

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11215

研究課題名(和文) Micro RNAプロファイルを基にしたオーダーメイド歯周組織再生治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of order-made periodontal regenerative therapy based on micro RNA profile

研究代表者

岩田 倫幸 (Iwata, Tomoyuki)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：30418793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周組織構成細胞および間葉系幹細胞(MSC)に特徴的に発現するmicro RNAを同定し、さらに、MSCにおいて、サイトカインなどの発現調節因子によって特徴的に変化するmicro RNAを同定した。この結果から、細胞を用いた歯周組織再生療法において、移植MSCのmicro RNA発現プロファイルに基づいた最適な調節因子の選択が移植局所における歯周組織構成細胞への分化促進につながり、最終的には効率的なオーダーメイド歯周組織再生療法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：Some micro RNAs expressed characteristically in periodontal cells and mesenchymal stem cells (MSC) were identified and regulatory factors of micro RNA expression were also suggested.

From these results, in periodontal regenerative therapy with cell transplantation, selection of optimal regulatory factors based on each micro RNA profile of donor MSC can lead to enhancement of periodontal differentiation in transplantation site, finally, effective order made periodontal regenerative therapy can be established.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生療法 間葉系幹細胞 micro RNA 転写因子 再生歯学

1. 研究開始当初の背景

歯周組織再生治療の研究は、大きく複雑な歯周組織破壊に対応するための細胞治療と局所に存在する組織再生能力を活性化する増殖因子を用いたサイトカイン療法を中心に進められている。細胞治療で用いられる間葉系幹細胞 (MSC) は多能性細胞であり (Tsutsumi S et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2001)、歯周組織を構成する骨とセメント質にも分化可能である (Hasegawa N et al., *J Periodontol.*, 2006)。MSC は移植部位において周囲組織と協調しつつ歯周組織構成細胞へと分化する必要があり、移植時に未分化状態を維持するとともに歯周組織構成細胞への多方向分化に対する方向付けの制御が要求される。しかし、移植局所での MSC の分化メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。さらに、自己の MSC 移植による歯周組織再生治療に関しては、移植による拒絶反応の危険性は無いものの治療および再生過程において宿主に依存する因子が多く、組織再生度には個体差が認められる (Kawaguchi H et al., *Clin Calcium.*, 2005)。また、サイトカインを用いた歯周組織再生治療についても、個体間の感受性の違いによって同様な個体差が認められる (Takedachi M et al., *Clin Calcium.*, 2012)。このように、MSC およびサイトカインは歯周組織再生に有用だが、現段階では解決すべき課題が多く存在する。この課題を解決するためには、個々の細胞の性質および感受性に適した治療法、つまりオーダーメイド化された治療法を選択する必要がある。

MSC の細胞機能制御に関与する遺伝子として、MSC 未分化マーカーである転写因子群 (Kubo H et al., *Genes Cells.*, 2009)、bHLH 型転写因子 DEC1 (Iwata T et al., *Eur J Cell Biol.*, 2006) および miR-124a (Maisel M et al., *Exp Cell Res.*, 2010) などが報告されている。これまで、申請者の研究 (科学研究費補助金: 課題番号 23792478, 25862049) によって、低酸素などの種々の因子によって、micro RNA の一部が制御された。さらに、制御を受けた micro RNA の発現調整によって、未分化マーカーの一部に影響を与えることが確認された。また、micro RNA は、歯周靭帯細胞 (HPL cells) において特異的に発現している PLAP-1 が miR-21 および miR-101 によって制御されることから、歯周組織構成細胞においても同様に micro RNA による様々な遺伝子の制御機構の存在が示唆される

(Li C et al., *Mol Med Rep.*, 2012)。加えて、歯周組織再生治療に適用されるサイトカイン (FGF2, PDGF, BDNF, BMP2 など) が micro RNA 発現に影響を及ぼす (Bobbs AS et al., *J Biol Chem.*, 2012) ことが知られている。これらのことから、歯周組織再生過程において、MSC および歯周組織構成細胞の遺伝子発現および細胞機能は micro RNA を介して制御されると考えられる。

以上のことから、MSC に対し、micro RNA の発現調整によって移植局所での歯周組織構成細胞との相互作用を制御することで、より効果的かつ予知性の高い MSC を用いた歯周組織再生が可能となる。最終的には、micro RNA 発現プロファイルを分類することで、高度に標準化かつオーダーメイド化された歯周組織再生治療法を確立することが可能である。

2. 研究の目的

本研究の全体構想は、間葉系幹細胞 (MSC) を用いた効果的な歯周組織再生治療法の確立である。歯周組織再生治療において、移植に用いる MSC と歯周組織構成細胞の細胞機能制御および移植前後の歯周組織恒常性維持に着目し、本研究では、より効果的かつ予知性の高い歯周組織再生を目指す。歯周靭帯細胞 (HPL cells) を含む歯周組織構成細胞および MSC が特徴的に発現している micro RNA のうち、細胞機能制御および恒常性維持に深く関わるものに焦点を当て、歯周組織構成細胞への分化に重要な micro RNA を明らかにする。加えて、サイトカインなどの細胞機能に影響を及ぼす因子によって特徴的 micro RNA の発現を調整することで、移植に用いる MSC の未分化状態の維持および分化の方向付けを制御し、最適な細胞機能の制御方法を確立する。さらに、より効果的かつ予知性の高い MSC 移植による歯周組織再生治療法を検討する。最終的には、それぞれの micro RNA プロファイルを解析および分類することによって高度に標準化かつオーダーメイド化された歯周組織再生治療法を確立することを目的とす

る。

3. 研究の方法

1) 歯周組織構成細胞における micro RNA 発現プロファイル

ヒト歯肉線維芽細胞(HGF), ヒト歯周靭帯細胞(HPL cells), ヒト骨芽細胞(HOB), ヒトセメント芽細胞(CEM): HCEM-T(Kitagawaraが確立)を使用し、それぞれ24時間培養し、small RNAを回収し、TaqMan® MicroRNA Array (ライフテクノロジーズ株式会社)にてmicro RNA発現プロファイリングによる網羅的な解析を行なった。

2) 間葉系幹細胞 MSC における micro RNA 発現プロファイル

ヒト間葉系幹細胞(MSC; 理研バイオリソースセンターから提供)を使用し、それぞれ24時間培養し、small RNAを回収し、TaqMan® MicroRNA Arrayにてmicro RNA発現プロファイリングによる網羅的な解析を行なった。

3) 細胞分化および機能維持に重要な micro RNA の同定

Micro RNA プロファイルを網羅的に分析し、顕著に増加または減少を示したmicro RNAの中で、細胞機能に重要であるmicro RNAを同定した。歯周組織構成細胞に対しては分化・細胞機能維持に重要なmicro RNA、MSCに対しては未分化状態維持および分化の方向付けに重要なmicro RNAを同定した。

4) Micro RNA 発現調整に有効な因子の検討

MSCにおける未分化状態維持および歯周組織構成細胞への分化の方向付けに重要なmicro RNAに焦点を絞り、種々の刺激によるmicro RNA発現に対する影響を検討した。

刺激因子として、歯周組織再生療法に適用されているサイトカインであるFGF2 (5 ng/ml), BDNF (50 ng/ml), BMP2 (100 ng/ml), PDGF-AA (25 ng/ml), TGF- β 1 (5 ng/ml), TGF- β 3 (10 ng/ml), IGF-1 (50 ng/ml), 歯周組織再生療法に一般的に使用されているエナメルマトリックスタンパクの主成分で

あるAmelogenin (100 ng/ml)および未分化状態維持に重要な役割を果たすNoggin (50 ng/ml)を用い、24時間刺激後、small RNAを回収し、TaqMan® MicroRNA Arrayにてmicro RNA発現の網羅的な解析を行なった。

5) Micro RNA 発現調整細胞の未分化維持および分化の方向付けの検討

種々の刺激因子によってmicro RNA発現を調整したMSCに対し、micro RNAプロファイルで同定したmicro RNA群に対する分化の方向付けおよび未分化状態維持への影響を検討した。同様に、同定したmicro RNAの発現調節をmicro RNA mimic/inhibitor (ライフテクノロジーズ株式会社)をMSCに導入することで行ない、分化の方向付けおよび未分化状態維持への影響も検討した。

歯周組織構成細胞の分化マーカーとして、1) Osteoblast: Osterix, Runx2; 2) HPL cells: Twist1, Periostin, PLAP-1; 3) Cementoblasts: CEMP1, PTPLA, SPON1

未分化関連転写因子として、ETV1, SOX11, FOXP1, GATA6, SIM2, ETV5, SIM2, PRDM16, KLF12, HMGA2を検討した。

評価はmRNAレベルの評価をTaqMan® Gene Expression Assay (ライフテクノロジーズ株式会社)、タンパク質レベルの評価をWestern blotting法を用いて行なった。

6) Micro RNA 発現プロファイルの分類

MSCのmicro RNA発現プロファイルおよび発現調整因子によるmicro RNA発現パターンの変化を分析し、カテゴリー分類を行なうことによって発現プロファイルとMSCに対して最適な刺激因子を相関させた。

カテゴリー分類において重視する項目として、

- 1) 未分化状態維持に関与する遺伝子発現
- 2) 分化に必要なmicro RNA発現
- 3) 刺激因子によるmicro RNA発現の変化に着目し、それぞれのカテゴリー分類を行なった。

4. 研究成果

1. 歯周組織構成細胞における micro RNA 発現プロファイル:

歯周組織構成細胞である HGF, HPL cells, HOB, CEM および MSC における micro RNA 発現の網羅的な解析を行なった。

得られた結果として、MSC と比較して、

- 1) HPL cells: 高発現 1 種, 低発現 1 種
- 2) HGF: 高発現 0 種, 低発現 13 種
- 3) HOB: 高発現 0 種, 低発現 125 種
- 4) CEM: 高発現 2 種, 低発現 15 種

の micro RNA が特徴的な発現パターンを示した。

2. 間葉系幹細胞 MSC における micro RNA 発現プロファイル:

MSC において、全ての歯周組織構成細胞と比較して 29 種の micro RNA が高発現を示した。

3. 細胞分化および機能維持に重要な micro RNA の同定:

歯周組織構成細胞および MSC において特徴的な発現を示す micro RNA のうち、もっとも特異的な発現を示した micro RNA として、

- 1) HPL cells: miR-199b; 2) HGF: miR-146;
- 3) HOB: miR-21, miR-130; 4) CEM: miR-628, miR-383, miR-155, miR-126; 5) MSC: miR-130a, miR-210

を同定した。

4. Micro RNA 発現調整に有効な因子の検討:

Micro RNA 発現調整因子として歯周組織再生療法に活用されているサイトカインに着目し、サイトカイン刺激時に特徴的に変化する micro RNA を検出した。サイトカインは、1) FGF2, 2) BDNF, 3) BMP2, 4) PDGF-AA, 5) TGF- 1, 6) TGF- 3, 7) IGF-1, 8) Amelogenin, 9) Noggin を用いた。

無刺激時と比較して特徴的な変化を示した micro RNA は、

- 1) FGF2: 増加 11 種, 減少 3 種
- 2) BDNF: 増加 8 種, 減少 15 種
- 3) BMP2: 増加 16 種, 減少 1 種

- 4) PDGF-AA: 増加 14 種類, 減少 4 種類
- 5) TGF- 1: 増加 24 種類, 減少 1 種類
- 6) TGF- 3: 増加 17 種類, 減少 3 種類
- 7) IGF-1: 増加 22 種類, 減少 11 種類;
- 8) Amelogenin: 増加 9 種, 減少 12 種
- 9) Noggin: 増加 1 種類, 減少 9 種類

であった。

5. Micro RNA 発現調整細胞の未分化維持および分化の方向付けの検討:

種々の刺激因子のうち、FGF2, BDNF, IGF-1, PDGF-AA によって micro RNA 発現を調整した MSC に対し、分化の方向付けおよび未分化状態維持への影響を検討した。

FGF2 刺激によって、Osteoblast, HPL cells および Cementoblasts への分化の方向付けが促進され、MSC 未分化マーカー GATA6 の発現も促進された。BDNF 刺激によって、同様に歯周組織構成細胞の均整が保たれた分化の方向付けおよび MSC 未分化状態維持が促進されたが、FGF2 と比較すると、Cementoblasts への分化の方向付けが早期に促進される傾向を示した。IGF-1, PDGF-AA に関しては、Osteoblast, Cementoblasts への分化の方向付けが促進されたが、HPL cells への分化に関しては、POSTN 発現は促進される一方、PLAP1 発現は抑制されるという結果が得られた。MSC 未分化マーカーに関しては、GATA6 発現の抑制が共通して認められたが、IGF-1 刺激によって SOX11 および ETV1 発現の抑制が認められたのに対し、PDGF-AA 刺激によって SOX11 および ETV1 発現が促進され、FOXP1 発現の顕著な抑制が確認された。さらに、IGF-1 刺激によって miR-383 の顕著な発現亢進、miR-210 発現の促進および miR-628 発現の抑制が確認された。一方、PDGF-AA 刺激によって、miR-210 発現の顕著な亢進が認められ、miR-628 および miR-383 発現も促進された。

さらに、同定された歯周組織構成細胞および MSC における特徴的な micro RNA のうち、

miR-210, miR-628, miR-383 に着目し、MSC に対してそれぞれの発現調整を行ない、細胞分化および細胞機能に対する影響を評価した。Osteoblast への分化に対してはそれぞれで主要な骨分化転写因子である Osterix の発現抑制を認めるなど抑制的に働いたが、Cementoblasts への分化に対しては、miR-210 が抑制的に働いたが miR-628 および miR-383 は促進的に働いた。また、HPL cells への分化に対しては、miR-210 および miR-383 が抑制的に働くのに対し miR-628 は促進的に働いた。

MSC 未分化状態維持に関しては、miR-210 は多くの未分化マーカー発現を抑制したが、miR-628 は ETV1 および KLF12 の発現は促進、SOX11 発現は抑制、miR-383 は GATA6 の発現を mRNA およびタンパク質レベルで抑制した一方で、ETV1 発現を顕著に促進した。

6. Micro RNA 発現プロファイルの分類：

未分化状態維持に関与する遺伝子発現の観点から、

- 1) FGF2: GATA6 促進, SIM2 抑制
- 2) BMP2: SOX11/ETV1 促進,
GATA6/ETV5 抑制
- 3) IGF-1: SOX11 抑制
- 4) PDGF-AA: SIM2 促進, FOXP1 抑制
- 5) TGF- 1: GATA6 促進, ETV1 抑制
- 6) TGF- 3: SIM2 促進, ETV1 抑制

という分類が可能となった。

また、歯周組織構成細胞への分化に必要な micro RNA 発現および刺激因子による micro RNA 発現の変化という観点から、

- 1) HPL cells: BDNF/Noggin 以外
- 2) HGF: IGF-1/TGF 3
- 3) HOB: BDNF/Noggin
- 4) CEM: PDGF-AA/BDNF

という分類が可能となった。

以上の結果により、MSC の未分化維持および歯周組織構成細胞への分化促進という観点から、それぞれに特徴的な microRNA が同

定され、さらにこれらの発現調整に有効な刺激因子の候補がいくつか挙げられた。さらに、同定された micro RNA および標的遺伝子に対する影響を検討することで、より詳細な歯周組織構成細胞への細胞分化のメカニズムが明らかになると考える。

また、本研究課題によって明らかになった知見は、今後の歯周組織構成細胞への分化に対して有効な micro RNA およびこれらの発現に影響を受ける遺伝子の同定および発現調整因子の探索に対して非常に重要であると考えられる。しかし、当該研究期間において、実際の臨床応用に対して必須であると思われる、移植 MSC の歯周組織構成細胞への分化に特異的な micro RNA の発現を調整する因子（主にサイトカイン）の特定にまで至らなかったため、今後の最重要課題として移植する細胞の個体差との関連も含めて慎重に検討を進め、micro RNA 発現プロファイルを各々の移植細胞に対して分類することで、高度に標準化かつオーダーメイド化された歯周組織再生治療法を確立につなげる必要がある。

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 3 件)

1. Xenotransplantation of interferon-gamma pretreated clumps of a human mesenchymal stem cell/extracellular matrix complex induces mouse calvarial bone regeneration
Kei Takeshita, Souta Motoike, Mikihiro Kajiya, Nao Komatsu, Manabu Takewaki, Kazuhisa Ouhara, Tomoyuki Iwata, Katsuhiko Takeda, Noriyoshi Mizuno, Tsuyoshi Fujita, Hidemi Kurihara
Stem Cell Research & Therapy, 2017 April, 8(1), 101; 査読あり
2. Interleukin-8 induces DNA synthesis, migration and down-regulation of

cleaved caspase-3 in cultured human gingival epithelial cells.

Fujita T., Yoshimoto T., Matsuda S., Kajiya M., Kittaka M., Imai H., Iwata T., Uchida Y., Shiba H., Kurihara H. J Periodontal Res., 2015 Aug, 50(4), 479-485; 査読あり

3. Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration.

Kittaka M, Kajiya M, Shiba H, Takewaki M, Takeshita K, Khung R, Fujita T, Iwata T., Nguyen TQ, Ouhara K, Takeda K, Fujita T, Kurihara H. Cytotherapy., 2015 Jul, 17(7), 860-873; 査読あり

[学会発表](計 6 件)

1. 歯周組織再生における micro RNA による間葉系幹細胞機能制御メカニズムの解明

岩田倫幸

第 35 回日本骨代謝学会学術集会 (2017 年 7 月, 福岡)

2. 凍結保存した間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex の骨再生能の検討

本池総太, 加治屋幹人, 竹下 慶, 竹脇 学, 小松奈央, 岩田倫幸, 武田克浩, 應原一久, 水野智仁, 藤田 剛, 栗原英見

第 16 回日本再生医療学会総会 (2017 年 3 月, 仙台)

3. 間葉系幹細胞から歯周組織構成細胞への分化制御遺伝子の探索

岩田倫幸, 永原隆吉, 池田英里, 八木亮一, 間 悠介, 小西昭弘, 吉岡みなみ, 石田 充, 水野智仁, 柴 秀樹, 栗原英見

第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会 (2016 年 10 月, 新潟)

4. 骨髄間葉系幹細胞集塊 Clumps of a MSC/ECM complex (C-MSC) におけるメカノトランスダクションの解析

小松奈央, 加治屋幹人, 竹下 慶, 竹脇 学, 本池総太, 應原一久, 武田克浩, 岩田倫幸, 藤田 剛, 栗原英見

第 37 回日本炎症・再生医学会 (2016 年 6 月, 京都)

5. 間葉系幹細胞の細胞機能制御に関する micro RNA の探索

岩田倫幸, 永原隆吉, 兼田英里, 吉岡みなみ, 水野智仁, 柴 秀樹, 栗原英見

第 59 回春季日本歯周病学会学術大会 (2016 年 5 月, 鹿児島)

6. The development of immunomodulatory Clumps of a MSC/ECM complex for novel allograft cell transplantation therapy

竹下 慶, 加治屋幹人, 竹脇 学, 小松奈央, 應原一久, 岩田倫幸, 藤田 剛, 柴 秀樹, 栗原英見

第 58 回春季日本歯周病学会学術大会 (2015 年 5 月, 千葉)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 倫幸 (TOMOYUKI IWATA)

広島大学・病院・助教

研究者番号: 30418793

(2) 研究分担者

水野 智仁 (NORIYOSHI MIZUNO)

広島大学・病院・講師

研究者番号: 60325181

兼田 英里 (ERI KANEDA)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号: 30736426

(平成 27 年 7 月 31 日まで研究分担者)

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者