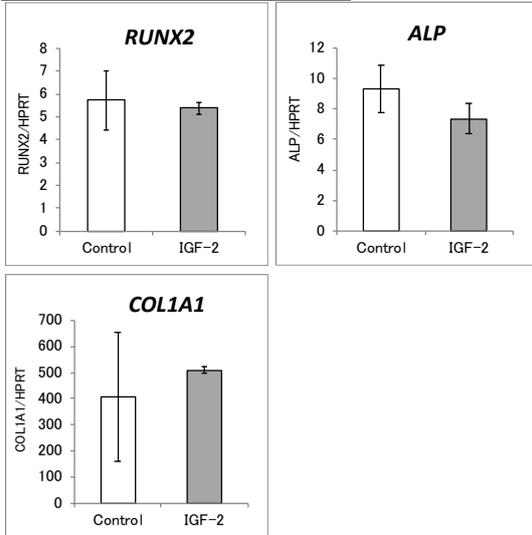
間葉系幹細胞は IGFBP6 以外にも様々な Trophic 因子を産生することで組織再生を誘導することが報告されている。また、IGFBP6 は他の様々な分子と協調的に作用することが報告されている。そこで、IGFBP6 の歯周組織再生誘導効果に、IGF 関連因子以外の Trophic 因子が関与しているかを明らかにするために、ADMPC を用いて網羅的プロテオーム解析を行った。すなわち、(1) と同じ方法で ADMPC とヒト線維芽細胞の培養上清の回収を行い、それぞれ ADMPC-CM、FIB-CM とした。次に、各試料を濃縮し、還元処理・アルキル化処理を行った後に、トリプシン消化を行ったものを MS 解析評価用の試料とし、解析を行った。MS 解析用試料の nanoLC-MS/MS 分析は、液体クロマトグラフ (LC) に Ultimate3000、質量分析装置 (MS) に Q-Exactive Plus を使い、Xcalibur で LC 及び MS を制御して測定を実施した。試料中のタンパク質の MS/MS データについて、Swiss-Plot データベース内で検索を行った。

#### 4. 研究成果

(1) IGFBP6 による歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化促進メカニズムにおける IGF 依存的経路の解析

HPDL の硬組織形成細胞への分化誘導時に、リコンビナント IGF-2 を添加したところ、IGF-2 添加群は、対照群 (石灰化誘導のみ) と比較して、硬組織形成関連遺伝子である *RUNX2*、*ALP*、*COL1A1* の発現において有意な差は認めなかった。

図 1. IGF-2 添加時における HPDL の硬組織形成細胞分化関連遺伝子の発現



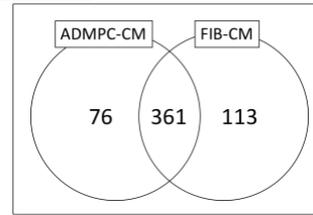
また、HPDL の硬組織形成細胞への分化誘導時において、リコンビナント IGF-2 およびリコンビナント IGFBP6 を同時に添加したところ、IGF-2 と IGFBP6 を添加した群は、IGFBP6 のみを添加した群と比較して、硬組織形成関連遺伝子の発現において、有意な差は認めなかった。この両者の結果から、HPDL の硬組織形成細胞への分化において、IGFBP6 と IGF-2 の協調的な役割は認められなかった。

次に、ADMPC 培養上清中に含まれる IGFBP6 と IGF-2 の濃度を解析した結果、IGFBP6 の濃度は約 100 ng/ml、IGF-2 の濃度は約 30 ng/ml であることが明らかとなった。これまでの研究成果より、リコンビナント IGFBP6 は 200 ng/ml を HPDL の石灰化誘導時に添加しても分化促進作用を認めないことが明らかとなっている (400 ng/ml の添加にて、石灰化関連遺伝子の発現上昇を認めた)。これらの結果から、ADMPC 培養上清中に含まれる IGFBP6 は IGF 非依存的経路を介して、HPDL の分化を制御している可能性が示唆された。

(2) ADMPC 培養上清の網羅的プロテオーム解析による IGF 非依存的経路の検討

ADMPC 培養上清 (ADMPC-CM) および線維芽細胞培養上清 (FIB-CM) の網羅的プロテオーム解析を行ったところ、合計 550 個のタンパク質が検出された。ADMPC-CM のみで発現が認められた因子が 76 個、FIB-CM のみで発現が認められた因子が 113 個、両群で発現が認められた因子が 361 個検出された。

図 2. ADMPC、線維芽細胞の培養上清のプロテオーム解析



次に、ADMPC 特異的に発現している 76 因子の発現量を解析したところ、Semaphorin-7a、Heat shock Protein beta-1 等の因子が認められた。

図 3. ADMPC が特異的に発現している因子

因子	発現量
Semaphorin-7A	1.17
Protein A	0.66
Protein B	0.65
Protein C	0.63
Heat shock protein beta-1	0.62

その中で特に ADMPC が線維芽細胞よりも多く発現している因子としては、Periostin、COMP (Cartilage oligomeric matrix protein)、NRP-1 (Neuropilin-1) 等が検出された。

図 4. ADMPC が線維芽細胞よりも多く発現している因子

因子	発現比 (ADMPC-CM/FIB-CM)
Periostin	34.84
COMP	24.03
NRP-1	7.81
Protein D	7.43
Protein E	6.62
Protein F	6.27
TGF $\beta$ -1	5.34

Periostin、COMP は歯根膜細胞で特に高い発現が報告されている細胞外基質タンパクであり、NRP-1 は血管内皮細胞を活性化して、血管新生を誘導することが報告されている。これらの結果から、ADMPC 培養上清中に含まれる IGF 以外の Trophic 因子が IGFBP6 と協調的に作用し、歯根膜細胞や血管内皮細胞を活性化することで、歯周組織再生に関与する可能性が示唆された。今後は、これらの Trophic 因子をさらに解析することで、間葉系幹細胞による組織再生の分子機序をより詳細に明らかにしていきたいと考えている。

#### 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)

[学会発表] (計 3 件)

① 竹立匡秀、沢田啓吾、岩山智明、柏木陽一郎、山本智美、森本千晶、平井麻絵、野崎剛徳、北村正博、村上伸也: 脂肪組織由来多系統前駆細胞移植による歯周組織再生療法の安全性・有効性評価、2017 年 6 月 9 日、リンクステーション青森 (青森県 青森市)

② K Sawada, M Takedachi, T Iwayama, C Morimoto, A Hirai, S Murakami: Analysis

of trophic effects of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cell (ADMPC) on the periodontal regeneration, Osteology Japan 2017、2017年6月1日、ソラシティカンファレンスセンター(東京都千代田区)

③M Takedachi, K Sawada, T Iwayama, S Yamamoto, C Morimoto, A Hirai, C Man Lee, H Okura, A Matsuyama, Y Sano, M Kitamura, S Murakami: Periodontal tissue regeneration by adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cell transplantation, The 102nd Annual Meeting of the American Academy of Periodontology, 2016年9月12日, San Diego Convention Center (USA CA)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

沢田 啓吾 (SAWADA, Keigo)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70733054