

令和 3 年 5 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19001

研究課題名（和文）Activin Aの二極性細胞分化誘導特性を基盤とした新規歯周組織再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of periodontal tissue regeneration therapy using the biphasic cell differentiation ability of Activin A

研究代表者

杉井 英樹 (Sugii, Hideki)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：80802280

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Activin Aは、ヒト歯根膜細胞においては、線維芽細胞様分化がALK4-smad2/3を介したシグナル経路により誘導され、ヒト前骨芽細胞においては、骨芽細胞分化がALK1-smad1/5/9を介したシグナル経路により誘導されることが明らかとなった。

さらに、ラット歯周組織損傷モデルを用いて、Activin Aの歯周組織再生能を評価した結果、損傷後2週間の欠損部歯周組織において、歯根膜様の線維性組織および骨様組織の形成を認めた。

以上より、Activin Aという1種のサイトカインのみで、歯根膜組織および骨組織において異なる細胞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

本研究より、Activin Aは、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を同時に誘導することが可能な特異なサイトカインであることが明らかとなった。これまでに、同様の機能を有した因子は報告されておらず、新規の歯周組織再生療法を創生するために、非常に有益な因子であることが示唆された。

また、ラット歯周組織損傷モデルにおいて、Activin Aにより、欠損部歯周組織において、歯根膜様の線維性組織および骨様組織の形成を認めたことから、今後もin vivoにおける更なる研究を推進することで、これまでの手法よりも簡便で効果的な方法で、臨床応用の実現に繋げていくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that Activin A promoted fibroblastic differentiation of human periodontal ligament (PDL) cells through ALK4-Smad2/3 pathway and osteoblastic differentiation of pre-osteoblasts through ALK1-Smad1/5/9 pathway.

In addition, the results about the evaluation of Activin A-induced periodontal tissue regeneration ability using rat periodontal tissue defect model exhibited the formation of PDL-like fibroblastic tissue and bone-like tissue in the defect site of periodontal tissue two weeks after surgery.

In conclusion, it was suggested that Activin A contributes to the regeneration of periodontal tissue through the induction of different types of cell differentiation in PDL tissue and bone tissue, respectively.

研究分野：歯科保存学研究分野

キーワード：Activin A 歯根膜細胞 前骨芽細胞 歯周組織再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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くなる。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。欠損を生じた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。しかしながら、これらの組織への分化を同時に再生可能なサイトカインは、これまでに報告されていない。

近年、transforming growth factor (TGF) シグナル経路は歯周組織の創傷治癒に關与することが報告されている (*Raja et al.*, 2009)。Activin A は、TGF ファミリーに属し、様々な組織において、細胞の分化、増殖、そして遊走等の制御に關与している。最近、申請者は、Activin A の分化誘導能に着目し、歯根膜細胞 (PDLSCs) に対しては線維芽細胞様分化を促進する一方 (*Sugii et al.*, 2014)、前骨芽細胞 (Pre-OBs) に対しては骨芽細胞分化を誘導することを報告した (杉井ら, 2018)。これらの結果より、Activin A は、硬組織および軟組織に含まれる未分化な細胞の分化をそれぞれ誘導し、包括的に歯周組織再生を誘導する特異なサイトカインとなり得る可能性が示唆された。

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くなる。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。申請者は最近、Activin A が、PDLSCs の線維芽細胞様分化を促進する一方、Pre-OBs に対しては骨芽細胞への分化を増進し、細胞種によって異なる分化誘導能を有していることを明らかにした。そこで本研究では、Activin A が、細胞分化誘導時に働く各々の受容体に結合する領域を同定し、その領域を基にペプチドをそれぞれ合成した後、歯周組織を傷害したラットにペプチドを応用することで、歯周組織再生能を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1. activin like kinase (ALK) 4 および ALK1 の各々に結合する Activin A の領域の同定とペプチド合成

Activin A の配列の中で、欠損領域の異なる変異体に GST 標識したベクターを数種類作製し、GST プルダウン法を用いて、ALK4 および ALK1 の各々と結合する変異体をそれぞれ選別し、ALK4 および ALK1 の各々のシステインリッチなドメインと結合する Activin A の領域を同定する。その後、ALK4 および ALK1 に対する各々の結合領域を基にして、ペプチドをそれぞれ合成する。

2. ペプチドの細胞分化誘導能および Akt リン酸化誘導能の評価

解析に用いる 2 種類のペプチドは、将来的に混合した状態での臨床応用を想定している。本研究では、まずそれぞれのペプチドによる細胞分化誘導能を解析し、至適濃度や分化に要する期間を明らかにする。次に、この条件下で、2 種類のペプチドを混合し、その細胞分化誘導能を解析することで、最適な混合条件の検討を行うこととした。a. それぞれのペプチドの解析: ALK4 由来のペプチドを添加した PDLSCs および添加しない PDLSCs を準備し、一定期間培養後、両群の PDLSCs の線維芽細胞様分化誘導能を解析する。ALK1 由来のペプチドを添加した Pre-OBs および添加しない Pre-OBs を準備し、一定期間培養後、両群の Pre-OBs の骨芽細胞分化誘導能を解析する。b. 混合したペプチドの解析: ALK4 および ALK1 由来のペプチドを様々な比率で混合し、a. および a. と同様の解析を行い、PDLSCs の線維芽細胞様分化誘導能および Pre-OBs の骨芽細胞分化誘導能を有する最適な条件を検討する。また、それぞれの条件下で作製したペプチドを添加した PDLSCs における、Akt のリン酸化を、Western blot 法を用いて解析し、ペプチドに

よる Akt リン酸化誘導能について検証する。

3. in vivo における ALK4 および ALK1 由来のペプチドの歯周組織再生誘導能の検討

3D マイクロ CT 撮影により、硬組織形成能を評価する。歯周組織の組織切片を作製し、HE 染色、Masson trichrome 染色を用いて歯根膜組織形成能を評価する。傷害後に再生された歯根膜組織中のコラーゲン、および傷害のない歯根膜組織中のコラーゲン (Control 群) を、Picrosirius red 染色を用いて検出し、その形成領域を計測することで比較検討を行い、コラーゲンの過剰形成の有無を解析する。骨 (OCN, OPN, SP7 等)、セメント質 (DSPP, CP23 等)、そして歯根膜 (POSTN, PLAP1, SCX 等) の組織分化に関連したそれぞれの抗体を用いて免疫組織化学的染色を行い、組織分化マーカーのタンパク発現を評価する。

4. 研究成果

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として、Activin 型受容体である ALK4 に着目し、ALK4 をノックダウンしたヒト歯根膜細胞を用いて、Activin A によるヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化が、ALK4-smad2/3 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とした。次に、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ところ、Activin A によるヒト前骨芽細胞の骨芽細胞分化が、ALK1-smad1/5/9 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とした。次に、線維芽細胞様分化誘導に関与する受容体として知られている ALK5、および骨芽細胞分化誘導に関与する受容体である ALK2 に関しても、各々の受容体の遺伝子発現をノックダウンさせることで、Activin A の細胞分化誘導に及ぼす影響を解析した。その結果、ALK5 および ALK2 をそれぞれ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において、Activin A によって誘導された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影響を与えなかった。したがって、ALK5 および ALK2 は、Activin A による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は関与していないことが明らかとなった。

次に、ラット歯根膜組織傷害モデルを用いた実験においては、傷害された歯根膜組織近傍の歯根膜組織では、ALK4 陽性の細胞が、傷害を受けていない歯根膜組織における ALK4 陽性細胞数と比較して増加していることが明らかとなった。また、傷害された歯根膜組織近傍の骨組織においては、ALK1 陽性の細胞が骨芽細胞層 (歯根膜組織と歯槽骨組織の境界面にある細胞層) において多く認められることもわかった。

さらに、in vivo 実験としてラット下顎骨の歯周組織に損傷を与えて歯周組織を欠損させたモデルを用いて、同欠損部位に Activin A を添加することで、その歯周組織再生能を評価した。その結果、損傷後 2 週間の組織切片において、欠損部歯周組織に歯根膜様の線維性組織および骨様組織の形成を認めた。

以上より、Activin A という 1 種のサイトカインのみで、歯根膜組織および骨組織において異なる細胞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5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujino Shoko, Hamano Sayuri, Tomokiyo Atsushi, Itoyama Tomohiro, Hasegawa Daigaku, Sugii Hideki, Yoshida Shinichiro, Washio Ayako, Nozu Aoi, Ono Taiga, Wada Naohisa, Kitamura Chiaki, Maeda Hidefumi	4. 巻 235
2. 論文標題 Expression and function of dopamine in odontoblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 4376 ~ 4387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.29314	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hamano Sayuri, Tomokiyo Atsushi, Hasegawa Daigaku, Yuda Asuka, Sugii Hideki, Yoshida Shinichiro, Mitarai Hiromi, Wada Naohisa, Maeda Hidefumi	4. 巻 121
2. 論文標題 Functions of beta2 adrenergic receptor in human periodontal ligament cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 4798 ~ 4808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.29706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Itoyama Tomohiro, Yoshida Shinichiro, Tomokiyo Atsushi, Hasegawa Daigaku, Hamano Sayuri, Sugii Hideki, Ono Taiga, Fujino Shoko, Maeda Hidefumi	4. 巻 55
2. 論文標題 Possible function of GDNF and Schwann cells in wound healing of periodontal tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 830 ~ 839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12774	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hasegawa Daigaku, Hasegawa Kana, Kaneko Hiroshi, Yoshida Shinichiro, Mitarai Hiromi, Arima Mai, Tomokiyo Atsushi, Hamano Sayuri, Sugii Hideki, Wada Naohisa, Kiyoshima Tamotsu, Maeda Hidefumi	4. 巻 2020
2. 論文標題 MEST Regulates the Stemness of Human Periodontal Ligament Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/9672673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 杉井英樹、吉田晋一郎、友清淳、濱野さゆり、長谷川大学、前田英史	4. 巻 63
2. 論文標題 未重合レジンセメントと未重合フロアブルレジンの結合力	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日歯保存誌	6. 最初と最後の頁 44～51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 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、Mhd Safwan Albougha、前田英史
2. 発表標題 Activin Aが有する二極性細胞分化誘導能に関する分子機構の解明
3. 学会等名 日本歯科保存学会2019年春季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aoi Nozu, Sayuri Hamano, Atsushi Tomokiyo, Daigaku Hasegawa, Shinichiro Yoshida, Hideki Sugii, Hiromi Mitarai, Keita Ipposhi, Naohisa Wada, Hidefumi Maeda.
2. 発表標題 Effects of TNF- α on Senescent human dental pulp cells.
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center Joint International Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shoko Fujino, Hamano Sayuri, Atsushi Tomokiyo, Daigaku Hasegawa, Shinichiro Yoshida, Hideki Sugii, Ayako Washio, Hiromi Mitarai, Naohisa Wada, Chiaki Kitamura, Hidefumi Maeda.
2. 発表標題 Effects of dopamine on odontoblastic differentiation through PKA signaling.
3. 学会等名 The 97th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 足立織利恵、杉井英樹、糸山知宏、友清淳、濱野さゆり、長谷川大学、吉田晋一郎、Mhd Safwan Albougha、前田英史
2. 発表標題 Decorinが未分化なヒト歯根膜細胞の骨芽細胞様分化に及ぼす影響
3. 学会等名 第153回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------