

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19056

研究課題名(和文) リボソームプロファイリングを取り入れた歯周組織再生医療研究の新展開

研究課題名(英文) New strategies for periodontal regenerative research by using ribosome profiling

研究代表者

鬼塚 理 (Onizuka, Satoru)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10779317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では歯根膜由来間葉系幹細胞(PDL-MSCs)の歯周組織再生に特化した因子を同定することを目的とし、遺伝子発現等の細胞内における反応を網羅的に解析する手法を用いて実験を行った。網羅的解析により歯周組織再生に寄与する特定の遺伝子を複数同定し、細胞培養環境下での機能解析も実施した。in vitroの環境で同定した遺伝子をノックダウンした後に、アルカリフォスファターゼ等の骨芽細胞分化マーカーを調査し、有意な減少を認めため、本研究で同定した遺伝子群はhPDL-MSCsの歯周組織再生を担う未分化細胞の重要な遺伝子であると示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療を目的としたMSCsの研究は、細胞移植の効果を検討した研究については古くから実施されているが、分化メカニズムや移植による細胞の動態等、未だ不明な点は数多く見受けられる。またこれまでに歯周組織再生療法に関する研究は数多く報告されているが、既存療法では多くの進行性の歯周炎を改善することは困難であり、新規治療法の開発が必要とされている。国民の半数以上が歯周病に罹患している現代社会において、進行性の歯周炎に対する治療法が確立されることは歯学研究において最も重要であり、本研究はその足掛かりとなり得る研究であり、学術的・社会的意義は高いと考える。

研究成果の概要(英文)：The periodontal ligament contains multipotent mesenchymal stromal cells (MSC)-like cells, known as periodontal ligament-derived MSCs (PDL-MSCs), which play important roles in the maintenance of homeostasis in periodontal tissues and in the repair of damaged periodontal tissue. To investigate the specific factor which contribute to periodontal tissue regeneration, we performed omics analysis such as RNA-sequencing and ribosome profiling. In these analysis, we identified several genes which were strongly upregulated by osteoblastic differentiation. To confirm the functional roles of these genes during osteoblastic differentiation, we performed siRNA knockdown experiments. ALP activity, which is specific osteoblastic marker, was significantly decreased after each gene was knocked down by siRNA. These results suggested that the genes revealed in this study may be important genes in undifferentiated cells responsible for periodontal tissue regeneration of hPDL-MSCs.

研究分野：再生医療

キーワード：歯根膜由来間葉系幹細胞 RNA-sequencing

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(MSCs)は骨芽・軟骨・脂肪細胞などへ分化が可能であり、様々な組織から単離することができる(Pittenger ら, Science 1999)。過去の研究では、歯周組織再生を担う歯根膜組織から MSCs と同様の特性を有した細胞が単離可能であることが分かっており(Seo ら, Lancet 2004)、臨床研究における再生医療製品として高い有効性があることが示唆されている(Iwata ら, Regen Ther 2018)。また腸骨海綿骨・顎骨(上顎骨、下顎骨)といった骨組織からも MSCs の単離・培養法が確立されており(Shimakura ら, J Craniofac Surg 2003)、顎骨の再生に有用であると考えられている。しかしながら、上記に挙げられる細胞は同じ MSCs として定義されるが、*in vitro* での分化能に差があるだけでなく、移植を目的とした *in vivo* における検証でもその再生能は異なっている。過去の報告によると、他の MSCs と比較して歯根膜由来の MSCs では良好な新生セメント質と歯根膜の形成を認めており、歯周組織再生に歯根膜由来 MSCs が有効であることが明らかにされている(Tsumanuma ら, Biomaterials 2011)。また顎骨と体幹骨では膜内骨化と軟骨内骨化で骨形成過程がそれぞれ異なっており、由来組織の性質が MSCs の遺伝子発現パターンに影響することで、分化や増殖といった能力にも大きく影響していることが示唆されている(Leucht ら, Development 2008)。これらのことから、MSCs の分化に関しては特定の遺伝子により制御されていることが考えられるが、単一の因子だけでなく、様々な因子が複雑に関与しているため、未だ不明な点が多い。そこで申請者は分化能の異なる腸骨由来(I-MSCs)、下顎骨由来(Md-MSCs)、上顎骨由来(Mx-MSCs)の骨組織由来 MSCs と歯根膜由来 MSCs(PDL-MSCs)、骨髄由来 MSCs(BM-MSCs)、胚性幹細胞(ESCs)、および ESC 由来 MSCs(ES-MSCs)を用いて次世代シーケンサー(NGS)による網羅的遺伝子発現解析(RNA-seq)を行った。その結果、ESCs を除く全ての MSCs は細胞表面マーカーとされる CD44, 73, 90, 105 などの発現が高いことから、従来の MSCs 細胞表面マーカーに関して同様の発現を認めただけでなく、他の CD 抗原の発現パターンも近似しているため、CD 抗原という視点からは同様の MSCs に定義されることがわかった。しかしながら顔面領域である Mx-MSCs、Md-MSCs、及び PDL-MSCs は HOX 遺伝子ファミリーの発現が著しく欠如していることが確認されただけでなく、顔面領域の MSCs では顎顔面の骨形成に関わる因子(MSX1, BARX1, LHX8 等)の遺伝子発現が高いことが明らかとなった。

MSCs の分化能という点に着目してみると、PDL-MSCs は他の MSCs と比較して軟骨細胞への分化能が低いという報告がある(Iwata ら, J Clin Periodontol 2010)。一方で PDL-MSCs は歯周組織という複雑な組織を再生する場合の再生材料として適していることが分かっており、さらには石灰化誘導培地で培養する前処理を行うことでその再生能は上昇することも分かっている(Flores ら, J Clin Periodontol 2008)。

こうした多様な変化がみられる MSCs であるが、由来組織ごとの差異を明確に表した報告は未だない。そのため、由来組織ごとの特性を反映するような因子を同定することで、効率よく目的の組織を再生することが可能になると考えられる、歯周組織再生に特化した PDL-MSC における遺伝子発現に着目することで、新たな歯周組織再生の手掛かりになると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、異なる組織由来の MSCs を用いて RNA-seq やリボソームプロファイリング等の網羅的解析手法により、PDL-MSCs が担う歯根膜、セメント質、歯槽骨の再生といった、複雑な組織修復機構を制御する因子を同定することである。異なる細胞と比較することで PDL-MSCs 特異的な発現を示す遺伝子が明らかになり、さらには石灰化誘導培地という環境特異的な遺伝子発現も調査することにより歯周組織再生を担う遺伝子発現プロファイルが明らかになる。ここから転写因子をターゲットとした siRNA による loss of function 実験や、液性因子をターゲットとしたリコンビナントタンパクの添加実験により、同定した PDL-MSCs 特異的な制御因子の機能解析を分子生物学的手法で明らかにすることが目的となる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 様々な MSCs を用いた網羅的遺伝子発現解析

RNA-seq などの網羅的遺伝子発現解析により、MSCs だけでなく他の細胞の発現プロファイルと比較解析し、歯根膜特異的な遺伝子発現を抽出する。

#### (2) 石灰化誘導培地による細胞分化における遺伝子発現プロファイルの調査

(1)で細胞特異的な遺伝子発現プロファイルを明らかにした後で、様々な培地を用いて細胞培養環境特異的な遺伝子発現プロファイルを調査する。石灰化誘導培地という歯根膜組織再生が効率よく行われる細胞の微細環境を形成する因子を特定する。

#### (3) 同定された因子に関して *in vitro* での機能解析を実施する

(1), (2)の解析結果から特定の遺伝子を抽出して、siRNA によるノックダウン実験を行い、骨芽細胞分化の指標となるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定し、ノックダウンによる活性の変化を調査する。

#### 4. 研究成果

(1) まず初めに、様々な組織由来の MSCs における遺伝子発現プロファイルだけでなく、データベース上にある他の細胞 (ES 細胞や iPS 細胞) の RNS-seq データを取得し、大規模比較解析を実施した。クラスター解析により歯根膜細胞特異的に発現が上昇している遺伝子群をピックアップし、その中でも統計学的に有意に変動している遺伝子を抽出した。

(2) 次に PDL-MSCs を通常培地、石灰化誘導培地、BMP-2 もしくは BMP-6 添加培地、デキサメタゾン添加培地によりそれぞれ培養し、RNA を抽出した後に RNA-seq を実施した。HISAT2-Cufflinks パイプラインによりマッピングと比較解析を実施しクラスター解析を実施した (図 1)。なお、BMP は骨芽細胞分化に重要な成長因子であり、我々の先行研究から石灰化誘導培地とは異なる経路で PDL-MSCs の骨芽細胞分化を促進していることが分かっている。またデキサメタゾンは石灰化誘導培地にも含まれているが、様々な分化誘導にも含まれていることからコントロールとして設定した。

この結果から石灰化誘導培地による刺激は他の刺激とは大きく異なる遺伝子発現パターンを示すことが分かった。次に石灰化誘導培地により有意に発現上昇、または下降する遺伝子群を抽出し、それらの遺伝子群を用いて GO term 解析を実施した。これにより石灰化誘導培地は細胞の増殖、主には細胞周期を大きく変化させることで細胞の分化を制御していることが明らかとなった (図 2)。

さらに転写制御を調査するためにクロマチン免疫沈降 (ChIP) -seq データを用いて石灰化誘導培地における転写状況を網羅的に調査し、RNA-seq のデータと統合することにより遺伝子を選定した。

(3) 上記の解析により 226 ある遺伝子群からさらに 5 つに厳選し、これらの遺伝子に関して siRNA を用いたノックダウン解析を行った。siRNA により 50% 以上の遺伝子抑制を認めただけのものを用いてその後の解析を行った。遺伝子を抑制した後に石灰化誘導培地により培養し、ALP 活性を測定したところいくつかの遺伝子を抑制することにより ALP 活性が抑制されたため、これらの遺伝子は歯周組織再生における重要な因子になり得る可能性がある。

(4) 本研究ではリボソームプロファイルによる転写制御機構を調査するのが目的の一つであったが、リボソームと mRNA を効率よく回収する手技を確立することが難しく、シーケンス後のクオリティも低いなどのトラブルがあったため、ChIP-seq データ解析を代替案として用いた。

#### <参考文献>

- Pittenger, Mark F., et al. "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *science* 284.5411 (1999): 143-147.
- Seo, Byoung-Moo, et al. "Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament." *The Lancet* 364.9429 (2004): 149-155.
- Iwata, Takanori, et al. "Periodontal regeneration with autologous periodontal ligament-derived cell sheets-a safety and efficacy study in ten patients." *Regenerative therapy* 9 (2018): 38-44.
- Shimakura, Yasuhito, Yasuharu Yamzaki, and Eijyu Uchinuma. "Experimental study on bone formation potential of cryopreserved human bone marrow mesenchymal cell/hydroxyapatite complex in the presence of recombinant human bone morphogenetic protein-2." *Journal of Craniofacial Surgery* 14.1 (2003): 108-116.

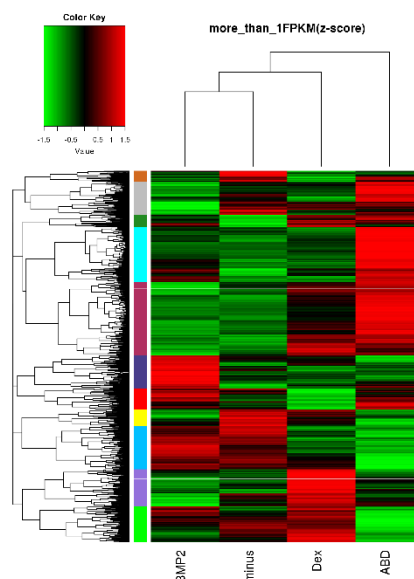


図1 遺伝子発現プロファイルとクラスター解析  
石灰化誘導培地は ABD

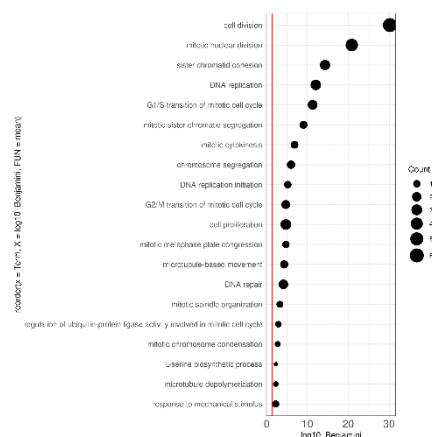


図2 GO term 解析結果  
石灰化誘導培地により有意な発現変動を示した 226 遺伝子を用いて解析を実施した。

Tsumanuma, Yuka, et al. "Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model." *Biomaterials* 32.25 (2011): 5819-5825.

Leucht, Philipp, et al. "Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration." *Development* 135.17 (2008): 2845-2854.

Iwata, Takanori, et al. "Validation of human periodontal ligament derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use." *Journal of Clinical Periodontology* 37.12 (2010): 1088-1099.

Flores, Mara Gomez, et al. "Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats." *Journal of clinical periodontology* 35.12 (2008): 1066-1072.

## 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 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Onizuka S, Iwata T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Application of Periodontal Ligament-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Sheets for Periodontal Regeneration.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 pii: E2796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20112796.	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 Park SJ, Onizuka S, Seki M, Suzuki Y, Iwata T, Nakai K.	4. 巻 13
2. 論文標題 A systematic sequencing-based approach for microbial contaminant detection and functional inference.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12915-019-0690-0.	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 Maekawa S, Onizuka S, Katagiri S, Hatasa M, Ohsugi Y, Sasaki N, Watanabe K, Ohtsu A, Komazaki R, Ogura K, Miyoshi-Akiyama T, Iwata T, Nitta H, Izumi Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 RNA sequencing for ligature induced periodontitis in mice revealed important role of S100A8 and S100A9 for periodontal destruction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50959-7.	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 Sano Kotaro, Usui Michihiko, Moritani Yuki, Nakazawa Kohji, Hanatani Tomoya, Kondo Hisataka, Nakatomi Mitsushiro, Onizuka Satoru, Iwata Takanori, Sato Tsuyoshi, Togari Akifumi, Ariyoshi Wataru, Nishihara Tatsuji, Nakashima Keisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Co-cultured spheroids of human periodontal ligament mesenchymal stem cells and vascular endothelial cells enhance periodontal tissue regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 59 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.12.008	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 Kasai Shingo, Onizuka Satoru, Katagiri Sayaka, Nakamura Taiji, Hanatani Tomoya, Kudo Takahiro, Sugata Yuou, Ishimatsu Michie, Usui Michihiko, Nakashima Keisuke	4. 巻 62
2. 論文標題 Associations of cytokine levels in gingival crevicular fluid of mobile teeth with clinical improvement after initial periodontal treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 189 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.19-0056	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

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 前川 祥吾, 鬼塚 理, 片桐 さやか, 佐々木 直樹, 渡辺 数基, 大津 杏理, 駒崎 利奈, 小倉 康平, 秋山 徹, 新田 浩, 和泉 雄一, 岩田 隆紀
2. 発表標題 結紮誘導歯周炎マウスの炎症歯周組織におけるRNAシーケンスを用いた発現変動遺伝子の解析
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sung-Joon Park, Satoru Onizuka, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Takanori Iwata and Kenta Nakai
2. 発表標題 OpenContami: A Web-based Application for Detecting Microbial Contaminants in Next-generation Sequencing
3. 学会等名 IIBMP2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鬼塚 理, 山崎安晴, 朴 聖俊, 杉本孝之, 曾根由美子, 臼井 通彦, 武田 啓, 中井謙太, 中島 啓介, 岩田隆紀
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析から見える顎・口腔領域由来間葉系幹細胞の遺伝子発現プロファイルの特異性
3. 学会等名 令和元年度日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部会合同研修会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鬼塚 理, 朴 聖俊, 貝淵 信之, 妻沼 有香, 安藤 智博, 中井 謙太, 岩田 隆紀
2. 発表標題 歯根膜組織由来間葉系幹細胞シートによる歯周組織再生
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
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