

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16991

研究課題名（和文）幹細胞動員ペプチドを用いた歯周組織再生増強法の確立

研究課題名（英文）Possible periodontal regenerative therapy by stem cell mobilization

研究代表者

阪下 裕美（Sakashita, Hiromi）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：90779092

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：歯根膜には組織幹細胞が存在し、歯周組織の恒常性維持や再生を担っていますが、その詳細な機序は不明です。そこで本研究では、組織幹細胞を含む集団としてPDGFR陽性細胞に着目し、歯周組織におけるPDGFR陽性細胞系譜や同細胞中のPDGFRシグナルの機能をマウス生体内で検討しました。その結果、同細胞が歯周組織構成細胞へと直接分化することで歯周組織再生を担っていることやPDGFRシグナル非依存性に増殖・分化することを見出しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織におけるPDGFR陽性細胞やPDGFRシグナルの役割を明らかにした本研究成果により、PDGFR陽性細胞をターゲットにした歯周組織再生療法開発に向けた基盤情報が得られました。今後、同細胞が誘導される機序を解明することにより、より効率的な再生療法の開発が期待できます。また歯周組織において初めて、少数の細胞に遺伝子変異を起こすと同時に、同細胞の運命を生体内で追跡する、モザイク変異解析を応用しました。

研究成果の概要（英文）：The periodontal ligament contains a stem cell population and plays an essential role in periodontal tissue homeostasis and regeneration. However, the detailed mechanism remains unclear. This study focused on PDGFR positive cells as the stem cell population and traced their lineage in vivo. We also investigated the role of PDGFR signaling in this lineage. We found that PDGFR positive cells, independently of PDGFR signaling, differentiated into periodontal ligament fibroblasts, osteoblasts, and cementoblasts in a cell-autonomous manner.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生 幹細胞 歯根膜 HMGB1ペプチド PDGFR

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は歯周組織の破壊を引き起こす慢性炎症性疾患であり、原因であるプラーク除去療法のみでは、失われた歯周組織を再生させることはできず、安全で有効性の高い歯周組織再生療法の確立が今も求められている。歯根膜には組織幹細胞が存在し、必要に応じて増殖・分化することで歯周組織の恒常性維持や再生がなされると考えられるが、歯周組織再生に関与する組織幹細胞の局在およびその機能については十分に明らかになっていない。

近年、皮膚や心臓などの損傷組織において、DNA結合タンパク Highly Mobility Group Box 1 (HMGB1) ペプチドが骨髄由来 Platelet Derived Growth Factor Receptor α 発現 (PDGFR α 陽性) 細胞を動員することにより、組織再生を促進することが明らかとなってきた。しかしながら PDGFR α 細胞の歯周組織における局在や損傷時の動態の詳細は明らかとなっていない。

研究代表者はこれまでに脂肪組織における PDGFR α 陽性細胞について、Pdgfra-CreER マウスを用いた系譜解析や、Pdgfra および Pdgfrb 遺伝子の機能欠失もしくは機能亢進による影響を検討してきた。特に、従来のコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析では、Cre 発現細胞集団全体の機能を欠失するため、その影響が直接的もしくは二次的なものを判別することが難しいという問題意識から、ほとんどの細胞を野生型として保存したまま、少数の細胞にのみ遺伝子変異を誘導する「モザイク変異解析法」を開発し、PDGFR シグナルが脂肪細胞への分化に与える影響を解明してきた (Sun* and Sakashita* et al., Cell Stem Cell, 2020, *Contributed equally)。

2. 研究の目的

本研究では、歯周組織における PDGFR α 陽性細胞の細胞系譜を生体内で追跡し、歯周組織再生に寄与するかを明らかにするとともに、HMGB1 ペプチド投与による同過程への影響を検討することにより、新たな歯周組織再生療法開発につながる基盤情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究計画では、歯周組織再生に関わる細胞として PDGFR α 細胞に着目し、同細胞の歯周組織における局在、分化および機能を明らかにするために以下の3つの実験を実施した。

(1) シングルセル RNA-seq を用いた歯根膜細胞における PDGFR α 陽性細胞の解析

8週齢野生型マウス歯周組織から細胞を単離し、シングルセル RNA-seq を行うことで、歯周組織構成細胞中の PDGFR α 陽性細胞の割合や細胞種を同定するとともに、その遺伝子発現プロファイルを検討した。

(2) 歯周組織における PDGFR α 陽性細胞の系譜解析

Pdgfra-CreER; R26-LSL-tdTomato マウスの腹腔内にタモキシフェンを投与して PDGFR α 陽性細胞を蛍光タンパク標識し、組織切片を作製することで歯周組織における同細胞の局在を組織学的に解析した。また、それらの細胞が歯周組織再生時にどのような動態を示すかについて、マウスの臼歯に絹糸を結紮することで炎症を惹起した歯周炎モデルマウスの臼歯を用いて組織学的に解析を行う。同モデルマウスでは絹糸を結紮する (Day -7) ことで、1週間後の Day 0 には歯槽骨の吸収が認められる。Day 0 で絹糸を除去すると Day 7 には歯槽骨の再生が認められることから、本研究では絹糸除去前の Day -2 でタモキシフェンを投与し、歯槽骨再生過程における Day 5 での歯周組織の組織学的解析を行った。

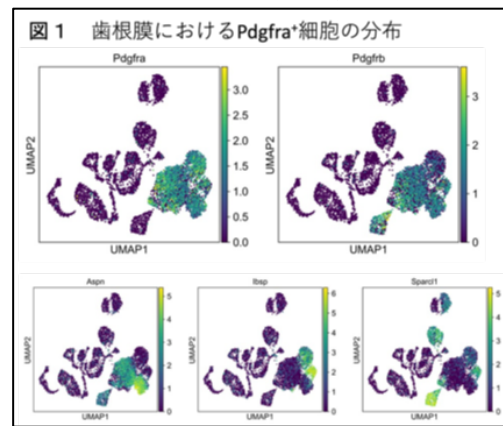
(3) 「モザイク変異解析法」を用いた歯周組織における PDGFR α の機能解析

従来、Cre-loxP システムを用いた組織特異的な遺伝子改変では遺伝子変異を起こす対象となる組織、細胞集団が広いために変異細胞からの二次的な影響を考慮できず、細胞自律的な遺伝子の機能を解析することは困難であった。そこで、これまでに開発した Cre-loxP と Flp-Frt の2つの組み換え酵素を利用した「モザイク変異解析法」を応用し、歯周組織における PDGFR α の機能解析を行った。歯周組織の PDGFR α 陽性細胞のうち、PDGFR α 欠失を起こした細胞の一部のみを tdTomato 標識して追跡する「 α LOF」、PDGFR α シグナル亢進を起こした細胞の一部のみを tdTomato 標識して追跡する「 α GOF」、について、野生型の細胞の一部のみを tdTomato 標識して追跡する対照群と比較した。

4. 研究成果

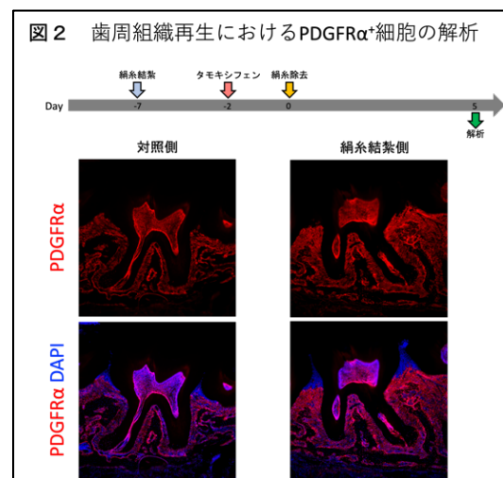
(1) シングルセル RNA-seq を用いた歯根膜細胞における PDGFR α 陽性細胞の解析

8週齢マウスの歯周組織から歯根膜細胞を多く含んだ細胞単離方法を開発し、シングルセル RNA-seq を実施した (Iwayama et al., Development, 2022)。その結果、歯周組織の PDGFR α 陽性細胞 (図1左上) は *Plap-1* (*Aspn*) 陽性の歯根膜細胞 (図1左下) の一部および *Ibsp* 陽性の骨芽細胞 (図1下中央) や *Sparcl1* 陽性のセメント芽細胞 (図1右下) と一致する細胞集団であることが明らかとなった。また PDGFR β 陽性細胞 (図1右上) は PDGFR α 陽性細胞集団と大部分が一致する一方で、*RGS5* 陽性の壁細胞を含んでいる点で PDGFR α とは異なる細胞集団であることが明らかとなった。



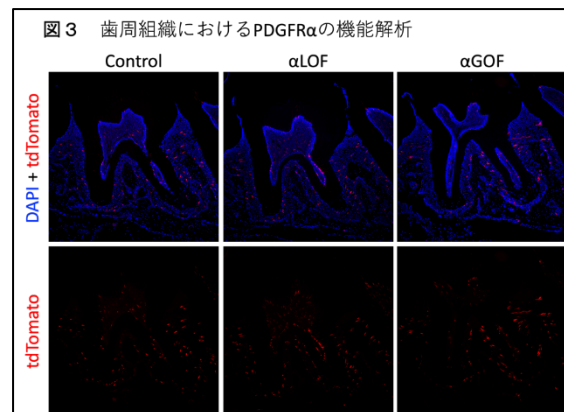
(2) 歯周組織における PDGFR α 陽性細胞の系譜解析

まず、組織損傷を与えていない対照側においては、(1)におけるシングルセル RNA-seq 解析の結果と一致して、歯根膜の多くの細胞が PDGFR α 陽性細胞系譜であった。また、歯髄、骨髄の間葉系細胞、さらに歯槽骨内の少数の骨細胞も PDGFR α 陽性細胞系譜であった (図2左)。絹糸結紮側では対照側で認められた細胞群に加え、組織修復した歯根膜、歯槽骨の主な細胞群が PDGFR α 陽性細胞系譜であり、(図2右)、PDGFR α 陽性細胞が cell autonomous に組織修復に寄与していることが明らかとなった。



(3) 「モザイク変異解析法」を用いた歯周組織における PDGFR α の機能解析

歯周組織の一部の PDGFR α 細胞系譜から PDGFR α 遺伝子をノックアウトしたマウス (α LOF)、PDGFR α シグナルを亢進させたマウス (α GOF) において、歯根膜、歯髄、骨髄、歯槽骨に少数の *tdTomato* 陽性細胞を認め、(2)の結果と比べ、その分布は同様で、標識細胞数が少なかったことから、想定通り、ほとんどの細胞を野生型として保存したまま一部の細胞のみに遺伝子変異を起こしており、歯周組織においても「モザイク変異解析法」が可能であることが明らかとなった。また、対照群と比較して、 α LOF および α GOF マウスに明らかな形態異常や細胞増殖、細胞分化に差を認めなかったことから、同細胞中は PDGFR α シグナル非依存性に増殖・分化することが示唆された。



(4) その他の研究成果

本研究において用いた歯周炎モデルマウスは絹糸を除去してから7日後の短期間で自然治癒及び歯槽骨の再生が認められたため、DNA結合タンパク *highly mobility group box 1* (HMGB1) ペプチドの効果を検討することは困難であった。老齢マウスにも歯周炎モデルを用いて検討したが、若齢に比較すると歯槽骨の再生は穏やかであるものの、自然治癒が短期間で起こることが明らかとなった。今後は、ビーグル犬など大動物での検討が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 北垣 次郎太、松本 昌大、藤原 千春、阪下 裕美、平井 麻絵、山下 元三、北村 正博、村上 伸也	4. 巻 66
2. 論文標題 歯根膜細胞の骨芽細胞分化におけるカテプシンAの影響	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 214 ~ 223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11471/shikahozon.66.214	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 Iwayama Tomoaki, Iwashita Mizuho, Miyashita Kazuya, Sakashita Hiromi, Matsumoto Shuji, Tomita Kiyako, Bhongsatiern Phan, Kitayama Tomomi, Ikegami Kentaro, Shimbo Takashi, Tamai Katsuto, Murayama Masanori A., Ogawa Shuhei, Iwakura Yoichiro, Yamada Satoru, Olson Lorin E., Takedachi Masahide, Murakami Shinya	4. 巻 149
2. 論文標題 Plap-1 lineage tracing and single-cell transcriptomics reveal cellular dynamics in the periodontal ligament	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	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） 10.1242/dev.201203	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 Yao Longbiao, Rathnakar Bharath H., Kwon Hae Ryong, Sakashita Hiromi, Kim Jang H., Rackley Alex, Tomasek James J., Berry William L., Olson Lorin E.	4. 巻 40
2. 論文標題 Temporal control of PDGFR regulates the fibroblast-to-myofibroblast transition in wound healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111192 ~ 111192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.111192	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 Iwayama Tomoaki, Sakashita Hiromi, Takedachi Masahide, Murakami Shinya	4. 巻 58
2. 論文標題 Periodontal tissue stem cells and mesenchymal stem cells in the periodontal ligament	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 172 ~ 178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2022.04.001	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 Ueda Tsugumi, Iwayama Tomoaki, Tomita Kiwako, Matsumoto Shuji, Iwashita Mizuho, Bhongsatiern Phan, Sakashita Hiromi, Fujihara Chiharu, Takedachi Masahide, Murakami Shinya	4. 巻 11
2. 論文標題 Zbp1-positive cells are osteogenic progenitors in periodontal ligament	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87016-1	査読の有無 無
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 Yamada Satoru, Tsushima Kenichiro, Kinoshita Masaki, Sakashita Hiromi, Kajikawa Tetsuhiro, Fujihara Chiharu, Yuan Hang, Suzuki Shigeki, Morisaki Takayuki, Murakami Shinya	4. 巻 12
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 715687
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 無
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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 阪下 裕美, 岩山 智明, 松本 修治, 岩下 瑞穂, Phan Bhongsatiern, 瀧瀬 友斗, 吉田 悠作, 菊田 順一, 上中 麻希, 鎗 信弥, 揚村 朋弥, 石井 優, 村上 伸也
2. 発表標題 歯周組織由来破骨前駆細胞の解析
3. 学会等名 第66回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 沢田 啓吾, 竹立 匡秀, 森本 千晶, 下村 純平, 川崎 公輔, 村田 真里, 河上 和馬, 阪下 裕美, 岩山 智明, 村上 伸也
2. 発表標題 IGFBP7が歯根膜細胞の細胞機能に与える影響の解析
3. 学会等名 第66回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩下 瑞穂, 岩山 智明, 富田 貴和子, 松本 修治, パーン ボンサティアン, 阪下 裕美, 宮下 和也, 北山 智美, 池上 健太郎, 新保 敬史, 玉井 克人, 竹立 匡秀, 山田 聡, 村上 伸也
2. 発表標題 歯根膜-細胞アトラスの構築
3. 学会等名 第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本 修治, 岩山 智明, 阪下 裕美, 富田 貴和子, 岩下 瑞穂, Phan Bhongsatiern, 竹立 匡秀, 村上 伸也
2. 発表標題 リンパ管新生誘導による歯周組織修復促進
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩下 瑞穂, 岩山 智明, 富田 貴和子, 松本 修治, Phan Bhongsatiern, 阪下 裕美, 竹立 匡秀, 村上 伸也
2. 発表標題 Sparcl1陽性セメント芽細胞の解析
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩下 瑞穂, 岩山 智明, 富田 貴和子, 松本 修治, Phan Bhongsatiern, 阪下 裕美, 竹立 匡秀, 山田 聡, 村上 伸也
2. 発表標題 定量解析を目的とした歯根膜からの細胞単離法の開発
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本 修治、岩山 智明、阪下 裕美、富田 貴和子、岩下 瑞穂、Phan Bhongsatiern、村上 伸也
2. 発表標題 歯周組織におけるリンパ管の役割
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizuho Iwashita, Tomoaki Iwayama, Kiwako Tomita, Shuji Matsumoto, Phan Bhongsatiern, Hiromi Sakashita, Masahide Takedachi, Satoru Yamada, Shinya Murakami
2. 発表標題 Novel isolation method for quantitative analysis of periodontal ligament-derived cells
3. 学会等名 2021 IADR (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuji Matsumoto, Tomoaki Iwayama, Kiwako Tomita, Mizuho Iwashita, Phan Bhongsatiern, Hiromi Sakashita, Masahide Takedachi, Shinya Murakami
2. 発表標題 Increased Lymphatic Vessels During Periodontal Tissue Repair
3. 学会等名 2021 IADR (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------