

平成23年 3月 31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592429

研究課題名(和文)

RhoAによる細胞分化機構を応用した歯根膜細胞移植治療のための基礎的研究

研究課題名(英文)

Investigation of the mechanisms of osteogenic differentiation by RhoA in periodontal ligament cells for cell transplantation

研究代表者

山本 直史(YAMAMOTO TADASHI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：50432662

研究成果の概要(和文)：

歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程は、RhoA-ROCK シグナルが制御する細胞骨格の性状に依存的であり、その細胞骨格は BMP-4 や Wnt3a および Wnt5a などの硬組織分化に関与する遺伝子発現を制御すると考えられる。一方、RhoA および ROCK を過剰発現した歯根膜細胞は著しい細胞増殖能の低下を示したことから、歯根膜細胞の分化は、細胞骨格の性状に加えて、種々の増殖因子や細胞外基質の協調制御が重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：

In periodontal ligament cells (PDL cells), cytoskeletal signaling regulated by Rho-ROCK is critical in the differentiation process, and the expression of osteogenic genes such as BMP-4, Wnt3a, and Wnt5a. Meanwhile over-expression of *RhoA* or *ROCK* showed significant low cell proliferation, suggesting that PDL cells differentiation is coordinately regulated by Rho-ROCK induced cytoskeletal molecules, as well as soluble growth factors and extracellular matrix.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯根膜、細胞分化、RhoA-ROCK シグナル、Y-27632、遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

歯周組織再生のためには、組織中の幹細胞が歯根膜細胞、セメント芽細胞、および骨芽

細胞へと時間空間的に適切に分化・増殖し、連携して機能する組織を構築する必要がある。近年、間葉系幹細胞を用いた再生医療は飛躍

的に発展し、歯周組織にも応用が検討されているが、患者の肉体的負担など改善すべき問題は多い。このような背景で申請者は、簡便にアクセスし易い患者自身の口腔内に存在する歯周組織幹細胞を、遺伝子操作で分化調節することによって、再生治療へ応用することを研究の全体構想とした。幹細胞の分化は、様々な成長因子による制御に加え、細胞骨格および細胞外基質の性状により制御を受け、その制御機構にRhoA-ROCKが深く関与することが近年明らかになっている。故に、本研究では、RhoA-ROCKによる細胞骨格を介した歯根膜細胞の分化機構に関する基礎的データを蓄積した。

2. 研究の目的

本研究では、RhoA-ROCKによる歯根膜細胞の硬組織分化機構を明らかにすることを目的に、以下の項目を調べることを計画した。

- (1) RhoA-ROCK活性を調節した歯根膜細胞の表現型の変化。
- (2) 歯根膜細胞から幹細胞と分化細胞を分離し、RhoAを過剰発現・発現抑制する方法。
- (3) 動物モデルへの歯根膜細胞の移植方法および再生組織の性状。

3. 研究の方法

(1) 歯根膜細胞の培養

抜去歯から分離した歯根膜組織を酵素処理して得たsingle-cell suspension由来の歯根膜細胞を実験に用いた。

(2) 硬組織形成細胞への分化誘導

歯根膜細胞を分化培地にて培養して、細胞骨格分子と骨形成因子の産生プロファイルに対するROCK特異的阻害剤(Y-27632)の影響を定量RT-PCR法とWestern blot法によって調べた。

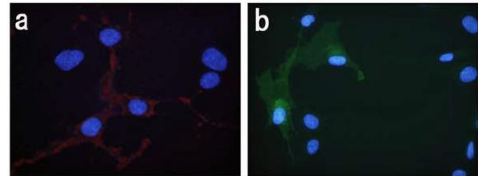
(3) RhoA/ROCKの遺伝子導入

歯根膜細胞に、RhoAおよびROCK過剰発現プラスミド(V14および Δ 3:

Pennsylvania大学Dr. Chenの供与)をエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、その表現型を調べた。

4. 研究成果

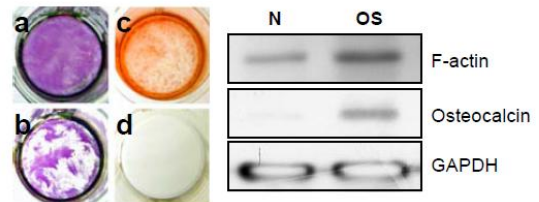
- (1) 歯根膜細胞は、幹細胞マーカーであるSTRO-1とSSEA-4を発現していた。



<図1>

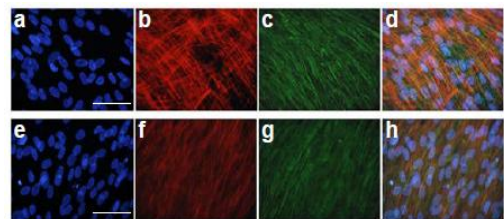
歯根膜細胞(1継代)のSTRO-1(a)およびSSEA-4(b)の免疫蛍光染色像

- (2) 歯根膜細胞は、硬組織形成細胞への分化に伴って、アクチン線維の重合およびRhoA-ROCK活性化の指標であるリン酸化ミオシン軽鎖の産生を促進した。これらの結果は、歯根膜細胞の分化と細胞骨格の関連を初めて示したものと位置づけられる。



<図2>

分化培地(a, c)および正常培地(b, d)で14日間培養した歯根膜細胞(それぞれOS, およびN)のALP染色像(a, b)およびアリザリン染色像(c, d)と、Western blot法によるF-actinとオステオカルシン蛋白の検出像



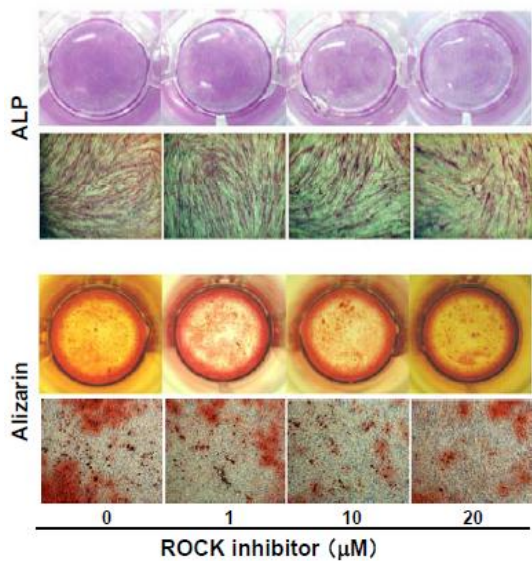
<図3>

分化培地(a-d)および正常培地(e-h)で14日間培養した歯根膜細胞の免疫蛍光染

色像

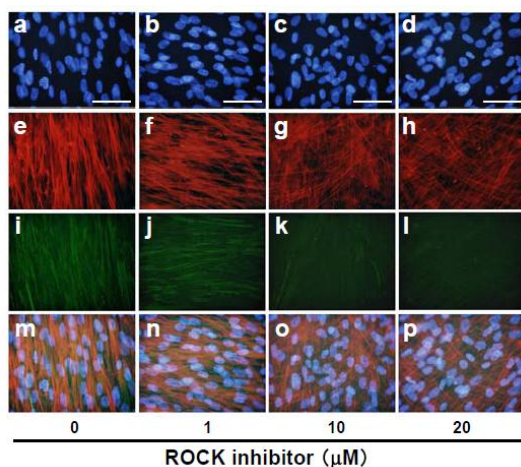
赤：F-actin、緑：リン酸化ミオシン軽鎖、
青：DAPI、d, h：重ね合わせ像

(3) ROCK阻害剤である Y-27632は、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程において、歯根膜細胞のALP活性およびカルシウム沈着量を抑制すると共に、アクチン線維の重合およびオステオカルシン産生を抑制した。つまり、歯根膜細胞の分化が細胞骨格に依存的であることを確認した。



<図 4>

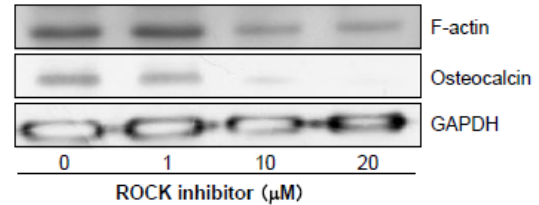
Y-27632 (～20 μM) を添加した分化培地で14日間培養した歯根膜細胞のアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色とアリザリン染色像



<図 5>

Y-27632 (～20 μM) を添加した分化培地で14日間培養した歯根膜細胞の免疫蛍光染色像

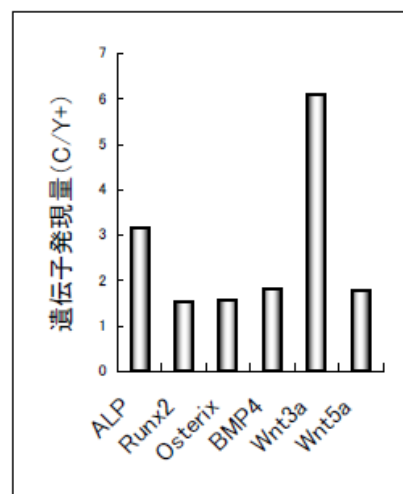
赤：F-actin、緑：リン酸化ミオシン軽鎖、
青：DAPI、d, h：重ね合わせ像



<図 6>

Y-27632 (～20 μM) を添加した分化培地で14日間培養した歯根膜細胞を用いたWestern blot法によるF-actinとオステオカルシン蛋白の検出像

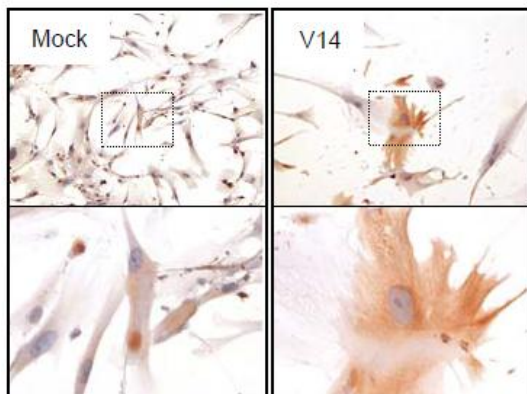
- (4) 歯根膜細胞は硬組織分化に伴って、BMP-2/4、Wnt3a/5a、ALP、Runx2、Osterix、Osteocalcinなどの骨形成に関与する遺伝子や、間葉系幹細胞から硬組織形成細胞への分化過程に関与するfour and a half LIM domains 2 (Fhl2) やintegrin-α 5 (Itga5)、そして細胞骨格と硬組織分化に関与するserum response factor (SRF) などの遺伝子を発現することが分かった。
- (5) 上記遺伝子発現のうち、Y-27632の添加によって、BMP-4、Wnt3a/5a、およびALP遺伝子の発現量が顕著に変動した。



<図7>

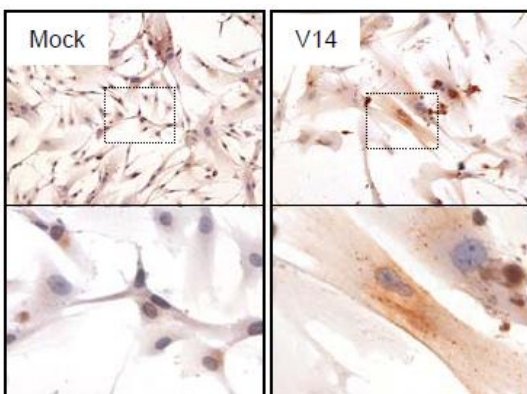
Y-27632非添加 (C)、および添加 (Y+: 10 μ M) した分化培地で培養した歯根膜細胞の遺伝子発現量変化 (C/Y+: ALP, Runx2, Osterix は培養3日後、BMP-2/4、Wnt3a/5aは12日後)

(6) V14プラスミドを遺伝子導入した歯根膜細胞を選択培地で培養することによって、RhoA過剰発現歯根膜細胞株を樹立し、アクチン線維の著しい増加と形態変化を確認した。RhoA過剰発現細胞は未分化増殖マーカーであるSTRO-1陽性であるにも関わらず、著しい細胞増殖能の低下に伴って細胞死を示した。今後、歯周組織への細胞移植治療に臨床応用するためには、種々の増殖因子や細胞外基質の伸展性を調節し得る担体を併用し、歯根膜細胞が分化・増殖するための微小環境をさらに検討する必要がある。



<図8>

RhoAの免疫染色: MockおよびV14ベクターを遺伝子導入した歯根膜細胞のRhoA蛋白局在。下パネルは点線四角エリアの強拡大像



<図9>

STRO-1の免疫染色: MockおよびV14ベクターを遺伝子導入した歯根膜細胞のSTRO-1蛋白局在。下パネルは点線四角エリアの強拡大像

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計3件)

- ① 鶴川祐樹、歯根膜細胞の分化過程におけるBMPとWntシグナルへのRho kinasesの影響. 第134回日本歯科保存学会春季大会、2011/6/10 (発表確定)、千葉
- ② Yamamoto T、Osteogenic differentiation regulated by Rho kinase in periodontal ligament cells. 88th General Session of the International Association for Dental Research、2010/7/15、Spain、Barcelona
- ③ 山本直史、Rho kinasesによる歯根膜細胞の分化制御. 第130回日本歯科保存学会春季大会、2009/6/11、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 直史 (YAMAMOTO TADASHI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号: 50432662

(2) 研究分担者

高柴 正悟 (TAKASHIBA SHOGO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 50226768

峯柴 淳二 (MINESHIBA JUNJI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号: 00509383

山城 圭介 (YAMASHIRO KEISUKE)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 30581087 (H21~H22)

成石 浩司 (NARUISHI KOJI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号: 00346446 (H20)

塩見 信行 (SHIOMI NOBUYUKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 90432632 (H20~H21)

(3) 連携研究者

園山 亘 (SONOYAMA WATARU)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号: 40325121