

令和元年6月6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：17H06953

研究課題名（和文）歯根膜幹細胞誘導因子の同定と新規歯周組織再生療法の開発

研究課題名（英文）Establishment of a novel periodontal tissue regeneration therapy through acquisition of periodontal ligament stem cell induction factor

研究代表者

御手洗 裕美（Mitarai, Hiromi）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60801660

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）：本研究において、MESTを遺伝子導入したヒト歯根膜細胞株は、幹細胞特性を獲得することが明らかとなった。また、その培養上清は、ヒト歯根膜細胞の細胞遊走能を促進することを明らかにした。さらに、MESTによる幹細胞特性の維持に関連するものとして因子Xを同定した。以上のことから、MESTがヒト歯根膜幹細胞の獲得に関与し、これらが歯周組織再生療法に応用することができる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、本研究で得られた知見により、MESTによって獲得した歯根膜幹細胞を用いた新たな歯周組織再生治療法の開発に繋がるのではないかと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that the human periodontal ligament cell line transfected with MEST gene acquired stem cell characteristics. In addition, the MEST-overexpressed cell supernatant was found to promote the migration ability of human periodontal ligament cells. Furthermore, we identified a factor X, which related to acquisition of stem cell characteristic by MEST. These results suggested that MEST was involved in the acquisition of human periodontal ligament stem cells and was a key factor for periodontal tissue regeneration therapy.

研究分野：歯周組織再生

キーワード：歯根膜幹細胞 MEST 培養上清

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

1. 研究開始当初の背景

重度歯周病や難治性根尖性歯周炎によって大きく破壊された歯周組織を、正常な状態に回復させることは非常に難しい。既存の各種治療法により、歯周組織の炎症を抑え組織破壊を防ぐことはできるが、破壊された歯周組織を完全に再生させるには不十分である。近年、歯周組織に存在する歯根膜幹細胞を応用した歯周組織再生療法が、非常に有効な治療法であると推察されてきた。しかしながら、歯根膜組織に内在する歯根膜幹細胞の数は極めて少ないため (Nagatomo et al. *J Periodontal Res.* 2006)、歯根膜幹細胞を歯周組織再生療法へ直接応用するのは困難である。そこで申請者らは、歯根膜幹細胞に特異的に発現する因子を同定し、その因子を応用し歯根膜細胞から歯根膜幹細胞への転換を図ることにより、歯根膜幹細胞を多量に入手し、それらを歯周組織再生に応用する方法を提案した。

申請者らは、最近 ES 細胞、間葉系幹細胞および神経堤細胞等の幹細胞マーカーを高発現し、かつ多分化能を有するヒト歯根膜幹細胞株 (2-23 細胞株) と、幹細胞マーカーの発現が低く、多分化能を有さないヒト歯根膜細胞株 (2-52 細胞株) とを樹立し、これらの遺伝子発現量の差をマイクロアレイ法にて網羅的に解析した結果、2-23 細胞株において高発現する遺伝子群から mesoderm-specific transcript (MEST) を同定した。興味深いことに、2-23 細胞株における MEST の発現を siRNA を用いて抑制した結果、幹細胞マーカーの発現、細胞増殖および多分化能が抑制されることが明らかとなった (Hasegawa D et al. *94th General Session & Exhibition of the IADR*, 2016)。この結果から、MEST がヒト歯根膜幹細胞の幹細胞特性に関与している可能性が強く示唆された。MEST は発生時に中胚葉で高発現するインプリンティング遺伝子として知られているが (Kaneko-Ishino et al. *Nat. Genet.* 1995)、その機能については未だ不明な点が多く、歯根膜幹細胞における MEST の機能についての報告は皆無である。

また近年、細胞から分泌される胞外小胞顆粒であるエクソソームが組織再生に寄与することが報告されている (Zhang et al. *J Transl Med.* 2015)。したがって、幹細胞そのものが分化し、組織再生に関わっているだけでなく、エクソソームを分泌し、それらを自身や周囲細胞へと作用させることにより組織再生に関与することも予想される。エクソソームを応用した実験のために、まずは幹細胞の培養上清が組織再生に影響を及ぼすものか解析する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、MEST によりヒト歯根膜細胞を多分化能を有する幹細胞に誘導するとともに、得られた幹細胞の培養上清がヒト歯根膜細胞に及ぼす影響について検討することとした。

3. 研究の方法

(1) MEST がヒト歯根膜細胞の幹細胞特性の付与に及ぼす影響の解析

MEST を組み込んだプラスミドベクターを作製し、これを当研究室が樹立した多分化能を有さないヒト歯根膜細胞株 (2-52 細胞株) に遺伝子導入することにより、MEST 導入 2-52 細胞 (2-52 / MEST) を樹立した。また同様に、コントロールベクターを 2-52 細胞株に導入した細胞 (2-52 / empty) を樹立した。

次に、2-52 / MEST および 2-52 / empty のキャラクタリゼーションを行い、2-52 / MEST が幹細胞特性を獲得した細胞であるかを解析した。まず、これらの細胞における幹細胞マーカーの発現を解析するため、フローサイトメトリー解析を用いて比較検討した。さらに、

多分化能について解析するため、in vitro にて分化アッセイ系（骨芽細胞誘導、脂肪細胞誘導）を用いた検討を行った。各種誘導培地を用いて一定期間培養後、骨関連因子、脂肪関連因子の発現を、リアルタイム PCR 法を用いて比較検討した。また石灰化物形成能、脂肪滴形成能について、各種染色法を用いて解析を行った。

(2) MEST 導入ヒト歯根膜細胞の培養上清がヒト歯根膜細胞に及ぼす影響の解析

2-52 / MEST および 2-52 / empty の細胞培養上清を初代培養ヒト歯根膜細胞 (HPDLC) に添加し、HPDLC の増殖能、遊走能ならびに骨芽細胞誘導能について検討した。

(3) MEST による幹細胞特性の付与に主要なシグナル因子の解析

MEST に関連するシグナルについて明らかにするため、2-52 / MEST および 2-52 / empty を用い、これらの遺伝子発現量の差を cDNA マイクロアレイにて網羅的に解析し、発現値の変動が大きい因子に着目した。その中で、2-52 / MEST において発現が高く、さらに幹細胞特性に関連した因子をピックアップした。次にその siRNA を 2-52 / MEST へ導入してその因子の発現を抑制し、得られた細胞における多分化能について、(1) と同様の方法で解析した。

4 . 研究成果

(1) MEST がヒト歯根膜細胞の幹細胞特性の付与に及ぼす影響の解析

MEST を組み込んだプラスミドベクターを作製し、2-52 細胞株に遺伝子導入することで、2-52 / MEST を樹立した。2-52 / MEST における MEST 発現をウエスタンブロッティング法にて解析したところ、2-52 / empty と比較して 2-52 / MEST において MEST の発現がタンパクレベルで上昇していることを確認した。

まず、間葉系幹細胞マーカーの発現をフローサイトメトリー法で解析したところ、2-52 / empty と比較して 2-52 / MEST において間葉系幹細胞マーカー (CD146、p75 NTR および N-Cadherin) の発現が上昇していることがわかった。次に、2-52 / MEST における多分化能について検討するため、骨芽細胞誘導を行ったところ、2-52 / empty と比較して 2-52 / MEST において骨関連因子 (ALP、BSP および OCN) の発現上昇を認め、Alizarin Red S 染色にて石灰化物形成能の有意な上昇を認めた。また、脂肪細胞誘導を行ったところ、2-52 / empty と比較して 2-52 / MEST において脂肪関連因子 (PPAR、LPL および CEBPA) の有意な発現上昇を認め、Oil Red O 染色にて脂肪滴産生量の上昇を認めた。

以上より、2-52 / MEST は、幹細胞特性を有することが明らかになった。

(2) MEST 導入ヒト歯根膜細胞の培養上清がヒト歯根膜細胞に及ぼす影響の解析

2-52 / MEST の培養上清がヒト歯根膜細胞に及ぼす影響について検討するため、2-52 / MEST および 2-52 / empty の細胞培養上清を HPDLC に添加し、各種解析を行った。まず、増殖能について WST-1 assay を用いた検討を行ったところ、2-52 / MEST 培養上清添加による HPDLC の増殖能促進は認められなかった。次に、遊走能について transwell assay を用いた検討を行ったところ、2-52 / empty と比較して 2-52 / MEST の培養上清を添加した群において、HPDLC の遊走能を有意に促進することが明らかになった。また、骨芽細胞誘導を行ったところ、2-52 / MEST 培養上清添加による HPDLC の骨芽細胞誘導促進は認められなかった。

以上より、2-52 / MEST の培養上清は、ヒト歯根膜細胞の増殖能と骨芽細胞誘導能には影響を及ぼさないものの、遊走能を有意に促進することが明らかになった。

(3) MEST による幹細胞特性の付与に主要なシグナル因子の解析

MEST による幹細胞特性獲得に関連するシグナル解析を行うため、2-52 / MEST ならびに 2-52 / empty を用いて cDNA マイクロアレイを行った結果、2-52 / MEST において発現が高い因子として、Pitx2 や TET1 といった幹細胞特性に関連した因子を複数認めた。我々は、その中の因子 X に着目した。因子 X の siRNA を 2-52 / MEST に導入し、骨芽細胞誘導を行った結果、2-52 / MEST における骨関連因子 (ALP、BSP および OCN) の発現低下を認め、Alizarin Red S 染色にて石灰化物形成能の抑制傾向を認めた。また同様に、脂肪細胞誘導を行った結果、2-52 / MEST において脂肪関連因子 (PPAR、LPL および CEBPA) の有意な発現低下を認め、さらに Oil Red O 染色にて脂肪滴産生量の抑制を認めた。

以上より、因子 X が MEST による幹細胞特性の付与に主要なシグナル因子である可能性が示唆された。

以上の結果より、MEST を遺伝子導入したヒト歯根膜細胞は多分化能を獲得すること、またその培養上清は、ヒト歯根膜細胞の遊走能を促進させることが明らかとなった。さらに MEST による幹細胞特性獲得に関連する因子 X を同定した。今後これらを応用することにより、新規歯周組織再生療法の開発へと発展していくことが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

長谷川大学、長谷川佳那、御手洗裕美、有馬麻衣、濱野さゆり、吉田晋一郎、友清淳、杉井英樹、和田尚久、清島保、前田英史
新規幹細胞関連因子 MEST がヒト歯根膜細胞の幹細胞転換に及ぼす影響
第 148 回日本歯科保存学会春季学術大会 (2018 年 6 月)

長谷川大学、御手洗裕美、長谷川佳那、有馬麻衣、濱野さゆり、吉田晋一郎、友清淳、杉井英樹、和田尚久、清島保、前田英史
ヒト歯根膜幹細胞における新規幹細胞特性制御因子としての MEST の可能性
第 17 回日本再生医療学会総会 (2018 年 3 月)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。