

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03830

研究課題名（和文）歯根膜における細胞ヒエラルキーの決定とその制御による歯周組織再生

研究課題名（英文）Analysis of cellular hierarchy in the periodontal ligament

研究代表者

岩山 智明（Iwayama, Tomoaki）

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：80757865

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,930,000円

研究成果の概要（和文）：歯周組織の恒常性維持や再生においては、歯根膜に存在する歯周組織幹細胞が主要な役割を担っていることが示されてきた。しかしながら、その詳細なメカニズムについては、不明な点が多く残されていた。そこで、本研究では歯根膜を解析するためのノックインマウスや細胞単離法を独自に開発することにより、歯根膜細胞のシングルセル解析を実現し、細胞構成やその細胞ヒエラルキーを明らかにするとともに、細胞分化の制御因子としてZbp1を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、歯根膜に含まれる細胞群の全貌や、歯周組織の恒常性維持や再生機構の理解が進展したことにより、歯根膜組織幹細胞の分化制御を標的とした、予知性の高い歯周組織再生療法の開発にも繋がる基盤情報が得られた。この過程で開発した手法やマウスは歯周病の病態理解やその分子機構の解明にも広く応用可能と考えられる。これらの研究が進展することで、国民の健康とQuality of Life増進に寄与するものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：Periodontal tissue stem cells in the periodontal ligament have been shown to play a major role in periodontal tissue homeostasis and regeneration. However, the detailed mechanism remains unclear. In this study, we developed a novel knock-in mouse and a cell isolation method to analyze the periodontal ligament. We then achieved a single-cell analysis of periodontal ligament cells, clarified the cellular composition and cell hierarchy, and identified Zbp1 as a regulator of cell differentiation.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯根膜 組織幹細胞 シングルセル解析 ノックインマウス 系譜解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

組織再生過程においては、組織内に内在する幹細胞が増殖、遊走し、組織を構成する細胞群に部位特異的に分化することが重要である。歯周組織においては歯根膜に組織幹細胞が含まれていることが、歯根膜から単離した細胞の *in vitro* 培養系と異所性移植実験により示されている。しかしながら、歯根膜中の組織幹細胞を中心とした細胞構成やその分化過程については未だ不明な点が多い。特に以下の4点を理解することが課題として残されている。すなわち、歯根膜を構成する多様な細胞群が定義されていない、特に、歯根膜の大部分を構成するいわゆる「歯根膜細胞」の定義が不明瞭、細胞分化の運命決定(コミットメント)を制御している因子が不明、

歯周組織幹細胞から歯根膜線維芽細胞や骨芽細胞・セメント芽細胞への分化過程が連続した軌跡 (trajectory) が理解されていない、歯周組織幹細胞と間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem/stromal cells: MSC) との違いが曖昧、の4課題が挙げられる。これらの課題が解決し、歯根膜や歯周組織の理解が進み、分化制御因子が同定されれば、同因子の制御により、歯根膜組織幹細胞の分化制御が可能となり、予知性の高い歯周組織再生療法の開発にも繋がる基盤情報を構築できるものと期待される。

### 2. 研究の目的

歯根膜に存在する様々な細胞群を定義し、同細胞の分化軌跡を検討することで、歯周組織構成細胞の細胞ヒエラルキーを決定し、その制御機構を解明することにより、歯周組織の恒常性維持や再生機構の理解を進展させることを目的として本研究を立案した。

### 3. 研究の方法

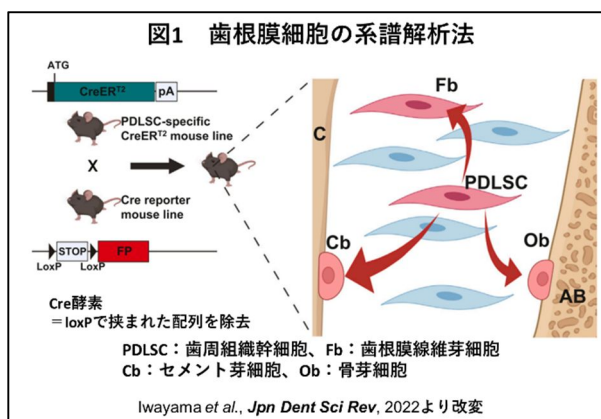
本研究計画では、歯根膜に含まれる歯周組織幹細胞や「歯根膜細胞」を定義し、歯周組織幹細胞が多様な細胞群へ分化する軌跡を決定し、さらに細胞分化の運命決定(コミットメント)を制御している因子を探索する。本研究の遂行方法として、以下の3つを行った。

#### A) 分化度を決定する転写因子の探索と CRISPR/Cas9 による機能解析

マウス上顎骨を採取し、臼歯を抜歯し、マイクロキュレットを用いて歯根膜組織を回収し、同組織を静置培養する。同組織から遊走してきた細胞を継代することにより、初代培養マウス歯根膜細胞を樹立する。さらにシングルセルソーティング法を用いて、同細胞から、1細胞由来のクローンを得て、それぞれの骨芽細胞への分化能を検討する。分化能の高いクローンと低いクローンの比較により、分化度を決定する転写因子を探索する。有意に発現が変化する転写因子について、石灰化能の高いクローンから CRISPR/Cas9 を用いてノックアウト (KO) した細胞クローンを作製する。 *in vitro* で明らかな表現型を認める分子については KO マウスを作成し、 *in vivo* における表現型を解析する。

#### B) 歯根膜特異的 Cre マウスを用いた系譜解析による「歯根膜細胞」の定義

歯根膜特異的な細胞外基質タンパクである Plap-1 (Yamada *et al. J Biol Chem.* 2007) に着目し、その遺伝子座に薬剤誘導性の Cre および蛍光タンパク質をノックインした新規遺伝子改変マウスを作製する。同マウスを R26-tdTomato マウスと掛け合わせることで、「歯根膜細胞」の系譜を明らかとする (図1)。特に、「歯根膜細胞」が骨芽細胞・セメント芽細胞へと分化するかについて、組織学的に解析を行う。



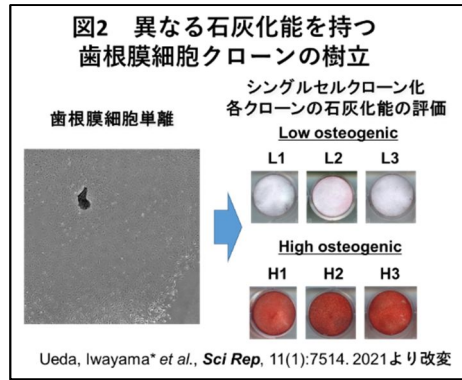
#### C) Trajectory 解析による歯根膜中の細胞ヒエラルキーの決定

Bにて作製するマウスを用いて、その蛍光タンパク質発現を指標に、歯根膜中の全細胞を分取し、細胞懸濁液を得る単離方法を開発する。同手法を用いてマウス歯根膜の細胞懸濁液を調製し、scRNA-seq 解析を行うことで、歯根膜の一細胞アトラスを作成する。さらに、scRNA-seq 解析結果のバイオインフォマティクス解析により、それぞれの細胞群がどのように分化していくか Trajectory の解明に向けて RNAvelocity 解析を行う。

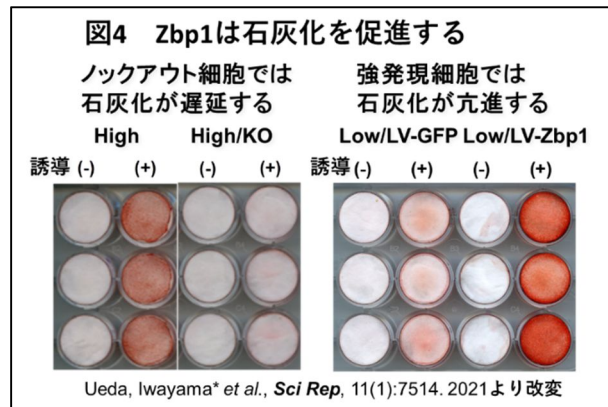
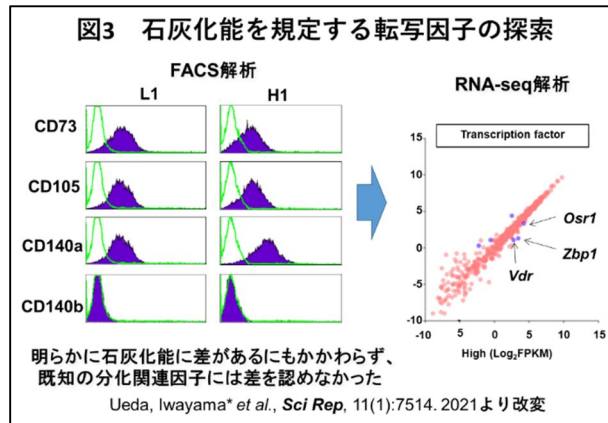
#### 4. 研究成果

##### A) 分化度を決定する転写因子の探索と CRISPR/Cas9 による機能解析

これまで adult のマウス歯根膜から初代培養細胞を樹立する方法が確立されていなかったため、様々な条件検討の末、単離プロトコルを確立した。同プロトコルでは静置した歯根膜組織片から安定して細胞の遊走を認め、得られた細胞から異なる石灰化能を持つシングルセル由来のクローンを多数樹立した。同細胞の石灰化能を石灰化誘導培地で長期培養した後、アリザリン染色を行うことで評価し、濃染する石灰化能の高いクローンとほとんど染まらない石灰化能の低いクローンを同定した(図2)。これらの細胞は明らかに石灰化能に差があるにも関わらず、増殖能や表面抗原の発現、

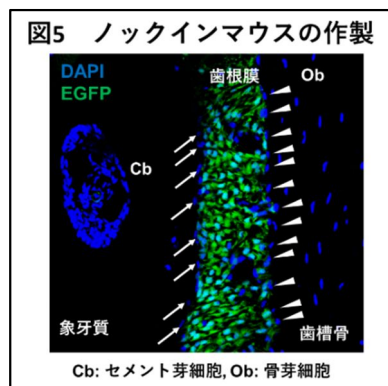


これまでに報告のある遺伝子やタンパク質発現に差を認めなかった。そこで、RNA-seq 解析を行い、特に転写因子やその関連遺伝子発現を網羅的に検討した結果、石灰化能の高いクローンで有意に発現が高い遺伝子として、*Zbp1* を同定した(図3)。そこで同分子の機能解析を行うために、ゲノム編集技術を用いて、石灰化能の高いクローンから *Zbp1* をノックアウトした細胞クローンをさらに作製し、同細胞の分化能をアルカリフォスファターゼ活性測定やアリザリン染色により比較したところ、*Zbp1* ノックアウト細胞では石灰化が遅延した。逆にレンチウイルスベクターを用いて石灰化能の低いクローンに *Zbp1* を強発現させた細胞を作製し、同様に検討したところ、*Zbp1* 強発現細胞では石灰化が亢進した(図4)。さらに蛍光 *in situ* hybridization により *Zbp1* 陽性細胞は歯根膜中に散在する細胞であることが明らかとなった。以上のことから、分化度を決定する転写因子関連分子として *Zbp1* を同定し、歯根膜中の *Zbp1* 陽性は骨芽細胞の前駆細胞である可能性が示唆された。KO マウスについては、すでに作製済みの系統が利用可能であったため、同マウスを入手し、その表現型について報告した。



##### B) 歯根膜特異的 Cre マウスを用いた系譜解析による「歯根膜細胞」の定義

歯根膜の解析を推進するためのマウスとして、*Plap-1-GFP-2A-CreER* マウスを作製した。相同組換えベクターを構築し、ES 細胞株へのエレクトロポレーション、PCR およびサザンブロット解析により、相同組換え ES クローンを同定し、キメラマウスを作製した。ES 細胞寄与率の高いキメラマウスについて野生型マウスと交配し、F1 マウスを得た。同マウスは生存可能で繁殖力に問題が無いことを確認し、歯周組織を組織学的に解析したところ、歯根膜の大部分を構成するいわゆる「歯根膜細胞」が特異的に GFP を発現しており、骨芽細胞やセメント芽細胞では発現していない(図5)ことから、目的どおりのマウスが樹立できたことが確認された。

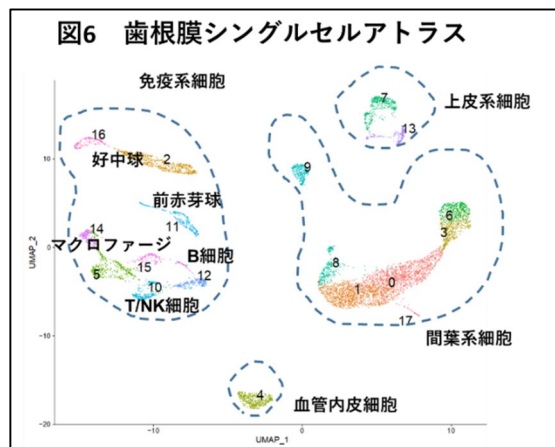


ついで、同マウスを R26-tdTomato と掛け合わせて、6-8 週齢にてタモキシフェンを投与することにより、歯根膜細胞由来細胞が tdTomato で標識され、歯根膜細胞の運命を追跡する細胞系譜

解析を行ったところ、3ヶ月後歯根膜中央の大部分の歯根膜細胞が tdTomato で標識されていたことや、セメント芽細胞および骨芽細胞、さらには骨細胞も標識されていたことから、Plap-1 陽性歯根膜組織幹細胞により、歯周組織の恒常性が維持されていることが確認された。さらに、歯周組織の創傷治癒における歯根膜細胞の運命を追跡するために、7日間絹糸を上顎第二臼歯周囲に結紮する絹糸結紮モデルを作製し、絹糸除去後の創傷治癒過程における細胞系譜解析を行ったところ、除去後すぐの炎症肉芽組織は歯根膜細胞由来ではないのに対して、その後の修復された歯根膜細胞、セメント芽細胞および骨芽細胞、骨細胞が歯根膜細胞由来であることが明らかとなった。これらの研究成果は、歯根膜中の組織幹細胞の存在を生体内で証明するものである。

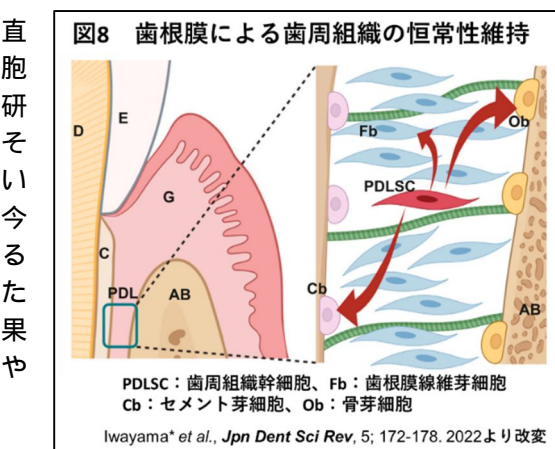
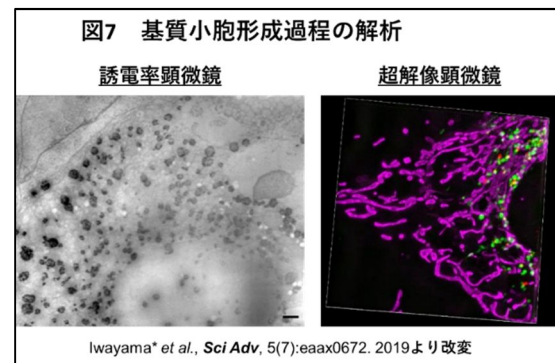
#### C) Trajectory 解析による歯根膜中の細胞ヒエラルキーの決定

A で確立した細胞単離法をさらに酵素で短時間に細胞懸濁液を得られる手法へと発展させるため、B にて作製したマウスの GFP 発現を指標に様々な条件検討を行い、効率的な細胞単離法を開発した。同手法により、これまでなし得なかったマウス歯根膜の *ex vivo* 解析が可能となった。まずフローサイトメトリーを用いて、得られる細胞懸濁液に GFP 陽性の歯根膜細胞以外の細胞がどの程度含まれているかを検討した結果、CD45 陽性免疫系細胞や、CD31 陽性血管内皮細胞、CD326 陽性上皮細胞が含まれており、これらはいずれも GFP 陰性であった。定量的な解析が安定的に行えるようになったため、同細胞単離法を用いて 20 匹の野生型マウスから歯根膜由来の細胞懸濁液を調製し、scRNA-seq 解析を行った。その結果、歯根膜シングルセルアトラス (図 6) が作成され、フローサイトメトリーの結果と一致する細胞構成を認め、特に間葉系細胞は *Plap-1* 陽性細胞と *Ibsp* 陽性細胞に大別できることが明らかとなった。ついで、間葉系細胞のみを抽出し、RNAvelocity 解析を行い、歯根膜線維芽細胞、骨芽細胞、セメント芽細胞へと分化する源流といえる細胞を同定するとともに、その分化過程の Trajectory を推定した。



#### D) その他の研究成果

上記の研究成果により、歯根膜細胞や骨芽細胞の単離培養や CRISPR/Cas9 による機能解析手法が確立され、骨芽細胞がその分化後期において、石灰化物を形成する過程の解析につながった。同解析では、A にて樹立した歯根膜細胞を用いるとともに、A にて確立したゲノム編集法を用いたアルカリフォスファターゼノックアウト細胞を用いた。走査型誘電率顕微鏡、超解像度顕微鏡といった最新の機器でナノレベル観察を行った結果、細胞内のリソソーム内部に石灰化に必須の基質小胞が形成される過程の直接観察に成功した (図 7)。また、歯周組織幹細胞と間葉系幹細胞 MSC との違いについて、我々の研究を含む最新の研究結果をまとめるとともに、それらの違いを明確にするための未解決課題について、英語総説論文にまとめ、報告した (図 8)。今後、これまでに広く行われてきた細胞移植による歯周組織幹細胞の解析に加え、本研究で得られた細胞系譜解析、シングルセル解析などの研究成果が集積することにより、歯周組織の恒常性維持や再生機構の理解が進展するものと期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ueda Tsugumi, Iwayama Tomoaki, Tomita Kiwako, Matsumoto Shuji, Iwashita Mizuho, Bhongsatiern Phan, Sakashita Hiromi, Fujihara Chiharu, Takedachi Masahide, Murakami Shinya	4. 巻 11
2. 論文標題 Zbp1-positive cells are osteogenic progenitors in periodontal ligament	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7514
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87016-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Iwayama T, Okada T, Ueda T, Tomita K, Matsumoto S, Takedachi M, Wakisaka S, Noda T, Ogura T, Okano T, Fratzi P, Ogura T, Murakami S	4. 巻 5
2. 論文標題 Osteoblastic lysosome plays a central role in mineralization.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaax0672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aax0672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Iwayama Tomoaki, Sakashita Hiromi, Takedachi Masahide, Murakami Shinya	4. 巻 58
2. 論文標題 Periodontal tissue stem cells and mesenchymal stem cells in the periodontal ligament	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 172 ~ 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2022.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 3件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 村上伸也、岩山智明
2. 発表標題 歯周組織幹細胞源としての歯根膜
3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富田貴和子, 岩山智明, 上田亜美, 松本修治, 岩下瑞穂, 村上伸也
2. 発表標題 多色細胞系譜追跡法を用いた歯根膜前駆細胞のクローナル解析
3. 学会等名 第63回 春季日本歯周病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Iwayama
2. 発表標題 Stem cells/progenitors in periodontal ligament
3. 学会等名 IADR-APR Young Researcher Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富田貴和子, 岩山智明, 松本修治, 岩下瑞穂, 村上伸也
2. 発表標題 創傷治癒における歯根膜長期標識保持細胞の解析
3. 学会等名 第63 秋季日本歯周病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本修治, 岩山智明, 富田貴和子, 岩下瑞穂, 村上伸也
2. 発表標題 歯根膜Gli1陽性細胞の系譜解析
3. 学会等名 第63 秋季日本歯周病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoaki Iwayama , Kiwako Tomita , Shuji Matusmoto , Mizuho Iwashita , Chiharu Fujihara , Masahide Takedachi , Satoru Yamada , Shinya Murakami
2. 発表標題 Characterization of the PLAP-1-GFP/CreER knock-in mouse
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research ( 国際学会 )
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田亜美、岩山智明、富田貴和子、松本修治、村上伸也
2. 発表標題 骨芽細胞コミットメント制御因子の探索
3. 学会等名 第62回 春季日本歯周病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富田貴和子、岩山智明、上田亜美、松本修治、村上伸也
2. 発表標題 標識保持細胞の追跡による歯根膜間葉系幹細胞の同定
3. 学会等名 第62回 春季日本歯周病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iwayama T, Murakami S
2. 発表標題 Analysis of periodontal ligament stem cells in vivo
3. 学会等名 The 9th Japan-Thailand-Korea Joint Symposium ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomita K, Iwayama T, Ueda T, Matsumoto S, Iwashita M, Murakami S
2. 発表標題 Chasing histone 2B-GFP label-retaining mesenchymal cells in periodontal ligament
3. 学会等名 The 9th Japan-Thailand-Korea Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iwayama T, Murakami S
2. 発表標題 Analyzing matrix vesicles in mineral-forming cells
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomita K, Iwayama T, Ueda T, Matsumoto S, Iwashita M, Murakami S
2. 発表標題 Long-term Label-retaining Cells in Periodontal Ligament
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ueda T, Iwayama T, Tomita K, Matsumoto S, Iwashita M, Takedachi M, Murakami S
2. 発表標題 Role of Zbp1 on osteogenic commitment of periodontal ligament cells
3. 学会等名 98th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 松本修治、岩山智明、上田亜美、富田貴和子、岩下瑞穂、村上伸也
2. 発表標題 組織透明化技術を用いたマウス歯根膜の三次元観察
3. 学会等名 第62回 秋季日本歯周病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Ueda, T. Iwayama, K. Tomita, S. Matsumoto, M. Takedachi, S. Murakami
2. 発表標題 Identification of osteogenic commitment factors in periodontal ligament
3. 学会等名 2019 IADR GENERAL SESSION (国際学会)
4. 発表年 2019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	竹立 匡秀  (Takedachi Masahide)  (60452447)	大阪大学・歯学部附属病院・講師   (14401)	
研究分担者	村上 伸也  (Murakami Shinya)  (70239490)	大阪大学・歯学研究科・教授   (14401)	
研究分担者	山下 元三  (Yamashita Motozo)  (90524984)	大阪大学・歯学部附属病院・講師   (14401)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------