

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05023

研究課題名(和文) 歯根膜幹細胞誘導による組織再生を基盤とした包括的歯内疾患治療法の開発

研究課題名(英文) The study of tissue engineering utilizing periodontal ligament stem cell induced by tropic factors

研究代表者

和田 尚久 (Wada, Naohisa)

九州大学・大学病院・教授

研究者番号：60380466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により歯原性上皮においてWnt/beta-cateninシグナル依存的なSema3Aの発現を介した増殖の制御が歯胚発生および形成に重要な役割を担っており、加えて歯牙腫の発生にも関与している可能性が示唆された。加えて、歯根膜組織や歯髄組織における複数因子の発現ならびに組織再生に関連する機能や幹細胞分化誘導法について各々明らかにした。

Semaphorin3Aによる歯原性上皮の発生メカニズムや他因子の機能を段階的、多角的に検討できたことで、効率よく歯周組織を再生あるいは形成誘導する包括的な方法確立のためのメカニズムの一端を明らかにできたと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複雑な構造物である歯および歯周組織の再生治療には多面的な治療戦略が必要と考えられる。段階的、多角的に検証を行った本研究から得られたsemaphorin3Aや他因子の機能解析結果は、幹細胞研究や再生研究を展開するにあたって有益な情報を提供するもので、さらに将来の組織再生に基づいた新規包括的歯内疾患治療法の技術開発に繋げていくことができると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, Wnt/β-catenin signaling negatively regulates odontogenic epithelial cell proliferation and tooth germ development through decreased-Sema3A expression, and aberrant activation of Wnt/β-catenin signaling may associate with odontoma formation. Additionally, we demonstrated the expression patterns and functions of several factors in periodontal ligament and dental pulp tissues, and established parts of mesenchymal stem cell differentiation methods. These results may lead to establish the comprehensive methodology of dental tissue regeneration by the proposal of parts of the mechanisms by which dental mesenchymal stem cells behave.

研究分野：歯科保存学

キーワード：口腔組織再生 幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯根破折やフェネストレーションを伴う根尖性歯周炎によって大きく喪失した歯根周囲組織の再生治療法や、根未完成歯抜髄後の歯根発育を促す方法は未だ確立されたとはいえず、より予知性の高い効率的な治療法の開発が待望されている。これらの疾患の治癒しないケースに共通して、ダメージを受けた歯根周囲組織における歯根膜組織由来の幹細胞の不足や幹細胞による組織再生のための足場構造の崩壊が原因で、各組織の再生あるいは形成が十分に得られないことが考えられる。これに対して、歯周組織構成細胞を効率よく誘導する新規誘導因子の同定および細胞を組織再生部位に効率よく供給するデリバリー方法の開発が求められる。我々はこれまでに多くの因子の歯周組織再生能について検討を行い報告してきた。その中でも Sema3A は歯根膜由来組織である歯小嚢に発現しており、歯根膜幹細胞転換誘導作用を有すること、またラット覆髄モデルで象牙細管構造を伴う象牙質形成効果を示すことも明らかにしており、歯周組織再生に有用な因子である可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、歯根膜幹細胞転換誘導効果を有する Sema3A および他因子の機能および作用機序を遺伝子導入歯周組織構成細胞や器官培養を用いて詳細に検討することで、各因子の歯および歯周組織発生および再生誘導機能を明らかにし、幹細胞誘導による歯根周囲組織の再生方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養

本研究では、マウス歯原性上皮細胞 (mDE6)、ヒト歯髄幹細胞クローン (4A-1, 4A-7)、ヒト歯根膜細胞株 (HPDLSC) およびラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞 (PC12) を用いた。全ての実験は九州大学生命倫理委員会の承認のもとで行った。

試薬

mDE6 に対して β -catenin 活性化物質 (CHIR99021) にて刺激し、その影響を検討した。HPDLSC に対して JNK 阻害剤 (SP600125) および ALK5 阻害剤 (SB431542) にて刺激し、その影響を検討した。

各因子の発現解析法

マウス胎生期臼歯歯胚における β -catenin, Lef1, Ki-67 および Sema3A の局在ならびにラット歯根膜組織における Wnt5a, R-spondin2, Transgelin および GDNF 局在は、免疫細胞化学的染色法にて解析した。

遺伝子導入実験

レンチウイルスベクターを用いて Sema3A 強発現 mDE6 を作製した。また siRNA により mDE6 における Sema3A 発現を、HPDLSC における Ror2 および Transgelin の発現をそれぞれノックダウンし、影響を検討した。

歯胚器官培養

ICR マウス胎生 15 日齢臼歯歯胚を器官培養した。また、胎生 15 日齢臼歯歯胚をディスペーゼ酵素処理した後、上皮組織を間葉組織から分離しマトリゲル中にて培養する歯胚上皮培養法を確立し、実験を行った。

細胞分化誘導実験

骨芽細胞分化誘導 (石灰化誘導) 実験: 各細胞クローンを 24 ウェル細胞培養プレートに播種し、石灰化誘導培地にて培養した。4 週間培養後 Alizarin Red S 染色を行い、また定量的 RT-PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行った。

神経誘導実験: PC12 を神経誘導培地にて培養した。2 週間培養後、神経突起の数および長さを測定し、また定量的 RT-PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 歯胚発生過程における Sema3A の上皮細胞増殖制御機構の解明

歯胚発生過程における Sema3A の発現

In vitro および in vivo モデルを用いて歯を含む歯周組織再生における Sema3A の機能を検討していたが、再現性のあるモデル確立に至らなかったため、新たな戦略としてする共通の機構が多いとされる発生過程における Sema3A の発現および機能解析を行った。Sema3A 発現に β -catenin が関与していると報告されていることから、マウス胎生 15 日齢歯胚における β -catenin およびそのターゲット遺伝子である Lef1 の発現を検討したところ、エナメル結節に強発現していたが、増殖マーカーである Ki-67 の発現は認められなかった。一方で Sema3A 発現はエナメル結節の周囲組織にその局在を認め、Ki-67 陽性部位と一致していた。また mDE6 を β -catenin 活性化物質 (CHIR99021) にて刺激したところ細胞増殖は抑制され、Axin2 発現が増加する一方で Sema3A 発現は減少した。以上のことから β -catenin 経路は細胞増殖を抑制的に調節しており、Wnt/ β -catenin シグナル経路の下流において Sema3A が役割を担っている可能性が考えられた。

β-catenin 経路活性化による細胞増殖抑制における Sema3A の役割

Sema3A 遺伝子導入した mDE は CHIR99021 刺激により低下した Sema3A 発現および細胞増殖能が回復した。また、Sema3A siRNA 導入により mDE6 の細胞増殖が抑制された。以上より、β-catenin 経路の活性化により Sema3A の発現が減少し、歯原性上皮細胞増殖を調節していることが示唆された。CHIR99021 刺激により Lef1 の発現が増加し、Lef1 siRNA 導入により CHIR99021 刺激で低下した Sema3A 発現が回復したことから、Wnt/β-catenin シグナルにより Lef1 発現が誘導され、これにより Sema3A 発現が抑制されている機序が示唆された。

歯胚発生過程における Sema3A 機能の解析

歯胚器官培養を用いて、CHIR99021 刺激を 3 日間加えたところ、Axin2 発現が増加する一方で Sema3A 発現は減少し、7 日間刺激を加えたところ、Ki-67 および E-cadherin 陽性上皮細胞数が減少した。この器官培養に Sema3A を添加したところ、増殖上皮細胞数が回復した。次に、間葉系細胞非含有歯胚上皮器官培養を樹立し、CHIR99021 刺激を加えたところ、Ki-67 陽性上皮細胞数が減少する一方で、将来咬頭に分化すると考えられる上皮の budding 数が増加し、bud サイズが縮小した。以上により、Wnt/β-catenin シグナル経路の活性化により歯胚上皮における Sema3A 発現および細胞増殖が減少し、それにより歯胚上皮組織の budding が進むことが明らかになった。

これらの結果から、歯原性上皮において Wnt シグナル依存的な Sema3A の発現により細胞増殖が制御されていることが示唆された。

(2) 歯髄幹細胞に対する Sema3A の影響

Sema3A の硬組織形成に対する影響を検討する目的で Sema3A をヒト歯髄幹細胞クローン石灰化誘導培養系に添加して Alizarin Red S 染色および石灰化関連因子発現解析を行った。コントロール培地にて培養したヒト歯髄幹細胞クローン 4A-1 および 4A-7 では Alizarin Red S 陽性沈着物の形成が認められなかったのに対し、石灰化誘導培地にて培養を行ったヒト歯髄幹細胞クローンにおいては Alizarin Red S 陽性沈着物の形成が認められた。次に、定量的 RT-PCR を行った結果、Sema3A 刺激下のヒト歯髄幹細胞クローン 4A-1 および 4A-7 において、培養開始 1 週間後に DSPP、DMP1、ならびに ALP、培養開始 3 週間後に OCN の遺伝子発現が、Sema3A を添加していないヒト歯髄幹細胞クローンと比較して有意に上昇していた。加えてヒト歯髄幹細胞クローンの細胞遊走能、走化性、増殖能も促進した。

歯髄においては Sema3A は細胞増殖、走化性並びに硬組織形成の促進に関与していることが明らかになった

(3) 歯根膜細胞における Wnt5a, R-spondin2, Transgelin および GDNF の機能解析

Wnt5a, R-spondin2, Transgelin および GDNF はいずれも歯根膜組織に発現していたことからその役割を検討する目的で、HPDLSC を用いて各因子の発現および機能を解析した。Wnt5a は HPDLSC の骨芽細胞分化を抑制し、Wnt5a の受容体である Ror2 siRNA を用いると骨関連因子の発現が増加したことから、Wnt5a は歯根膜組織の石灰化を抑制している可能性が考えられた。またその下流には JNK が関与していることが明らかとなった。一方で R-spondin2 は HPDLSC の骨芽細胞分化を促進した。R-spondin2 によって誘導された細胞核内 β-catenin の集積や骨芽細胞分化は DKK-1 により抑制されたことから歯根膜細胞の骨芽細胞分化に R-spondin と Wnt/β-catenin シグナルが関連していることが明らかになった。Transgelin は HPDLSC に発現しており、type 1 TGF-β1 受容体の阻害剤を用いて遮断したところ Transgelin の発現が増加した。また Transgelin siRNA は TGF-β により増強された細胞増殖を抑制した。以上より歯根膜において TGF-β による細胞増殖促進に Transgelin が関与していることが明らかになった。さらに歯根膜組織は GDNF を発現しており、PC12 細胞の神経細胞分化を促進することも明らかにした。

以上の結果より、歯、歯髄細胞、歯根膜細胞は様々な因子を発現しており、本研究により明らかになった各因子の機能を組み合わせることで、将来臨床応用実現可能な汎用性の高い新規歯周組織の再生方法の開発につながっていくものと期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. Fujii S, Nagata K, Matsumoto S, Kohashi K, Kikuchi A, Oda Y, Kiyoshima T, Wada N. Wnt/β-catenin signaling, which is activated in odontomas, reduces Sema3A expression to regulate odontogenic epithelial cell proliferation and tooth germ development. *Sci Rep.* 9(1):4257, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-39686-1
2. 吉田晋一郎, 和田尚久, 長谷川大学, 御手洗裕美, 有馬麻衣, 友清淳, 濱野さゆり, 杉井英樹, 前田英史. 骨組織上に播種した歯髄幹細胞は歯根膜関連遺伝子を発現する - 接触する基質の硬さが細胞分化に及ぼす影響 -. *日本歯科保存学雑誌.* 61(6):343-353, 2018.

3. Arima M, Hasegawa D, Yoshida S, Mitarai H, Tomokiyo A, Hamano S, Sugii H, Wada N, Maeda H. R-spondin 2 promotes osteoblastic differentiation of immature human periodontal ligament cells through the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Periodontol Res.* 54(2):143-153, 2018. doi: 10.1111/jre.12611.
4. Hasegawa D, Wada N, Yoshida S, Mitarai H, Arima M, Tomokiyo A, Hamano S, Sugii H, Maeda H. Wnt5a suppresses osteoblastic differentiation of human periodontal ligament stem cell-like cells via Ror2/JNK signaling. *J Cell Physiol.* 233(2):1752-1762, 2018. doi: 10.1002/jcp.26086.
5. Mitarai H, Wada N, Hasegawa D, Yoshida S, Sonoda M, Tomokiyo A, Hamano S, Serita S, Mizumachi H, Maeda H. Transgelin mediates transforming growth factor- β 1-induced proliferation of human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res.* 52(6):984-993, 2017. doi: 10.1111/jre.12466.
6. Yoshida S, Yamamoto N, Wada N, Tomokiyo A, Hasegawa D, Hamano S, Mitarai H, Monnouchi S, Yuda A, Maeda H. GDNF from Human Periodontal Ligament Cells Treated with Proinflammatory Cytokines Promotes Neurocytic Differentiation of PC12 Cells. *J Cell Biochem.* 118(4):699-708, 2017. doi: 10.1002/jcb.25662.
7. Yoshida S, Wada N, Hasegawa D, Miyaji H, Mitarai H, Tomokiyo A, Hamano S, Maeda H. Semaphorin 3A Induces Odontoblastic Phenotype in Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res.* 95(11):1282-1290, 2016. DOI: 10.1177/0022034516653085
8. Tomokiyo A, Hynes K, Gronthos S, Wada N, Bartold PM. Is there a role for neural crest stem cells in periodontal regeneration? *Curr Oral Health Rep.* 2(4):275-281, 2015. DOI 10.1007/s40496-015-0073-8
9. Wada N, Tomokiyo A, Gronthos S, Bartold PM. Immunomodulatory properties of 1PDLSC and relevance to periodontal regeneration. *Curr Oral Health Rep.* 2(4):245-251, 2015. DOI 10.1007/s40496-015-0062-y

〔学会発表〕(計 17件)

1. 有馬麻衣、長谷川大学、吉田晋一郎、御手洗裕美、友清淳、濱野さゆり、杉井英樹、和田尚久、前田英史. LGR4 が未分化なヒト歯根膜細胞の増殖能、走化性および骨芽細胞様分化に及ぼす影響. 日本歯科保存学会 2018 年度秋季学術大会 (第 149 回) 京都市勧業館みやこめっせ (京都市) 2018 年 11 月 1,2 日
2. 糸山知宏、吉田晋一郎、友清淳、長谷川大学、濱野さゆり、杉井英樹、有馬麻衣、野津葵、和田尚久、前田英史. GDNF は未分化なヒト歯根膜細胞のシュワン細胞分化を誘導する. 日本歯科保存学会 2018 年度秋季学術大会 (第 149 回) 京都市勧業館みやこめっせ (京都市) 2018 年 11 月 1,2 日
3. 祐田明香、和田尚久. 線維芽細胞における仮足形成因子の探索. 日本歯科保存学会 2018 年度秋季学術大会 (第 149 回) 京都市勧業館みやこめっせ (京都市) 2018 年 11 月 1,2 日
4. 吉田晋一郎、糸山知宏、長谷川大学、有馬麻衣、友清淳、濱野さゆり、杉井英樹、野津葵、和田尚久、前田英史. Semaphorin3A による修復象牙質形成過程への Sonic hedgehog シグナルの関与. 日本歯科保存学会 2018 年度秋季学術大会 (第 149 回) 京都市勧業館みやこめっせ (京都市) 2018 年 11 月 1,2 日
5. Arima M, Hasegawa D, Yoshida S, Mitarai H, Tomokiyo A, Hamano S, Sugii H, Wada N, Maeda H. R-spondin2 Enhances Osteoblastic Differentiation of Immature Human Periodontal Ligament Cells. 96th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR), London, England, 2018. 7. 25-28.
6. 長谷川大学、長谷川佳那、御手洗裕美、有馬麻衣、濱野さゆり、吉田晋一郎、友清淳、杉井英樹、和田尚久、清島保、前田英史. 新規幹細胞関連因子 MEST がヒト歯根膜細胞の幹細胞転換に及ぼす影響. 日本歯科保存学会 2018 年度春季学術大会(第 148 回)、横浜みなとみらいホール (横浜市) 2018 年 6 月 14 - 15 日
7. 杉井英樹、友清淳、濱野さゆり、長谷川大学、吉田晋一郎、御手洗裕美、野津葵、有馬麻衣、糸山知宏、小野太雅、藤野翔香、一法師啓太、和田尚久、前田英史. Activin A がヒト歯根膜細胞およびヒト前骨芽細胞の骨芽細胞様分化に及ぼす影響について. 日本歯科保存学会 2018 年度春季学術大会(第 148 回)、横浜みなとみらいホール (横浜市) 2018 年 6 月 14 - 15 日
8. Arima M, Hasegawa D, Yoshida S, Mitarai H, Tomokiyo A, Hamano S, Sugii H, Wada N, Maeda H. R-spondin2 enhances osteogenesis of immature human periodontal ligament cells through the canonical Wnt signaling pathway. *Kyudai Oral Bioscience 2018 –Health Longevity from Oral Brain Science: From Basic to Clinical Research-Collaboration Station I, 2F Audiovisual Hall Kyushu University, Fukuoka, Japan, 2018.2.11-12*
9. Sugii H, Tomokiyo A, Hamano S, Hasegawa D, Yoshida S, Mitarai H, Nozu A, Arima M, Itoyama T, Ono T, Fujino S, Ipposhi K, Wada N, Maeda H. Activin A reversely

works on the osteoblastic differentiation in human pre-osteoblastic cells and periodontal ligament cells. The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR), Showa University, Tokyo, Japan, 2017.11.18-19.

10. 藤井 慎介、永田 健吾、清島 保、和田 尚久. 歯牙腫における Wnt/ β -catenin シグナルの活性化は軸索伸張制御因子を介して増殖を制御する. 第 63 回日本病理学会秋期特別総会、日本教育会館（東京都）2017 年 11 月 2 日

11. 有馬麻衣、長谷川大学、吉田晋一郎、御手洗裕美、友清淳、濱野さゆり、杉井英樹、和田尚久、前田英史. R-spondin2 はカノニカル Wnt シグナルを介して未分化なヒト歯根膜細胞の骨芽細胞様分化を促進する. 日本歯科保存学会 2017 年度秋季学術大会（第 147 回）第 19 回日韓歯科保存学会学術大会、マリオス（盛岡市）2017 年 10 月 26-27 日

12. 長谷川大学、和田尚久、有馬麻衣、吉田晋一郎、友清淳、濱野さゆり、御手洗裕美、前田英史. Tenomodulin がヒト歯根膜細胞の機能維持に及ぼす影響について. 第 146 回日本歯科保存学会春季学術大会、リンクステーションホール青森（青森市）2017 年 6 月 8、9 日

13. 園田麻衣、長谷川大学、和田尚久、吉田晋一郎、御手洗裕美、友清淳、濱野さゆり、前田英史. R-spondin2 が未分化なヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化に及ぼす影響. 第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会、キッセイ文化ホール（松本市）2016 年 10 月 27、28 日

14. Mitarai H, Wada N, Hasegawa D, Yoshida S, Sonoda M, Tomokiyo A, Hamano S, Maeda H. Transgelin Mediates TGF-beta1-induced Human Periodontal Ligament Cell Proliferation. 95th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR), San Francisco, Calif., USA, 2017. 3. 22-25.

15. Hasegawa D, Wada N, Hamano S, Tomokiyo A, Yoshida S, Mitarai H, Sonoda M, Sugii H, Maeda H. Identification of a novel periodontal ligament stem cell marker. 94th General Session & Exhibition of the IADR, CoEx Convention & Exhibition Center, Seoul, Korea, 2016. 6. 22-25.

16. Yoshida S, Wada N, Hasegawa D, Tomokiyo A, Hamano S, Mitarai H, Hideki S, Maeda H. Semaphorin 3A induces odontoblastic phenotype in dental pulp stem cells. 94th General Session & Exhibition of the IADR, CoEx Convention & Exhibition Center, Seoul, Korea, 2016. 6. 22-25.

17. 長谷川大学、和田尚久、濱野さゆり、友清淳、吉田晋一郎、御手洗裕美、園田麻衣、杉井英樹、前田英史. MEST はヒト歯根膜幹細胞における幹細胞特性の維持に關与する. 第 144 回日本歯科保存学会春季学術大会、栃木県総合分化センター（宇都宮市）2016 年 6 月 9、10 日

〔図書〕(計 2 件)

1. Wada N, Tomokiyo A, Maeda H. Future Perspectives in Dental Stem Cell Engineering and the Ethical Considerations. In: Dental Stem Cells, Şahin F, Dogan A, Demirci S (ed). Springer International Publishing Switzerland, Basel, Switzerland: Chapter 14, pp289-307, 2016

2. Tomokiyo A, Wada N, Maeda H. Contribution of stem cells to dental tissue regeneration: isolation, function, and application. In: Frontiers in stem cell and regeneration medicine research vol.2, Atta-ur-Rahman and Shazia Anjum (eds). Bentham Science Publishers, Sharjah, United Arab Emirates: pp3-38, 2016.

〔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：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：前田 英史

ローマ字氏名：(MAEDA., Hidefumi)

所属研究機関名：九州大学

部局名：歯学研究院

職名：教授

研究者番号(8桁)：10284514

研究分担者氏名：清島 保

ローマ字氏名：(KIYOSHIMA, Tamotsu)

所属研究機関名：九州大学

部局名：歯学研究院

職名：教授

研究者番号(8桁)：20264054

研究分担者氏名：友清 淳

ローマ字氏名：(TOMOKIYO, Atsushi)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：20507777

研究分担者氏名：和田 裕子

ローマ字氏名：(WADA, Hiroko)

所属研究機関名：九州大学

部局名：歯学研究院

職名：助教

研究者番号(8桁)：70380706

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。