

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21018

研究課題名(和文) 歯根膜幹細胞転換を誘導する化合物の探索およびそれを用いた新規歯周組織再生法の創出

研究課題名(英文) The search for compounds that induce the stem cell conversion of periodontal ligament cells and the creation of a novel periodontal tissue regeneration therapy

研究代表者

長谷川 大学 (Hasegawa, Daigaku)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20757992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はまず、ヒト歯根膜細胞株(2-52)にMEST遺伝子を導入し誘導したヒト歯根膜幹細胞様細胞のcDNAを用いて網羅的遺伝子解析を行い、MESTの発現上昇に伴い、Cadherin-2(CDH2)の発現が上昇することを明らかにした。そこで我々は、CDH2の発現を誘導することが知られているBMP4に着目し、次に、BMP4タンパクを添加した培地にて2-52を培養することで歯根膜幹細胞への転換を試みた。その結果、BMP4により、2-52における幹細胞マーカー発現が上昇し、さらに骨芽細胞および脂肪細胞への分化能を示した。以上より、BMP4がヒト歯根膜細胞における幹細胞転換を誘導する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、BMP4タンパク刺激がヒト歯根膜細胞の幹細胞転換を誘導する可能性を見出すことができた。歯根膜幹細胞は、破壊された歯周組織の再生における移植細胞源として有用であることが明らかになっているが、臨床応用を想定した場合、患者の抜去歯から採取した歯根膜組織より分離できる幹細胞の数には限界があり、十分な数の幹細胞を獲得することが困難なことが課題となっている。本研究の成果により、BMP4タンパク刺激のみで効率よく歯根膜幹細胞を誘導することができることが明らかになった。今後この知見により、より効果的な歯周組織再生法の開発へと繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We first performed a comprehensive genetic analysis using cDNA of human periodontal ligament stem cell-like cells induced by transfection of the MEST gene into a human periodontal ligament cell line (2-52) and found that cadherin-2 (CDH2) expression increased with the increase in MEST expression. We then focused on BMP4, which is known to induce CDH2 expression, and attempted to convert 2-52 into periodontal ligament stem cells by culturing them in a medium supplemented with BMP4 protein. The results showed that BMP4 increased the expression of stem cell markers in 2-52, and also showed the ability to differentiate into osteoblasts and adipocytes. These results suggest that BMP4 may induce stem cell conversion in human periodontal ligament cells.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯根膜幹細胞 幹細胞転換 BMP4

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重度のう蝕や歯周病によって歯周組織が大きく傷害された場合、組織の修復・再生が困難となり、治癒に至らず抜歯となるケースが少なくない。そのため、不可逆的に喪失した歯周組織を効果的かつ効率的に修復・再生する治療法の開発が待望されている。近年、歯根膜組織の中に、骨芽細胞、脂肪細胞および軟骨細胞への分化といった多分化能を有する未分化な細胞(歯根膜幹細胞)が存在し、この細胞が歯周組織再生の有用なツールになることが報告された(Seo et al., 2004)。その後も、筋、神経、血管、さらには網膜、脾臓、腱・靭帯など全身の様々な組織細胞への分化が可能なが報告されるなど、その汎用性はますます拡大している。

申請者らの研究グループでも、これまでに、患者の抜去歯から分離した歯根膜細胞からヒト歯根膜幹細胞株を樹立し、この細胞がマウス生体内において骨および歯根膜様組織形成能を有することを示した(Fujii et al., 2008)。また別の研究では、歯根膜幹細胞が免疫抑制能を有すること(Wada et al., 2009)や、そのエクソソームが骨芽細胞分化を促進すること(未発表)を見出した。これらの知見は、破壊された歯周組織の再生における移植細胞源として歯根膜幹細胞が有用であることを示唆している。ただし、臨床応用を想定した場合、患者の抜去歯から採取した歯根膜組織より分離できる幹細胞の数には限界があり、十分な数の幹細胞を獲得することが困難なことが課題である。

この問題に対し、申請者は、歯根膜幹細胞を獲得する新たな方法として、歯根膜幹細胞に高発現する因子を同定し遺伝子導入することで歯根膜幹細胞の誘導を図ることを発案した。その結果、歯根膜幹細胞に高発現する因子として mesoderm-specific transcript (MEST) を同定し、さらに、多分化能を有さないヒト歯根膜細胞株に MEST 遺伝子を導入することで、多分化能を有する幹細胞様の細胞に転換させることに成功した(Hasegawa et al., 2020)。この方法は、単一の遺伝子の導入のみで歯根膜幹細胞を誘導するという過去に例のない画期的なものである。しかしながら、この“歯根膜幹細胞転換”のメカニズムは未だ明らかではない。歯根膜幹細胞転換を臨床に活用するためには、そのメカニズムを明らかにし、より簡便かつ効率的な歯根膜幹細胞転換法を確立することが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、歯根膜幹細胞転換のメカニズムのキーとなる“MEST 遺伝子の発現を制御するシグナル因子”を明らかにし、その因子を活性化させる“低分子化合物”を見出すことで、より簡便かつ効率的な歯根膜幹細胞転換法を新たに確立することを目的とする。

1. 研究の方法

(1) ヒト歯根膜細胞の幹細胞転換を制御するシグナル因子の同定

まず、多分化能を有さないヒト歯根膜細胞株(2-52)に MEST 遺伝子を導入した歯根膜幹細胞様細胞(2-52_MEST)と、コントロールベクター導入細胞(2-52_empty)を用いて、網羅的遺伝子解析(cDNA マイクロアレイ法)を行った。これにより、2-52_empty と比較して 2-52_MEST において発現の高い因子を複数抽出した。

次に、抽出した各因子の siRNA を用いて、2-52_MEST における各因子の発現をノックダウンさせ、幹細胞マーカーの発現および多分化能への影響について、以下の方法により検討を行った。

幹細胞マーカー発現解析...間葉系幹細胞表面抗原マーカーの発現について、定量的 RT-PCR 法ならびにフローサイトメトリー分析法にて解析する。

多分化能解析...分化アッセイ系(骨芽細胞および脂肪細胞分化)の誘導培地を用いて一定期間培養後、石灰化物および脂肪滴形成能について、各種染色法にて検討する。また、各々のマーカー発現を RT-PCR 法にて解析する。

(2) 幹細胞転換に関与する因子を標的とするタンパクの探索

方法(1)および(2)において同定された因子(Cadherin-2)は Bone Morphogenic Protein type 4(BMP4)により発現が誘導されることが報告されている(Hamada et al., 2007; Damian et al., 2011)。そこで、リコンビナント BMP4 タンパクを添加した培地にて 2-52 を一定期間培養したのち、2-52 における Cadherin-2 ならびに MEST の発現、および幹細胞マーカーの発現について、定量的 RT-PCR 法およびフローサイトメトリー分析法にて解析を行った。

さらに、BMP4 がヒト歯根膜細胞の幹細胞転換に及ぼす影響について明らかにするため、リコンビナント BMP4 タンパクを添加した培地にて 2-52 を一定期間培養したのち、方法(1)同様、多分化能への影響について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 網羅的遺伝子解析の結果、2-52_MEST において、細胞接着因子 Cadherin-2 の発現が高いことが分かった(図1)

Gene symbol	log2 signal intensity		Compare_Ratio
	2-52_empty	2-52_MEST	
PITX2	38.97	252.83	6.49
PIEZO2	13.05	77.36	5.93
MEST	46.10	132.36	2.87
HOXD8	24.43	63.78	2.61
TET1	54.39	138.11	2.54
COL12A1	123.25	291.34	2.36
CDH13	618.97	1397.29	2.26
SEMA3D	95.76	206.42	2.16
CDK19	1209.92	2134.40	1.76
L1CAM	91.30	190.58	2.09
CDH2	3138.36	5067.12	1.61
HAPLN2	1211.09	1942.60	1.60
CD109	1032.55	1647.86	1.60
ACTB	5202.87	8210.08	1.58
FOXO3	2477.26	3865.84	1.56

図1: 網羅的遺伝子解析による歯根膜幹細胞転換制御因子の探索

また、2-52_MEST における Cadherin-2 の発現をノックダウンすると、CD146 や p75NTR と いった間葉系幹細胞マーカーの発現が低下し、かつ骨芽細胞および脂肪細胞分化能も低下した (図2)。

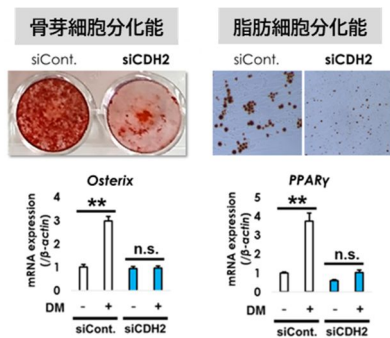


図2: Cadherin-2 をノックダウンすることにより、多分化能が低下した。

- (2) 2-52 を BMP4 添加培地にて一定期間培養した結果、2-52 における Cadherin-2 ならびに MEST の遺伝子発現が上昇した。また、間葉系幹細胞マーカー (CD146 および p75NTR) の発現が上昇し、さらに、骨芽細胞および脂肪細胞分化能も獲得した (図3)。

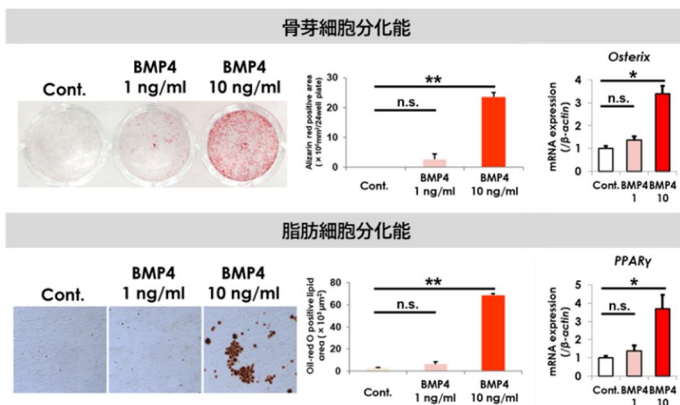


図3: BMP4タンパク刺激により、ヒト歯根膜細胞が多分化能を獲得した。

本研究において、BMP4 タンパク刺激により、ヒト歯根膜細胞における CDH2 ならびに MEST の発現、および間葉系幹細胞マーカーの発現が上昇したことから、BMP4 が、CDH2 の発現上昇を介して、ヒト歯根膜細胞の幹細胞転換を誘導する可能性が示唆された。

しかしながら、本研究の最終目標はあくまで歯根膜幹細胞転換を誘導する“低分子化合物”を見出すことである。そこで今後は、今回の一連の研究で我々が見出した BMP4-CDH2 シグナリングを軸に、その関連化合物のスクリーニングを行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川大学、田下滉大、Kidsen Huang、兼子大志、前田英史
2. 発表標題 BMP4によるヒト歯根膜細胞の幹細胞転換の可能性
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長谷川大学、田下滉大、Kidsen Huang、兼子大志、前田英史
2. 発表標題 Cadherin-2はヒト歯根膜細胞の幹細胞転換に関与する
3. 学会等名 第159回日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2023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
---------	---------