

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03862

研究課題名（和文）疾患由来iPS細胞レジストリとPLAP-1を基軸とした侵襲性歯周炎の分子病態解明

研究課題名（英文）Analysis of the molecular pathogenesis of aggressive periodontitis based on disease-derived induced pluripotent stem cells and PLAP-1

研究代表者

山田 聡 (Yamada, Satoru)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：40359849

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、未だその発症・進行メカニズムの詳細が不明な侵襲性歯周炎（AgP）において、患者由来のiPS細胞（AgP-iPS細胞株）を樹立し、様々な細胞機能解析を行った。その結果、AgP-iPS細胞は、正常iPS細胞、ヒト歯髄幹細胞、ヒト歯根膜線維芽細胞と比較して、細胞増殖能・硬組織系細胞分化能について異なった表現型を示した。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素への感受性実験から、AgP-iPS細胞株は、ユニークなエピゲノム構成を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、侵襲性歯周炎における原因遺伝子・分子を同定するために様々な遺伝子多型解析やGWAS解析が行われてきた。しかしながら、遺伝子変異とAgPの病態とを結びつける決定的因子の同定には至っていない。本研究では、これまでに世界的にも報告の無かったAgP患者由来iPS細胞を樹立し、そのエピジェネティック機能を解析した。本研究結果から、AgPの分子病態メカニズムの一端が明らかとなり、AgPに対する新たな治療薬や遺伝子診断法の開発の基盤に繋がる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established patient-derived induced pluripotent stem cells (AgP-iPSCs) in aggressive periodontitis (AgP), a condition whose detailed onset and progression mechanisms are still unclear, and performed various cellular functional analyses. As a result, AgP-iPSCs exhibited different phenotypes in terms of cell proliferation ability and differentiation potential into hard tissue compared to normal iPSCs, human dental pulp stem cells, and human periodontal ligament fibroblasts. Furthermore, sensitivity experiments to histone deacetylase enzymes revealed that AgP-iPSCs exhibited a unique epigenomic composition.

研究分野：歯周病学

キーワード：侵襲性歯周炎 疾患由来 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

侵襲性歯周炎 (**Aggressive Periodontitis: AgP**) は、通常の歯周炎とは異なり、その発症と進行に遺伝的要因が関与する比率が高いと考えられており、実際にゲノムワイド関連 (**GWAS**) 解析により原因・関連遺伝子の解明がなされてきた (**Schaefer et al. Hum. Mol. Genet. 2010**)。これまでに申請者らは、**GWAS** 解析から、**G** タンパク共役受容体 **GPR126** やリン脂質酵素 **SMPD3** の遺伝子多型が侵襲性歯周炎の発症リスクに関与していることを見出している (**Masumoto et al. J Periodontal Res. 2018**)。しかしながら、**GWAS** 解析から見出された疾患関連遺伝子について、**AgP** の発症・進行に関わる詳細な細胞機能解析を行うことが、原因遺伝子の確定的な同定には必要不可欠であり、**AgP** の分子病態を深く理解するための喫緊の課題となっている。

近年、疾患の分子病態解明にあたり、様々な疾患由来 **iPS** 細胞を用いた細胞機能解析が行われている。進行性骨化性線維異形成症 (**FOP**) 患者から **iPS** 細胞を樹立し、同細胞の軟骨分化における分子・遺伝子メカニズムを対照群細胞と比較検討することで、**FOP** の原因遺伝子である **ACVR1** 以外に、**MMP1** と **PAI1** 遺伝子の発現異常が **FOP** の発症に重要な役割を担っていることが明らかとなっている (**Matsumoto et al. Stem cell. 2015**)。侵襲性歯周炎は、単一の遺伝子の変異が原因となるだけでなく、複数の遺伝子変異がその発症や進行に関わっているものと考えられる。さらに、**AgP** には様々な病態が存在し、これまでに同定された原因遺伝子も多岐に渡っていることから、**AgP** の分子病態解明には、さらなる網羅的な原因遺伝子解析が必要であると考えられる。

一方、歯根膜特異的分子・遺伝子として見出した **PLAP-1/Asporin** は、歯根膜組織の恒常性維持に重要な役割を担っており、**PLAP-1** 欠損マウスでは、歯根膜の力学的強度が低下した結果、歯周病に対する疾患感受性が上昇すること、さらに、ヒトにおいて存在する遺伝子多型 (**D14** 型 **PLAP-1**) が、**AgP** の発症に関連する可能性を見出している。

2. 研究の目的

本研究では、未だその発症・進行メカニズムの詳細が不明な侵襲性歯周炎 (**AgP**) において、患者由来 **iPS** 細胞 (**AgP-iPS** 細胞株) を樹立し、同細胞株を用いて網羅的な全ゲノム解析と細胞分化機能解析を行うことで、**AgP** の原因となる複数の新たな遺伝子変異群を決定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1). **AgP** 患者からの **iPS** 細胞樹立

東北大学倫理委員会の承認(課題名 侵襲性歯周炎患者由来 **iPS** 細胞による病態解明研究: 2022年 3月 7日承認) を得たのちに、同意を得られた侵襲性歯周炎患者から歯周基本治療時に不良肉芽組織を採取した。得られた不良肉芽組織を **DPBS** で洗浄後にコラゲナーゼ処理を行いセルストレーナーでろ過した。続いて、**10% fetal bovine serum (FBS)** 含有 **Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose (Life Technologies)** 培地でカルチャーディッシュに播種した。隔日間隔で培地を交換し **Outgrowth** してきた細胞を培養 **14** 日目で回収し継代を行った。継代後の歯肉線維芽細胞に対して **PCR** 法による **HIV, HBV, HCV**, マイコプラズマのウィルスチェックを行い、これらの陰性を確認後に **AgP** 患者由来 **iPS** 細胞 (**AgP-iPS** 細胞) 樹立を行った。**AgP-iPS** 細胞は **StemRNA 3rd Gen Reprogramming Kit (REPROCELL, 00-0076)** を用いた **RNA** 法で樹立した。以後の実験については、ヒト **iPS** 細胞 (**RIKEN**)、ヒト歯髄幹細胞 (**hDPSC: dental pulp stem cells, Lonza Inc.**)、ヒト歯根膜線維芽細胞 (**hPDLF: human periodontal ligament fibroblasts, Lonza Inc.**) を対照群として使用した。

(2). **AgP-iPS** および **iPS** 細胞培養

Mitomycin 処理を行った **SNL** 細胞をフィーダー細胞として、**AgP-iPS** および **iPS** 細胞の播種・培養を行った。**AgP-iPS** および **iPS** 細胞の骨芽細胞分化誘導は、まずフィーダー細胞上で **70~80%** コンフルエントまで培養した **AgP-iPS** および **iPS** 細胞を、胚様体 (**EB: embryoid body**) 形成を目的として、**EB** 形成用培地 (**FBS** および **KSR** 含有 **DMEM**) に懸濁し、ペトリディッシュ上に細胞塊を浮遊させた状態で **5** 日間静置した。その後、**EB** 塊を含む培養液を回収・静置し、上清を除去することで沈降した **EB** 塊のみを回収した。続いて、**EB** 塊をゼラチンコーティングディッシュに播種し、**5** 日間 **EB** 形成用培地で培養した。**5** 日後に、**EB** 塊から遊走してきた細胞を回収し、新たなディッシュに播種した。その後通常の継代法にて **10** 回継代を行った。

(3) **AgP-iPS** 由来 **EB** 遊走細胞、**iPS** 由来 **EB** 遊走細胞細胞、**hPDLF**, **hDPSC** 細胞増殖能評価ならびに硬組織形成細胞分化誘導

AgP-iPS 細胞および **iPS** 細胞から得られた各 **EB** 遊走細胞、**hPDLF**, **hDPSC** をゼラチンコーティングディッシュにコンフルエントに播種し、翌日を **day 0** として、硬組織形成分化培地 (**DMEM: アスコルビン酸 (50 µg/ml)**, β -グリセロリン酸 (**10 mM**), デキサメタゾン (**100 nM**))

含有低グルコース **DMEM**)を3日ごとに交換し長期培養を行った。細胞増殖については、培養**0, 3, 6, 9, 12**日目に**WST 法 (CK04, Cell Counting Kit-8, DOJINDO)**による細胞数の相対定量を行った。**ALP**活性は、各細胞を**PBS**で洗浄後にエタノールで固定した。その後精製水で洗浄した後に各ウェルに**ALP 試薬 (0.1M glycine (pH10.4) with 1 mM MgCl₂ and 1 mM ZnCl₂)**を**100 μ l**注入し、**37**で**30**分インキュベートした。その後**50 μ l**の**NaOH**を加えて反応停止後に**405nm**で吸光度測定を行った。**ALP**活性の比較には、各**ALP**測定値を、各タイムポイントにおいて並行して同一培養を行った**3**ウェルの平均**WST**測定値で除した**ALP/WST**値で相対比較を行った。

(4). 各 HDACs inhibitorによるエピゲノム変化が各細胞の増殖および分化におよぼす影響 **iPS**細胞の作製効率上昇や硬組織形成分化制御に関与するヒストン脱アセチル化酵素 (**HDAC**) **inhibitors (RGF966 (HDAC3 特異的 inhibitor), Entinostat MS-275 (HDAC1 および HDAC3 特異的 inhibitor), Trichostatin A (TSA)(pan-HDAC inhibitor)**を様々な濃度で添加した硬組織形成分化培地で **AgP-iPS**由来 **EB**遊走細胞、**iPS**由来 **EB**遊走細胞、**hPDLF**、**hDPSC**を培養し **HDACs inhibitor**によるエピゲノム変化がこれら細胞の分化能におよぼす影響を解析した。

4. 研究成果

(1). EB 形成

AgP-iPS細胞をフィーダー細胞上で培養したところ、正常患者由来 **iPS**細胞と同様の細胞塊を形成 (図1点線内) し、**AgP-iPS**細胞および **iPS**細胞間でその形成効率に明らかな差異は認めなかった。続いて、**AgP-iPS**細胞の **EB**形成を行ったところ(図2)、**EB**塊からゼラチンコーティングディッシュ上に遊走した細胞を回収し継代培養を**10**回繰り返すことで、線維芽細胞様形態の細胞が観察され、その後の実験に供するに十分な細胞量を得た。

図1 AgP-iPS細胞培養

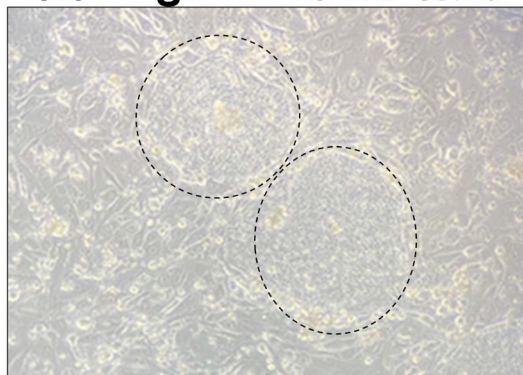


図2 AgP-iPS細胞 EB形成



(2). 細胞増殖能および硬組織形成細胞分化誘導能解析

1.0 x 10³/wellで **AgP-iPS**由来 **EB**遊走細胞、**iPS**由来 **EB**遊走細胞、**hPDLF**および **hDPSC**を播種し経日的な細胞増殖を**WST**法で比較定量したところ、**iPS**由来 **EB**遊走細胞では、**day0 = 1.18424, day3 = 1.3538, day6 = 2.1797, day9 = 2.5476, day12 = 2.9323**と経日的な細胞増殖を示し、特に培養**3**日目以降において著明な促進を示した。一方、**AgP-iPS**由来 **EB**遊走細胞

では、**day0 = 0.9407, day3 = 1.1169, day6 = 1.3406, day9 = 1.3452, day12 = 1.8534** であり、経日的な細胞増殖を認めたものの、**iPS** 細胞と比較して、培養 6 日目以降において有意に低い測定値を示した。並行して解析した **hDPSC** は増殖能が高い細胞であることが知られており、本実験においても **day0 = 0.706796, day3 = 1.40338, day6 = 1.98798, day9 = 1.87352, day12 = 2.61446** と明らかな経日的細胞増殖誘導が示された。**hPDLF** では、**day0 = 1.3422, day 3 = 1.58444, day 6 = 1.59874, day 9 = 1.73482, day12 = 1.85028** となり、長期に培養を行っても **WST** 法による経日的な比較定量では著明な細胞増殖を認めなかった。以上より、**iPS** 由来 **EB** 遊走細胞は、高い増殖能を持つ **DPSC** に近い細胞増殖能を持つ一方で、**AgP-iPS** 由来 **EB** 遊走細胞の細胞増殖能は低いことが示された。硬組織形成細胞分化誘導能については、**AgP-iPS** 細胞および **iPS** 細胞由来の **EB** 遊走細胞では培養 12 日目までにおいて明らかな **ALP/WST** 値の上昇を示さなかった。これは **AgP-iPS** 細胞由来 **EB** 遊走細胞および **iPS** 細胞由来 **EB** 遊走細胞ともに間葉系幹細胞への分化が十分でなかったためと考えられる。一方で、間葉系に **commitment** している **DPSC** および **PDLF** では経日的な **ALP/WST** 値の上昇を示した。

(3). 各 **HDACs inhibitor** が各細胞の増殖および分化におよぼす影響

HDAC3 特異的 **inhibitor** である **RGFP966** を **0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 μM** 濃度で添加した硬組織形成分化培地で **iPS** 細胞由来 **EB** 遊走細胞を培養すると、**5 μM** を最大濃度して **ALP/WST** 値の有意な上昇を誘導することが明らかとなった。一方、**AgP-iPS** 細胞由来 **EB** 遊走細胞では、いかなる濃度においても **ALP/WST** 値の上昇は認められなかった。**HDAC1** および **HDAC3** 特異的 **inhibitor** である **MS-275** を **0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 μM** 濃度で添加した硬組織形成分化培地で **iPS** 細胞由来 **EB** 遊走細胞を培養すると、**2 μM** を最大濃度して **ALP/WST** 値の有意な上昇を誘導することが明らかとなった。一方、**AgP-iPS** 細胞由来 **EB** 遊走細胞では、**0.5, 1, 2 μM** 濃度でわずかに **ALP/WST** 値の上昇が認められたものの、**MS-275** の効果は限定的であった。**pan-HDAC inhibitor** である **TSA** を **0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 μM** 濃度で添加した硬組織形成分化培地で **iPS** 細胞由来 **EB** 遊走細胞を培養すると、いかなる濃度においても **ALP/WST** 値の上昇は認められなかった。一方、**AgP-iPS** 細胞由来 **EB** 遊走細胞では、**0.2 μM** を最大濃度して **ALP/WST** 値の有意な上昇を誘導することが明らかとなった。**iPS** 細胞由来 **EB** 遊走細胞と **AgP-iPS** 細胞由来 **EB** 遊走細胞の硬組織形成分化に対して各 **HDAC inhibitors** が異なった表現型を誘導することは、**iPS** 細胞由来 **EB** 遊走細胞と **AgP-iPS** 細胞由来 **EB** 遊走細胞において異なったエピゲノムが構成されていることを示唆しており、現在、全ゲノム的なクロマチン構造解析を行っており、並行して行っているトランスクリプトーム解析結果と統合的に解析することで、**AgP** 由来細胞におけるエピジェネティクスな機序を介した責任 **mRNA** や **non-coding RNA** (**miRNA, lncRNA, snoRNA** など) の単離が可能となりうることを示された。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akiko Sato, Shigeki Suzuki, Hang Yuan, Rahmad Rifqi Fahreza, Xiuting Wang, Eiji Nemoto, Masahiro Saito, Satoru Yamada	4. 巻 24
2. 論文標題 Pharmacological Activation of YAP/TAZ by Targeting LATS1/2 Enhances Periodontal Tissue Regeneration in a Murine Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24020970	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 H Yuan, S Suzuki, H Terui, S Hirata-Tsuchiya, E Nemoto, K Yamasaki, M Saito, H Shiba, S Aiba, S Yamada	4. 巻 101
2. 論文標題 Loss of I B Drives Dentin Formation via Altered H3K4me3 Status	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 951-961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/00220345221075968	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 Satoru Yamada, Kenichiro Tsushima, Masaki Kinoshita, Hiromi Sakashita, Tetsuhiro Kajikawa, Chiharu Fujihara, Hang Yuan, Shigeki Suzuki, Takayuki Morisaki and Shinya Murakami	4. 巻 11
2. 論文標題 Mouse Model of Loews-Dietz Syndrome Shows Elevated Susceptibility to Periodontitis via Alterations in Transforming Growth Factor-Beta Signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2021.715687	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 袁航、鈴木茂樹、佐藤瞭子、山本真豊、根本英二、齋藤正寛、山田 聡
2. 発表標題 PPARG is required for periodontal ligament cells to retain differentiation capacity of hard-tissue formation
3. 学会等名 2020年度春季日本歯周病学会学術大会（第63回）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤瞭子、鈴木茂樹、袁航、山本真豊、根本英二、齋藤正寛、山田 聡
2. 発表標題 メカノレスポンス因子MAP4K4の歯根膜における発現とその機能解析
3. 学会等名 2020年度春季日本歯周病学会学術大会（第63回）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張井玉、向阪 幸彦、丸山顕太郎、石幡浩志、鈴木茂樹、根本英二、山田 聡
2. 発表標題 精密マイクロパンチ加工で製作された純チタン多孔膜上における骨芽細胞様細胞培養
3. 学会等名 2020年度春季日本歯周病学会学術大会（第63回）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 令、丸山顕太郎、向阪幸彦、根本英二、鈴木茂樹、山田 聡
2. 発表標題 炎症・メカニカル環境下における歯根膜細胞の新たな抗炎症システムーマクロファージIL-10分泌誘導因子の発現ー
3. 学会等名 2020年度春季日本歯周病学会学術大会（第63回）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 YUAN, S. SUZUKI, A. SATO, T. YAMAMOTO, E. NEMOTO, M. SAITO, S. YAMADA
2. 発表標題 PPAR is required for periodontal ligament cells to retain cemento/osteogeneity
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research
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
研究分担者	森崎 隆幸 (Morisaki Takayuki) (30174410)	東京大学・医科学研究所・特任研究員 (12601)	
研究分担者	江草 宏 (Egusa Hiroshi) (30379078)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	鈴木 茂樹 (Suzuki Shigeki) (30549762)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	根本 英二 (Nemoto Eiji) (40292221)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	
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	梶川 哲宏 (Kajikawa Tetsuhiro) (90611252)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

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