

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09876

研究課題名(和文) 転写因子PAX9を標的とした歯根膜幹細胞誘導因子の同定

研究課題名(英文) Identification of periodontal ligament stem cell inducer targeting transcription factor PAX9

研究代表者

濱野 さゆり (Hamano, Sayuri)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40757978

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)：本研究では、転写因子PAX9がiPS細胞由来神経堤細胞の歯根膜幹細胞への分化誘導に及ぼす影響について解析することを目的とした。PAX9のみを過剰発現させた歯根膜細胞の細胞外基質には、期待したほどの歯根膜幹細胞誘導能が認められなかったことから、iPS細胞から歯根膜幹細胞を分化誘導させるには、他の転写因子が関与している可能性が示唆された。また、PAX9と相補的に機能するとされているMSX1は、歯根膜幹細胞の分化誘導に関与していない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

歯根膜幹細胞は、歯周組織の再生において中心的な役割を持つことが知られているが、ヒト歯根膜組織から得られる幹細胞は0.07%と極めて少なく、臨床へと応用することが困難である。本研究の目的は、歯根膜細胞誘導因子を同定することであり、これによりiPS細胞から歯根膜幹細胞を簡便かつ安定して誘導することが可能となる。これは、新規歯周組織再生療法の開発につながる意義の高い研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to analyze the effect of the transcription factor PAX9 on the differentiation of iPS cell-derived neural crest cells into periodontal ligament stem cells (PDLSCs). Since the extra cellular matrix of human PDL cells overexpressing PAX9 did not have the expected ability to induce periodontal ligament stem cells, it was suggested that other transcription factors are involved in the differentiation of PDLSCs from iPS cells. Furthermore, it was revealed that MSX1, which is known to work complementary with PAX9, is not involved in the differentiation of PDLSCs.

研究分野：分子生物学

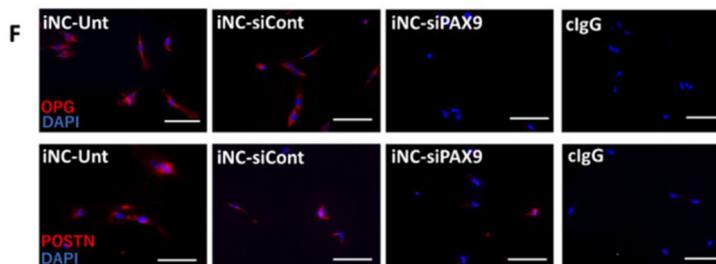
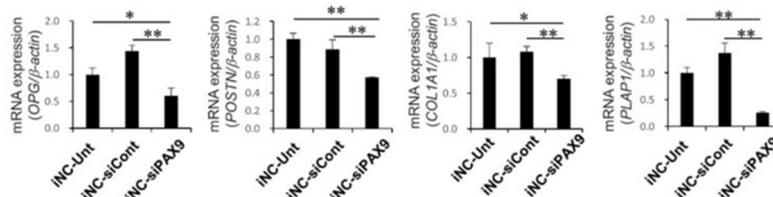
キーワード：iPS細胞 PAX9 歯根膜幹細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周組織は、歯肉、セメント質、歯槽骨および歯根膜組織から構成されており、その中で歯根膜組織は歯の植立において重要な役割を担っている。この歯根膜組織中に含まれる幹細胞は、歯周組織の再生において中心的な役割を持つことが知られている(Seo et al. 2004)。しかしながら、ヒト歯根膜組織から得られる幹細胞は 0.07% と極めて少なく(Hidaka et al. 2012)、研究および臨床へ応用することが困難である。そのため、歯根膜幹細胞を簡便かつ多量に獲得する方法の確立が求められている。

iPS 細胞は様々な体細胞から樹立可能であることから、自己移植することで、拒絶反応のリスクを低く抑えることができる(Takahashi et al. 2013)。また近年では、拒絶反応が生じない iPS 細胞の研究開発も進められており、様々な分野において iPS 細胞を応用した再生医療の開発が進められている。しかしながら、歯周組織の再生において iPS 細胞を応用した治療法は未だ開発されていない。申請者らは既に、歯根膜幹細胞の発生源である神経堤細胞へ分化誘導した iPS 細胞(iNC 細胞)を、HPDLC から得た ECM 上で培養することで、高い増殖能ならびに多分化能を有し、間葉系幹細胞マーカーおよび歯根膜細胞マーカーを高発現する iPDLSC 細胞へ分化誘導することに成功している(Hamano et al. 2018)。一方、ヒト皮膚線維芽細胞(SF)から得た ECM 上では、iNC 細胞が iPDLSC 細胞へと分化誘導されないことを確認している。これらの結果から、HPDLC に由来する ECM 中に、iPS 細胞から iPDLSC 細胞へ分化を誘導する因子が含まれていることが推察された。そこで、申請者らはこのような誘導因子を同定し、それを応用して多量の iPDLSC 細胞を簡便かつ安定して獲得することを発案した。

これまでに申請者らは、HPDLC において高発現する 9 種の ECM 関連タンパク上にて iNC 細胞の培養を行ったが、iPDLSC 細胞への分化誘導は認められなかった。この結果から、HPDLC における ECM の複合体の中から Factor-X を同定することは困難であると判断し、本研究では **Factor-X の産生を制御すると考えられる転写因子の同定を行うこととした。**



(Sugiura et al. 2022)

申請者らは、HPDLC および SF の遺伝子発現について網羅的解析を行い、HPDLC において高発現する転写因子である PAX9 を抽出した。PAX9 の発現を抑制した HPDLC から得た ECM 上では、iNC 細胞から iPDLSC 細胞への分化誘導が認められないことを確認した(Sugiura et al. 2022)。

PAX9 は、胚初期から発現しており、頭蓋、胸腺および四肢の発達など様々な組織の形成に関与する転写因子である(Peters et al. 1998)。その中でも特に、PAX9 は歯の発生に関与することが報告されているが、神経堤細胞の歯根膜幹細胞分化に与える影響については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、PAX9 が iPDLSC 細胞の分化誘導に及ぼす影響について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

PAX9 遺伝子を過剰発現させた HPDLC の ECM における歯根膜幹細胞誘導能の評価

【目的】PAX9 遺伝子を過剰発現させた HPDLC の ECM における歯根膜幹細胞誘導能について検討した。

【方法】PAX9 遺伝子の発現ベクターを作製し、PAX9 遺伝子を過剰発現させた HPDLC (PDL-oeP9 細胞)を樹立した。PDL-oeP9 細胞または HPDLC に empty ベクターを導入した細胞(PDL-oeEMP 細胞)の ECM 上にて iNC 細胞を播種し、14 日後の細胞について、以下の解析を行った。

(A) 幹細胞特性解析：

- (a)表面抗原解析：間葉系幹細胞は CD90、CD105、CD146 等の表面抗原を高発現することから、Flow cytometry 解析を用いてこれらの表面抗原の発現について比較検討した。
- (b)増殖能解析：歯根膜幹細胞は、他の組織幹細胞よりも高い増殖能を示すことが報告されているため、WST-1 assay を用いて増殖活性について比較検討した。

(B) 歯根膜細胞特性解析：歯根膜組織は Periostin (POSTN)、Periodontal ligament-associated protein-1 (PLAP1)、Osteoprotegerin (OPG)等を高発現することから、RT-PCR 法を用いて、これらの遺伝子発現について比較検討した。

MSX1遺伝子の過剰発現ベクターの作製

【目的】PAX9 と相補的に働く MSX1 遺伝子を過剰発現させるためのベクターを作製する

【方法】MSX1遺伝子をHPDLCより抽出し、ベクターを作製後、HEK293細胞にMSX1を導入し、Westan blot法にてMSX1が過剰発現されているか確認した。

PAX9およびMSX1をダブルノックダウンしたHPDLCのECMにおける歯根膜幹細胞誘導能の評価

【目的】PAX9 および MSX1 遺伝子をダブルノックダウンさせた HPDLC の ECM における歯根膜幹細胞誘導能について検討した。

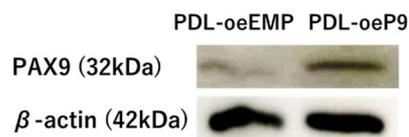
【方法】PAX9 の siRNA ならびに MSX1 の siRNA を同時に HPDLC に導入し、PAX9 ならびに MSX1 の遺伝子発現をダブルノックダウンさせた HPDLC を作製した。PAX9 および MSX1 をダブルノックダウンした HPDLC、Control siRNA を導入した HPDLC、または PAX9 のみをノックダウンした HPDLC の ECM 上にて iNC 細胞を播種し、14 日後の細胞について歯根膜細胞マーカーの発現について RT-PCR 法にて解析を行った。

4. 研究成果

PAX9 遺伝子を過剰発現させた HPDLC の ECM における歯根膜幹細胞誘導能の評価

PDL-oeEMP および PDL-oeP9 細胞における幹細胞特性について Flow cytometry 解析および WST-1 assay を用いて解析した結果、表面抗原発現および増殖能は同程度であった。また、歯根膜細胞マーカーについて RT-PCR を用いて解析した結果、PDL-oeP9 の ECM 上にて培養した iNC 細胞は、PDL-oeEMP の ECM 上にて培養した iNC 細胞と比較して、歯根膜細胞マーカーの発現は上昇する傾向にあった。

しかしながら、PAX9 を過剰発現させた HPDLC の ECM には期待したほどの歯根膜幹細胞誘導能が認められなかったことから、PAX9 と相補的に働くこととされている、Msh Homeobox 1-Like Protein (MSX1)に着目することとした。MSX1 は歯の発生において PAX9 と相補的に働くことが報告されている。そこで、HPDLC における MSX1 および PAX9 を過剰発現またはノックダウンさせることとした。



MSX1遺伝子の過剰発現ベクターの作製

MSX1 の過剰発現ベクターを作製し、まずはベクターの導入効率の高い細胞である HEK293 細胞に導入し、Westan blot 法にてタンパク発現について解析した。その結果、empty ベクター導入群と比較して、MSX1 のタンパク発現は上昇しなかった。何度かベクターの再作製を行ったが、MSX1 のタンパク発現を過剰発現させることができなかった。

歯根膜幹細胞誘導における PAX9 と MSX1 の関係について検討するため、MSX1 の siRNA を用いた実験を行うこととした。

PAX9 および MSX1 をダブルノックダウンした HPDLC の ECM における歯根膜幹細胞誘導能の評価

PAX9 および MSX1 の siRNA を同時に HPDLC に導入し、ダブルノックダウンした HPDLC を作製した。Control siRNA を導入した HPDLC、PAX9 のみノックダウンした HPDLC、PAX9 ならびに MSX1 をダブルノックダウンした HPDLC の ECM 上にて培養した iNC 細胞における歯根膜細胞マーカーの発現について RT-PCR 法を用いて検討した。PAX9 をノックダウンした HPDLC の ECM 上にて培養した iNC 細胞は、Control siRNA を導入した HPDLC 上にて培養した iNC 細胞と

比較して、歯根膜細胞マーカーの発現が減少した。一方で、PAX9 および MSX1 をダブルノックダウンした HPDLC の ECM 上にて培養した iNC 細胞における歯根膜細胞マーカーの発現は、PAX9 のみノックダウンさせた HPDLC の ECM 上にて培養した iNC 細胞と同程度であった。このことから、iNC 細胞における歯根膜幹細胞への分化誘導において MSX1 は関与していない可能性が示唆された。また、歯根膜幹細胞誘導因子 Factor-X を同定するには、PAX9 と他の転写因子との関係を調べる必要があることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 Sugiura Risa, Hamano Sayuri, Tomokiyo Atsushi, Hasegawa Daigaku, Yoshida Shinichiro, Sugii Hideki, Fujino Shoko, Adachi Oriie, Kadowaki Masataka, Yamashita Daiki, Maeda Hidefumi	4. 巻 10
2. 論文標題 PAX9 Is Involved in Periodontal Ligament Stem Cell-like Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells by Regulating Extracellular Matrix	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 2366 ~ 2366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10102366	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 Hamano Sayuri, Sugiura Risa, Yamashita Daiki, Tomokiyo Atsushi, Hasegawa Daigaku, Maeda Hidefumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Current Application of iPS Cells in the Dental Tissue Regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 3269 ~ 3269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10123269	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 Ipposhi K, Tomokiyo A, Ono T, Yamashita K, Anas MA, Hasegawa D, Hamano S, Yoshida S, Sugii H, Itoyama T, Ogawa M, Maeda H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Secreted Frizzled-Related Protein 1 Promotes Odontoblastic Differentiation and Reparative Dentin Formation in Dental Pulp Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10092491.	査読の有無 無
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 Yoshida S, Sugii H, Itoyama T, Kadowaki M, Hasegawa D, Tomokiyo A, Hamano S, Ipposhi K, Yamashita K, Maeda H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of a novel direct pulp-capping material using 4-META/MA-TBB resin with nanohydroxyapatite.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2021.112426.	査読の有無 無
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 0件）

1. 発表者名 山下大輝、濱野さゆり、藤野翔香、杉浦梨沙、前田英史
2. 発表標題 フィーダーフリーにて培養可能なiPS細胞の歯根膜幹細胞様細胞分化の評価
3. 学会等名 第157回日本歯科保存学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M Anas Alhasan, Atushi Tomokiyo, Taiga Ono, Keita Ippoushi, Kozue Yamashita, Sayuri Hamano, Daigaku Hasegawa, Hideki Sugii, Hidefumi Maeda
2. 発表標題 Hyaluronic Acid Promotes the Differentiation of Human Neural Crest-like Cells into Periodontal Ligament Stem-like Cells
3. 学会等名 第157回日本歯科保存学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱野さゆり、杉浦 梨紗、山下 大輝、友清 淳、杉井英樹、吉田晋一郎、糸山 知宏、前田英史
2. 発表標題 Fibrillin-2がiPS細胞の歯根膜幹細胞様細胞への分化誘導に及ぼす影響について
3. 学会等名 第21回再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉浦梨紗、濱野さゆり、友清淳、長谷川大学、吉田晋一郎、杉井英樹、山下大輝、前田英史
2. 発表標題 iPS細胞から歯根膜幹細胞様細胞への分化誘導能を有する候補因子の同定
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022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	前田 英史 (Maeda Hidefumi) (10284514)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	吉田 晋一郎 (Yoshida Shinichiro) (30778866)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	糸山 知宏 (Itoyama Tomohiro) (50884433)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	藤野 翔香 (Fujino Shoko) (60883832)	九州大学・歯学研究院・特別研究員 (17102)	
研究分担者	小幡 純子 (Obata Jyunko) (70759448)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	杉井 英樹 (Sugii Hideki) (80802280)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

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