

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792326

研究課題名(和文) 歯根膜分化誘導因子の同定

研究課題名(英文) Identification of factors to differentiate into periodontal ligament cells

研究代表者

小笹 匡雄(Ozasa, Masao)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20624563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：イヌ脂肪組織由来間葉系幹細胞を硬組織形成細胞分化誘導条件下にて培養することにより、歯根膜組織に高発現するplap-1遺伝子が誘導されることを明らかにした。一方で、歯根膜細胞におけるPLAP-1分子の発現制御メカニズムを解析した結果、低酸素応答因子HIF-1 alphaが同分子の発現誘導に積極的に関与していることが明らかとなった。さらに、歯根膜細胞より分泌される液性因子が、脂肪組織由来間葉系幹細胞のperiostin遺伝子発現を誘導することが示唆された。以上の結果より、歯根膜細胞の分化誘導メカニズムの一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Gene expression of plap-1 (Periodontal Ligament Associated Protein-1) was induced by the mineralization inducing culture in canine adipose tissue-derived stem cells. On the other hand, activation of HIF-1 alpha by hypoxic culture or treatment of reagents resulted in up-regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells. Furthermore, secreted factors from periodontal ligament cells stimulated the gene expression of periostin in adipose tissue-derived stem cells. These results partly revealed the mechanisms that promote the differentiation of stem cells into periodontal ligament cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯根膜 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

歯根膜組織は、歯と歯槽骨という二つの硬組織の間に介在する結合組織であり、線維性付着により歯を歯槽骨に保持するという役割を担う一方で、咬合時にはその圧感覚受容体としての機能から咬合力を緩衝する役割を担う。また、歯根膜組織中には、体性幹細胞が内在することが知られており、歯槽骨やセメント質といった硬組織と結合組織とのリモデリングに関与することが知られている。このような歯根膜組織の機能は、歯周組織の恒常性維持に必須であると同時に、歯周病によって破壊された歯周組織の修復・再生過程において中心的な役割を果たしていると考えられる。

申請者の所属する研究室では、歯根膜組織の特徴を分子生物学的アプローチにより解明してきた。矯正治療のために便宜除去された歯の歯根膜組織から mRNA を抽出し、cDNA ライブラリを作製、トランスクリプトーム解析を行ってきた。その結果、靭帯組織としての特徴を表すように collagen type I、collagen type III の高い発現を認める一方で、Osteonectin 遺伝子などの石灰化関連遺伝子の高い発現を認めた。さらに、新規細胞外基質である Periodontal Ligament Associated Protein-1 (PLAP-1) の単離・同定に成功し、歯周組織のなかでも歯根膜組織に特異的に発現する分子ということを確認した。また *periostin* 遺伝子の解析から歯根膜組織に特異的に発現する splicing isoform である *periostin* type II の存在も明らかにした。興味深いことに、これら歯根膜組織に特異的に発現する両分子は、硬組織形成細胞への分化を調整する役割を果たすことがわかっており、歯根膜が硬組織形成能を有する一方で、結合組織として恒常性を維持しながら、歯の支持組織として機能するのに重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、歯周病の病態形成時および創傷治癒過程における歯根膜組織の役割や、その制御機構の解明など、まだまだ今後明らかにすべき課題は多い。

近年、ES 細胞や iPS 細胞、さらには各組織に内在する体性幹細胞などの多分化能を有する細胞は理論上、体内に存在するすべての組織や臓器を構成する細胞に分化することが可能であるため、再生医療の革新的発展につながると期待されており、実際にヒトでの応用が開始している事例も少なくない。申請者らは、歯周組織再生の分野における幹細胞の応用について検討を重ねてきた。特に、申請者は脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) に着目し、同細胞の移植による歯周組織再生効果を検討してきた。その結果、ビーグル犬の歯槽骨欠損部に ADSC を移植することにより、歯槽骨、セメント質、歯根膜組織の新生を伴う歯周組織再生効果を見出した。このことは、*in vivo* で移植した ADSC が部位特異的な分化

を遂げ、歯周組織再生を誘導するということを示唆している。

また、多分化能を有する細胞は再生医療への応用だけでなく、病因・診断の解析手法としても注目を集めている。患者自身の細胞から iPS 細胞を誘導する、あるいは患者の患部とは別部位から組織型幹細胞を単離し、特定の細胞へ分化誘導することにより、採取が困難な組織の細胞を患者の遺伝情報を有したまま *in vitro* で作製することができる。このような手法の確立は、その病因や発症のメカニズムの解明、さらには薬剤に対する感受性の評価を可能にし、これまで詳細なメカニズムが解明されていなかった難病へのアプローチを可能にすると考えられている。実際、心筋細胞や神経細胞などはその分化誘導因子が明らかとなっており、幹細胞から *in vitro* での分化誘導が可能である。しかしながら、未分化間葉系幹細胞移植が歯根膜組織を含む歯周組織の再生を誘導することが *in vivo* にて明らかとされている一方で、*in vitro* にて未分化間葉系幹細胞から歯根膜細胞を分化誘導することに成功したという報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、PLAP-1 および *periostin* の両分子を高発現する細胞を歯根膜細胞と定義し、未分化間葉系幹細胞から歯根膜細胞への分化を運命づける因子の同定と分化誘導法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) イヌ ADSC の単離

ビーグル犬の腹部大網膜を全身麻酔にて採取し、コラゲナーゼ処理後、フィコールを用いた比重遠心により単核球を分離、24 時間の培養後に EDTA 処理により ADSC を単離した。ADSC の間葉系幹細胞マーカー発現は、各マーカー特異的抗体を用いて、FACS にて解析を行った。

(2) 細胞培養

硬組織形成細胞への分化誘導はベータグリセロリン酸、アスコルビン酸含有の培養培地 (以下、石灰化誘導培地) を 3 日毎に培地交換することにより行った。ヒト歯根膜細胞の培養は 10% ウシ血清含有 alpha MEM を用いて行い、低酸素条件での培養は、酸素濃度調整可能なインキュベーターを用いて、1% 酸素濃度にて培養を行った。

4. 研究成果

(1) イヌ ADSC における *plap-1* 遺伝子の発現誘導

FACS を用いた解析によりビーグル犬体網膜より単離された ADSC の表面抗原発現について確認した。その結果、単離された細胞は CD29 陽性、CD44 陽性、CD90 陽性、CD105 陰

性、CD140a 陰性であり、これまで報告されているプロファイルと同一であることが確認された(図1)。

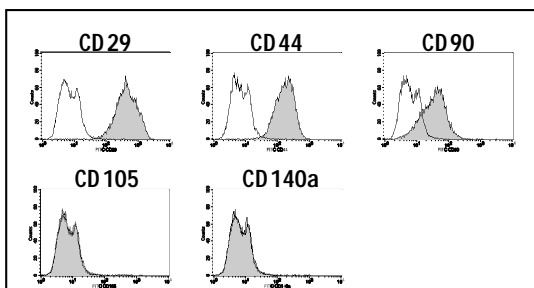


図1
イヌ ADSC における間葉系幹細胞マーカー発現

また同細胞はフィブロネクチンを表面コートした培養ディッシュにおいて高い増殖能を示した。そこで、同細胞を石灰化誘導培地にて培養し、各種遺伝子の発現を real time PCR 法にて検討した。その結果、培養7日目、14日目で *Runx2* 遺伝子の発現上昇が確認され、21日目で *collagen type 1* 遺伝子の発現上昇が認められた。同培養条件下における *plap-1* 遺伝子の発現について検討したところ、培養7日目から培養21日まで上昇していることが明らかとなった(図2)。

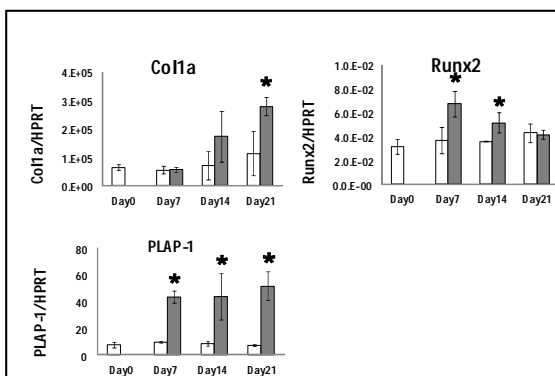


図2
ADSC の硬組織形成細胞への分化過程における type I コラーゲン、RUNX2、PLAP-1 遺伝子の発現

(2) PLAP-1 分子の発現制御解析
PLAP-1 分子の発現制御メカニズムに関して解析を行った。*plap-1* 遺伝子のプロモーター領域に、低酸素応答性領域 (HRE) が認められたため、同分子が低酸素条件下での培養により発現誘導されるか否かについて検討を行った。歯根膜細胞を低酸素下にて培養することにより、*plap-1* mRNA の発現が有意に上昇することが real time PCR 法にて明らかとなるとともに、培養上清中のタンパク発現が上昇することをウェスタンブロット法にて確認した。そこで次に、同分子の発現上昇に低酸素応答因子(HIF-1 alpha)が関与するか

否かについて検討を加えた。HIF-1 alpha の安定化試薬である deferoxamine 存在下にて歯根膜細胞を培養したところ、*plap-1* mRNA の発現上昇を認めた。さらに HIF-1 alpha 阻害剤である chetomin を用いて阻害実験を行ったところ、低酸素あるいは deferoxamine によって誘導される *plap-1* mRNA 発現は chetomin 存在下にて有意に抑制された。

(3) 歯根膜細胞由来液性因子が ADSC に及ぼす影響の解析

歯根膜細胞由来の液性因子が間葉系幹細胞の歯根膜細胞への分化を誘導するか否かについて検討を行った。歯根膜細胞の培養上清存在下にて ADSC を培養し、*periostin* 遺伝子の発現について解析した結果、歯根膜細胞の培養上清は ADSC の *periostin* mRNA 発現を有意に上昇させることが明らかとなった(図3)。

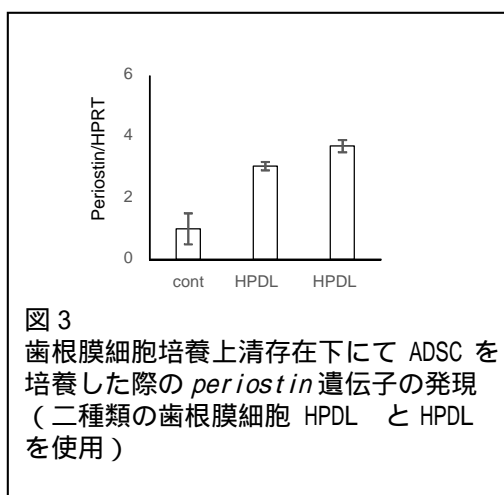


図3
歯根膜細胞培養上清存在下にて ADSC を培養した際の *periostin* 遺伝子の発現 (二種類の歯根膜細胞 HPDL と HPDL を使用)

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2件)

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*, 査読有, vol.34, 2014, p.109-116

Masahide Takedachi, Keigo Sawada, Satomi Yamamoto, Masao Ozasa, Yoshio Shimabukuro, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami: Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived

stem cells. Journal of Oral Biosciences,
査読有, vol. 55, 2013, p. 137-142

〔学会発表〕(計3件)

山本智美、竹立匡秀、伊山舜吉、沢田啓吾、
山羽聡子、梶川哲宏、小笹匡雄、山田聡、村
上伸也 低酸素状態が歯根膜細胞の PLAP-1
発現に及ぼす影響、第 56 回春季日本歯周病
学会学術大会、2013 年 6 月 1 日、東京都江戸
川区

沢田啓吾、竹立匡秀、小笹匡雄、岩山智明、
野崎剛徳、市川朋生、前田憲一郎、田内拓史、
三木康史、大原廣之、伊山舜吉、安齋純、永
安利江、寺嶋昭夫、北村正博、村上伸也 脂
肪組織由来未分化間葉系幹細胞を用いた新
規歯周組織再生療法の経時的評価、第 30 回
日本骨代謝学会、2012 年 7 月 21 日、東京都
新宿区

沢田啓吾、竹立匡秀、小笹匡雄、岩山智明、
野崎剛徳、市川朋生、前田憲一郎、田内拓史、
三木康史、大原廣之、伊山舜吉、安齋純、永
安利江、寺嶋昭夫、北村正博、村上伸也 犬
実験的歯周病モデルを用いた脂肪組織由来
未分化間葉系幹細胞および FGF-2 の移植によ
る歯周組織再生効果、第 11 回日本再生医療
学会総会、2012 年 6 月 12 日、神奈川県横浜
市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小笹 匡雄 (OZASA, Masao)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20624563