

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390466

研究課題名(和文) 歯周組織幹細胞の非対称性細胞分裂の破れと疾患発症のメカニズム

研究課題名(英文) Asymmetric stem cell division in the homeostasis and the disease onset of periodontal tissue

研究代表者

山下 元三 (YAMASHITA, MOTOZO)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：90524984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：臓器特異的な非対称性細胞分裂機構は、自己複製による幹細胞数の維持並びに組織特異的な前駆細胞への分化誘導を制御する上で重要である。歯周組織幹細胞の非対称性細胞分裂機構の生理作用を明らかにする為に、ヒト歯根膜細胞の*in vitro*老化誘導系を樹立した。歯根膜細胞は、継代培養依存的な細胞分裂に伴ってES細胞特異的マーカーである、SSEA3/4 陽性亜集団の減少を示した。トランスクリプトーム並びにプロテオームからなるトランスオミクスアプローチにより、幹細胞枯渇の一因として細胞外基質蛋白の変動を同定した。歯周組織の恒常性の維持には、幹細胞 ニッチェシステム維持の適切な細胞外基質の生成が必要である。

研究成果の概要(英文)：An asymmetric cell division is crucial for the pool of the tissue stem cells and homeostasis of the organs. To dissect role of the asymmetric stem-cell divisions in the periodontal tissue, we first established the induction model for the senescence in human periodontal ligament (HPDL) cells in the primary culture. HPDL cells showed the decreased ratio of the SSEA3/4, ES cell marker, positive subpopulations depends on the progression of the cell dividing. Trans OMICS approach involving the analysis of transcriptome and proteome identified the global change of profiles in extra cellular matrix (ECM) protein species for the stem-cells exhaustion in senescent HPDL cells. We suggest the proper ECM synthesis is indispensable for the cellular communications in the stem cells/ niches in the homeostasis of periodontal tissue.

研究分野：歯周病系治療学

キーワード：歯周組織幹細胞 ニッチェ 非対称性細胞分裂 ECM蛋白

1. 研究開始当初の背景

臓器が組織学的形態を維持しその生理機能を発揮するためには、傷害を受けた細胞組織の速やかな除去に連続して、微小環境での組織構成細胞の自己複製並びに幹細胞からの新たな組織前駆細胞の供給や遊走、組織に特異的な細胞分化が誘導されることが必要である。すなわち、組織幹細胞は幹細胞ニッチとの相互作用によりその幹細胞性を維持している。幹細胞は、幹細胞を取り囲むように位置するニッチ細胞膜上の細胞外マトリクス及び、増殖・分化因子などの生体シグナル分子を介した刺激により、細胞極性を維持し、非対称性細胞分裂を行っている。その結果、自分自身(幹細胞)と分化の運命が方向付けられた前駆細胞を産み出す自己複製能と多分化能を維持することになる。

歯根膜組織中には、歯根膜、歯槽骨、セメント質の修復再生を可能ならしめる臓器特異的間葉系幹細胞が存在しており(Seo BM. et al., *Lancet*, 2004)、歯周組織の恒常性維持や歯周病によって破壊された歯周組織の修復再生において必須の役割を果たしている。

一方、老化個体の臓器においては、特徴的な自己修復能の低下が認められることが報告されている。この低下は、間葉系幹細胞から組織構成細胞への種の供給並びに細胞集団を支える幹細胞ニッチの異常、いわゆる“非対称性幹細胞分裂のやぶれ”による幹細胞性の破綻が原因であると考えられている。このことから、幹細胞性の根幹をになう“歯周組織幹細胞の非対称性細胞分裂”メカニズムの解明が、加齢によって組織の破壊と喪失を伴って進行する、歯周病の病態の理解の為に極めて重要である。

申請者は、細胞の増殖分化に重要であるTGF- β 、BMPs、Wnts、FGF-2に代表される生体シグナル分子の細胞内シグナル伝達機構の生理的意義の解明に取り組んでおり、骨粗鬆症や炎症性関節疾患の病態発症には間葉系幹細胞や骨芽細胞など組織前駆細胞の細胞内サイトカインシグナル伝達機構の異常が原因であることを明らかにしてきた。興味深いことに、歯根膜組織の機能に密接に関連している分子として、歯根膜組織の全遺伝子解析により同定・解析されたものは、全て分泌型の細胞外基質(ECM)及び関連分子であり、歯根膜細胞の石灰化の促進や抑制を通じて恒常性や再性能を制御するものであった。これは、歯根膜組織中における“幹細胞-ニッチ”の存在及び歯根膜細胞のニッチとしての機能、サイトカインによる幹細胞性制御機構を強く示唆するものである。

本研究では、歯根膜組織中の“歯根膜幹細胞-ニッチ”の同定に取り組むとともに、歯周組織の恒常性維持の根幹をつくる“歯根膜幹細胞の非対称性分裂”の生体シグナル分子による制御機構を明らかにすることは、歯周病の発症、歯周組織の破壊、修復再生にお

けるその生理的意義の解明にあたり、重要な課題と考えられた。

2. 研究の目的

臓器特異的な幹細胞の“非対称性細胞分裂機構”は、自己複製による幹細胞数の維持並びに組織特異的な前駆細胞への分化誘導を制御する上で必須の機構である。本研究では、歯周組織の恒常性維持機構のみならず、歯周病の病態発症から組織再生の全ての過程における、“歯周組織幹細胞の非対称性細胞分裂”の生理的役割を明らかにすることで歯周組織の破壊と再生のメカニズムの解明に取り組むことを目標としている。

3. 研究の方法

in vitro 歯周炎病態モデルにおける歯根膜幹細胞の非対称性細胞分裂機構の解析を目的とし、初代培養ヒト歯根膜細胞(HPDLs)を用いる。HPDLsはES細胞に特異的なマーカーであるSSEA3/4並びに間葉系幹細胞マーカーであるCD105、CD73陽性の細胞亜集団を含んでおり、その幹細胞能をBrdU取り込み量を指標とした細胞周期解析をもとに評価する。

歯根膜細胞は歯周組織においては多能性間葉系幹細胞としての機能を果たすことから、歯根膜細胞の培養系を用いて、歯周組織発生或は再生過程に重要な幹細胞から、歯周組織構成細胞(線維芽細胞、骨芽細胞、セメント芽細胞)への分化並びに老化を細胞レベルで評価する。

細胞ストレスとなる歯根膜細胞内ROSとその産生並びにATP代謝の場であるミトコンドリアについて検討する。

ニッチの機能が報告されている血管内皮細胞と歯根膜細胞の共培養系あるいは、脂肪組織由来幹細胞の培養系に、生体シグナル分子を添加し幹細胞能を検討する。

ニコチンの歯周組織構成細胞に及ぼす*in vitro* 並びに *in vivo* 効果を検討する。

幹細胞性維持の分子機構を解明する為に、歯根膜細胞を試料としてcDNA、microRNAの異なるプラットフォームから構成される遺伝子全網羅解析、

歯根膜細胞の細胞培養上清の蛋白画分をnanoLC-ESI-MS/MSによるプロテオーム解析にて検討する。

4. 研究成果

初代培養ヒト歯根膜細胞 (HPDLs) を用いた複製老化の誘導により、HPDLs は継代数を重ねるにつれ、すなわち細胞分裂の進行に伴い、ES 細胞に特異的なマーカーである SSEA3 陽性細胞数の著明な減少をみとめた。しかしながら、間葉系幹細胞マーカーである CD105、CD73 陽性の細胞亜集団の割合に低下は認めなかった。実際に、幹細胞能を *BrdU* 取り込み量を指標とした細胞周期解析をもとに評価した結果、継代数を重ねた老化歯根膜細胞においては幹細胞集団の割合は著明に減少していた。これは幹細胞能維持に必須な、“非対称性細胞分裂機構”の破綻が、亜集団の幹細胞-ニッチ細胞相互において生じたことを意味する。

老化歯根膜細胞は、硬組織分化長期培養において、石灰化物形成能が低下していることが確認された。

老化歯根膜細胞は、幹細胞性の維持に対してストレスとなる細胞内 ROS 蓄積量の著明な増加が認められた。透過型電子顕微鏡による形態解析によりの最大の ROS 産生並びに ATP 代謝の場であるミトコンドリアの異常な形態並びに局在を認めた。更には、脂質二重膜からなるオートファゴソームの形成の異常を認めた。

FGF2 と VEGF の添加により、歯根膜細胞は NG2 陽性の pericyte として血管内皮細胞の管腔形成を誘導した。鈍化したイヌ脂肪組織由来幹細胞は組織特異的間葉系幹細胞としての性質を示した。実際に、イヌ歯周組織欠損部位への移植において有為な組織再生効果を示した。これらのことより、歯根膜細胞ならびに脂肪組織由来幹細胞は幹細胞集団のみならず、ニッチ細胞への分化能を有することが示された。

ニコチンの *in vitro* 培養系への添加により、歯周組織上皮細胞のみならず、歯根膜細胞の増殖作用並びに硬組織形成細胞への分化能が抑制された。ニコチンのマウス絹糸結紮歯周病病態モデルへの *in vivo* 投与により、歯周組織の破壊が促進されたことが、 μ CT を用いた定量解析、組織切片を用いた解剖学的観察により確認された。この際に老化細胞に特異的な SASP 現象と同様の炎症性サイトカイン産生がみとめられた。

継代数の少ない歯根膜細胞と老化歯根膜細胞を試料として cDNA、microRNA の異なるプラットフォームから構成される遺伝子全網羅解析にて両方向性の検討を行

った。その結果、老化歯根膜細胞においては、ヒストン脱メチル化酵素である *jmjd3* を標的とする miR146a の発現の増加並びに DNA メチル化酵素、DNMT1 を標的とする miR148b の発現の低下を同定した。また、ECM 蛋白の産生並びに幹細胞性の維持に重要であることが報告されている miR34a、let-7family の発現の減少を認めた。これらは、歯根膜幹細胞能の幹細胞性維持には、エピジェネティックな修飾が必要であることを示唆するものである。

継代数の少ない歯根膜細胞と老化歯根膜細胞を試料として細胞培養上精の蛋白画分を nanoLC-ESI-MS/MS によるプロテオーム解析した結果、歯根膜組織特異的な ECM 蛋白である periostin の産生の低下を同定した。

歯根膜細胞の幹細胞性喪失に伴った変動を示した ECM 蛋白並びに発現の分子基盤情報を、マウスを用いた歯周炎モデル、脂肪組織由来幹細胞の移植による犬歯周組織再生モデルの病理組織像の結果を参照した統合バイオインフォマティクスデータベースとして発展させ“歯根膜幹細胞の非対称性細胞分裂”の生理モデル構築へと本研究を発展させる予定である。

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)

[雑誌論文](計 4 件)

Takanori Kawahara, Motozo Yamashita, Kuniko Ikegami, Tomomi Nakamura, Manabu Yanagita, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
TGF-beta negatively regulates the BMP2-dependent early commitment of periodontal ligament cells into hard tissue forming cells PLOS ONE May 13, 2015

Yuko Kurushima, Kazunori Ikebe, Ken-ichi Matsuda, Kaori Enoki, Soshiro Ogata, Motozo Yamashita, Shinya Murakami, Yoshinobu Maeda, Osaka Twin Research Group
Examination of the Relationship between Oral Health and Arterial Sclerosis without Genetic Confounding through the Study of Older Japanese Twins PLOS ONE May 26 2015

Manabu Yanagita, Yuko Kojima, Mikiko Kubota, Kenta Mori, Motozo Yamashita, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami. Cooperative effects of FGF-2 and VEGF-A in periodontal ligament cells. J Dent Res 93:89-95, 2014

Masao Ozasa, Keigo Sawada, Tomoaki Iwayama, Satomi Yamamoto, Chiaki Morimoto, Hanayuki Okura, Akihumi Matsuyama, Hiroshi Komoda, Chun Man Lee, Yoshiki Sawa, Masahiro Kitamura, Tomoko Hashikawa, Masahide Takedachi, Shinya Murakami. Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells Inflammation and Regeneration, 34: March 2014

〔学会発表〕(計 7件)

池上久仁子、山下元三、中村友美、柳田学、野崎剛徳、山田聡、北村正博、村上伸也 老化歯根膜細胞における細胞外基質蛋白の発現変動、第 142 回日本歯科保存学会 2015 年度春季大会、2015/06、福岡

Kuniko Ikegami, Motozo Yamashita, Tomomi Nakamura, Mikiko Kubota, Kenta Mori, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami Analysis of cellular senescence in aged human periodontal ligament cells. AAP 100th Anniversary Annual Meeting. 2014/09 San Francisco, USA

Mikiko Kubota, Manabu Yanagita, Kenta Mori, Shiori Hasegawa, Satoko Yamaba, Motozo Yamashita, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami The Effects of Cigarette Smoke Condensate and Nicotine on Periodontal Tissue Destruction in a Periodontitis-model Mouse AAP 100th Anniversary Annual Meeting. 2014/09 San Francisco, USA

Motozo Yamashita, Tomomi Nakamura, Kuniko Ikegami, Satoko Yamaba, Mikiko Kubota, Kenta Mori, Manabu Yanagita, Takenori Nozaki, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami Autophagy regulates extracellular matrix production by human periodontal ligament cells AAP 100th Anniversary Annual Meeting. 2014/09 San Francisco, USA

Kuniko Ikegami, Motozo Yamashita, Tomomi Nakamura, Mikiko Kubota, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami Analysis of microRNAs in senescent human periodontal ligament cells

第 62 回国際歯科学研究学会日本部会 (JADR) 学術大会 2014/12、大阪

Toshie Nagayasu-Tanaka, Jun Anzai, Shu Takaki, Noriko Shiraishi, Akio Terashima, Taiji Asano, Takenori Nozaki, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami Action mechanism of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) on periodontal regeneration in beagle dogs 第 62 回国際歯科学研究学会日本部会 (JADR) 学術大会 2014/12、大阪

池上久仁子、山下元三、中村友美、山本智美、竹立匡秀、柳田学、山田聡、北村正博、村上伸也 老化歯根膜における ROS 産生機構の解析 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会 2014/12、岐阜

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 元三 (YAMASHITA MOTOZO)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号：90524984

(2) 研究分担者

村上 伸也 (MURAKAMI SHINYA)
大阪大学・歯学研究科 (研究院)・教授
研究者番号：70239490

研究分担者
柳田 学 (YANAGITA MANABU)

大阪大学・歯学研究科（研究院）・助教
研究者番号： 80379081

研究分担者

竹立 匡秀 (TAKEDACHI I MASAHIDE)
大阪大学・歯学研究科（研究院）・助教
研究者番号： 60452447

(3)連携研究者
：なし