

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06945

研究課題名(和文) Activin Aの選択的分化誘導能を応用した新規歯周組織再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of the new periodontal tissue regeneration therapy applying selective differentiation-inducing ability of Activin A

研究代表者

杉井 英樹 (Sugii, Hideki)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80802280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Activin Aによるヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化誘導機序およびヒト前骨芽細胞の骨芽細胞分化誘導機序を明らかとするため、activin like kinase-1(ALK1)および-4(ALK4)に着目し、ヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化が、ALK4-Smad2/3を介し、ヒト前骨芽細胞の骨芽細胞分化がALK1-Smad1/5/9を介することを明らかとした。以上より、Activin Aはヒト歯根膜細胞とヒト前骨芽細胞に対して異なる受容体を介して分化誘導を行い、Activin Aという1種のサイトカインのみで細胞により異なる分化誘導を行うことで、歯周組織再生に寄与していることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Activin Aが、ヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化を促進する一方、ヒト前骨芽細胞に対しては骨芽細胞分化を増進し、細胞種により異なる分化誘導能を有することを明らかにし、軟組織および硬組織に対して、顕著な再生効果を有する新規のサイトカイン療法の開発へと繋げていくことができる可能性が示唆された。このように、硬組織および軟組織への分化を同時に誘導するサイトカインはこれまでに報告されておらず、Activin Aは、重度のう蝕、外傷、歯周炎等により、歯周組織に生じた欠損部の再生のために、非常に有用なサイトカインであることが推察された。

研究成果の概要(英文)：To analyze the biological mechanism about the inducing ability of fibroblastic differentiation in human periodontal ligament cells (HPDLCs) and osteoblastic differentiation in human pre-osteoblastic cells (Saos2), we focused on activin like kinase-1 (ALK1) and -4 (ALK4). We reported that fibroblastic differentiation of HPDLCs was promoted through ALK4-Smad2/3 pathway whereas osteoblastic differentiation of Saos2 was upregulated through ALK1-Smad1/5/9 pathway. Summery, it was suggested that Activin A may contribute to the regeneration of periodontal tissue because this cytokine induced cell differentiation through the different receptors between HPDLCs and Saos2 and possessed the different inducing differentiation ability which depended on the cell types.

研究分野：歯科保存学

キーワード：Activin A 創傷治癒 線維芽細胞様分化 骨芽細胞様分化 歯周組織再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重度のう蝕、外傷、歯周炎等により、歯周組織に炎症および欠損が生じた場合、欠損部の再生が必要となる。歯周組織を再生するためには、歯根膜組織を含む軟組織だけではなく、骨およびセメント質を含む硬組織の再生も必要となる。現在までに報告されている治療法の中で、guided tissue regeneration 法ならびに EMD を用いた歯周組織再生療法が、臨床応用されている。しかしながら、これらの治療法は適応症例が限られており、また未知のウイルス等の感染の可能性も考えられている。

そこで、新しい歯周組織再生療法として、欠損部にサイトカインを応用するサイトカイン療法が注目を集めている。この治療法は、これまでの方法と異なり動物由来のタンパク質等を使用しておらず、安全性が高い治療法として非常に有益である。これまでに、様々なサイトカインを用いることで歯周組織再生が試みられているが、歯周組織再生には硬組織および軟組織の再生が必要で、これらの組織への分化誘導を同時に誘導可能なサイトカインは報告されていない。そこで申請者らは、このような硬組織および軟組織を含めた、総合的な歯周組織再生誘導能を有したサイトカインを同定し、その有意性を明らかにし、顕著な再生効果を有する新規のサイトカイン療法の開発へと繋げていくことができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

重度のう蝕、外傷、歯周炎等により歯周組織に重篤な欠損が生じた場合、骨および歯根膜組織の再生は困難となり、抜歯に至る可能性が高い。したがって、骨および歯根膜組織を含む歯周組織の再生誘導能を有した材料の開発が待ち望まれている。申請者らは最近、Activin A がヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化を促進する一方、ヒト前骨芽細胞に対しては骨芽細胞分化を増進し、細胞種により異なる分化誘導能を有することを報告した。そこで本研究では、新規歯周組織再生療法開発のため、Activin A が歯周組織再生に及ぼす効果を解析し、その結果を既に臨床応用されているエナメルマトリックスタンパク質及び fibroblast growth factor 2 と比較検討することにより、その有意性を明らかにすることとした。本研究より、これまでの抜歯適応症例においても、組織再生を誘導することで、歯の長期保存を図ることが可能と考えている。

3. 研究の方法

本研究の目的である顕著な再生効果を有する新規歯周組織再生療法を確立するため、以下の実験を行った。

Activin A によるヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化誘導機序及びヒト前骨芽細胞の骨芽細胞分化誘導機序の解析

1) ALK4 を介した Activin A によるヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化誘導効果の解析

siRNA を導入した ALK4 ノックダウンヒト歯根膜細胞を作製し、Activin A の存在下で3日～1週間培養した。その後、コラーゲン形成能の解析及び定量的 RT-PCR 法を用いた線維芽細胞分化関連マーカー因子の発現解析を行い、Activin A による線維芽細胞様分化が、ALK4 を介したシグナル伝達経路により誘導されることを明らかにした。

2) ALK1 を介した Activin A によるヒト前骨芽細胞の骨芽細胞様分化誘導効果の解析

siRNA を導入した ALK1 ノックダウンヒト前骨芽細胞を作製し、Activin A の存在下で骨芽細胞分化誘導培地にて2～3週間培養した。その後、Alizarin red S 染色を用いた石灰化物形成能の解析及び定量的 RT-PCR 法とウエスタンブロット法を用いた骨芽細胞分化関連マーカー因子の発現解析を行い、Activin A による骨芽細胞分化が、ALK1 を介したシグナル伝達経路により誘導されることを明らかにした。

3) ヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化誘導およびヒト前骨芽細胞の骨芽細胞分化誘導に伴う細胞内シグナルの解析

ヒト歯根膜細胞およびヒト前骨芽細胞における ALK1 および ALK4 を介する細胞内シグナルについて検討を進めるため、ALK4 ノックダウンヒト歯根膜細胞及び ALK1 ノックダウンヒト前骨芽細胞を用いて、ウエスタンブロット法にて p-Smad2/3 及び p-Smad1/5/8 の活性を検討し、Activin A の ALK1 および ALK4 を介した細胞内シグナルが Smad のリン酸化を介して伝達され、さらにどちらの Smad を介したシグナル経路がヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化およびヒト前骨芽細胞の骨芽細胞分化に関与しているのかについて検討した。

4. 研究成果

平成29年度は、Activin A によるヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化誘導機序およびヒト前骨芽細胞の骨芽細胞分化誘導機序を明らかにするため、Activin 型受容体である activin like kinase-4 (Alk4)に着目し、Alk4 をノックダウンしたヒト歯根膜細胞およびヒト前骨芽細胞を用いて、その1)線維芽細胞様分化および2)骨芽細胞分化に及ぼす影響について解析を行った。1)siRNA を導入した Alk4 ノックダウンヒト歯根膜細胞を作製し、Activin A 存在下で1週間培養を行った。その結果、Activin A 添加により、コラーゲン形成能および線維芽細胞様分化関連因子発現の亢進を認めたが、Alk4 ノックダウンヒト歯根膜細胞においては Activin A によるコラーゲン形成および線維芽細胞様分化関連因子発現の亢進を認めなかった。これらの結果より、当初の計画通り、Activin A による線維芽細胞様分化が、Alk4 を介したシグナル伝達経路により誘導されることが明らかとなった。2)Alk4 ノックダウンヒト前骨芽細胞を作製し、Activin A 存在下で骨芽細胞分化誘導培地にて3週間培養を行った。その結果、Activin A 添加により、石灰化物形成能および骨芽細胞分化関連マーカー因子の発現の亢進を認めたが、Alk4 ノックダウンヒト前骨芽細胞においてもその効果に差異は認められなかった。これらの結果より、Activin A による骨芽細胞分化は、Alk4 を介しておらず、その他の受容体を介して誘導されることが推察された。以上より、Activin A はヒト歯根膜細胞とヒト前骨芽細胞に対して異なった受容体を介してその分化誘導を行っていることが示唆され、Activin A という1種のサイトカインのみで細胞により異なる分化誘導を行うことで、歯周組織再生に寄与していることが推察された。

平成30年度は、ヒト前骨芽細胞の骨芽細胞分化誘導機序を明らかにするため、ALK1 をノックダウンしたヒト前骨芽細胞を用いて、骨芽細胞分化に及ぼす影響について解析を行った。まず、上記細胞を Activin A 存在下で骨芽細胞分化誘導培地にて3週間培養を行った。その結果、Activin A 添加により、石灰化物形成能および骨芽細胞分化関連マーカー因子の発現の亢進を認めたが、ALK1 をノックダウンしたヒト前骨芽細胞においては、Activin A を添加した群において、石灰化物形成能および骨芽細胞分化関連マーカー因子の発現の亢進を認めなかった。これらの結果より、Activin A による骨芽細胞分化は、ALK1 を介していることが推察された。また、western blotting 法を用いて、その細胞内シグナルについても解析を行った。その結果、Activin A による線維芽細胞様分化の誘導には、ALK4 を介した Smad2/3 のリン酸化が関与する一方、Activin A による骨芽細胞分化の誘導には、ALK1 を介した Smad1/5/9 のリン酸化が関与することが明らかとなった。以上より、Activin A はヒト歯根膜細胞とヒト前骨芽細胞に対して異なった受容体を介してその分化誘導を行っていることが示唆され、Activin A という1種のサイトカインのみで細胞により異なる分化誘導を行うことで、歯周組織再生に寄与していることが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1.

・発表者名

杉井英樹、友清淳、濱野さゆり、長谷川大学、吉田晋一郎、御手洗裕美、野津葵、有馬麻衣、糸山知宏、小野太雅、藤野翔香、一法師啓太、和田尚久、前田英史

・発表標題

Activin A がヒト歯根膜細胞およびヒト前骨芽細胞の骨芽細胞様分化に及ぼす影響について

・学会等名

日本歯科保存学会 2018 年度春季学術大会

・発表年

2018 年

2.

・発表者名

Hideki Sugii, Atsushi Tomokiyo, Sayuri Hamano, Daigaku Hasegawa, Shinichiro Yoshida, Hiromi Mitarai, Aoi Nozu, Mai Arima, Tomohiro Itoyama, Taiga Ono, Shoko Fujino, Keita Ippoushi, Naohisa Wada, Hidefumi Maeda

・発表標題

Activin A reversely works on the osteoblastic differentiation in human pre-osteoblastic cells and periodontal ligament cells.

- 学会等名
The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research
- 発表年
2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。