

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06273

研究課題名(和文)系譜追跡と特異的破壊によるcementogenesisの理解

研究課題名(英文)Understanding cementogenesis by lineage tracing and cell-specific ablation

## 研究代表者

岩山 智明(Iwayama, Tomoaki)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：80757865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：失われた歯周組織が理想的に再生する過程として、セメント質と歯槽骨の新生を伴う新付着の獲得が挙げられる。骨の再生機構については多くの研究成果から理解は進んでいるが、セメント質の恒常性維持や新生については不明な点が多く残されていた。本研究では、組織切片からセメント質だけを抽出し、その遺伝子発現やタンパク発現を網羅的に解析することで新規セメント質特異的分子を見出した。さらに新しく確立した細胞単離法にて樹立した細胞を用いて、同遺伝子群の機能を解析するとともに、セメント芽細胞の生体内での動態を検討するための新規遺伝子改変マウスを作製した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、歯根表面にセメント質と歯根膜からの線維束が再生されるための基礎的な知見であり、予知性の高い歯周組織再生療法につながる基盤情報である。また、作製されたマウスは、コンディショナルノックアウトマウスと掛け合わせることで、セメント芽細胞における各遺伝子の機能解析のみならず、歯科矯正学分野における矯正治療中の歯根吸収メカニズムの解明や、口腔外科学分野におけるセメント芽細胞腫の発がん過程の解明、セメント質形成不全、家族性巨大型セメント質腫といったセメント質疾患の病態理解にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand cementogenesis, we aimed to identify cementoblast specific marker. Using laser microdissection of cementum layer in histological section, we isolated RNA and protein for RNA-seq and proteome analysis, respectively, and found out candidates genes for cementoblast marker. Then, we established clonal periodontal ligament cell lines with a new primary culture protocol for murine periodontal ligament. Functional analysis of the genes were done by either CRISPR/Cas9 or lentiviral vector system. We also generated new knock-in mouse to understand cementoblasts in vivo.

研究分野：歯周病学

キーワード：セメント芽細胞 レーザーマイクロダイセクション 歯根膜 骨芽細胞

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

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯肉と歯の境界部に付着した細菌バイオフィルムが原因となって発症する感染症であり、疾患の進行に伴い、歯周組織が慢性炎症的に破壊される。原因の除去だけでは失われた歯周組織をもう一度取り戻すのは困難であり、予知性の高い歯周組織再生療法が求められている。硬組織と軟組織からなる歯周組織が、骨と歯が骨性癒着することなしに理想的に再生する過程として、コラーゲン線維が封入されたセメント質と歯槽骨の新生を伴う新付着の獲得が挙げられる。骨の再生機構については多くの *in vivo*、*in vitro* の研究成果から骨の新生機構の理解は進んでおり、Runx2、Osterix といった分化に必須の遺伝子、いわゆる “master regulator” が同定済みである。一方で、歯周組織再生におけるその重要性が示唆されているにも関わらず、セメント質の恒常性維持や新生については不明な点が多く、歯根膜由来細胞からセメント質形成細胞（セメント芽細胞）への分化機構についての解析が不十分で、セメント芽細胞特異的な master regulator も発見されていない。

そこで本研究では RNA-seq、高感度 *in situ* hybridization 法を組み合わせセメント芽細胞のマーカー遺伝子を同定した上で、同遺伝子のプロモーター領域下にレポータータンパク質を発現するプラスミドを作製し、ケミカルスクリーニングを行うことでセメント芽細胞誘導条件を決定する。さらにゲノム編集技術により歯根膜由来細胞中の同遺伝子群をノックアウトすることにより、セメント芽細胞分化の master regulator を探索する本研究計画を立案した。

### 2. 研究の目的

セメント質を形成するセメント芽細胞の分化機構や、歯根完成後のセメント質の恒常性維持および損傷時の再生機構の詳細については不明な点が多く残されている。そこでセメント芽細胞のマーカー遺伝子を同定し、同細胞の分化誘導条件を決定するとともに、master regulator を探索することにより、cementogenesis を正しく理解し、新規歯周組織再生治療法の開発につながる基盤情報を得ることを目的としている。

### 3. 研究の方法

- (1) セメント芽細胞マーカーを同定するため、C57BL/6J マウスから上顎骨を分離し、パラフィン切片を作成し、Leica 社 LMD6000/7000 システムを用いてレーザーマイクロダイセクションを実施した。歯根膜全体、歯根膜中の歯槽骨に沿った一層の細胞群（骨芽細胞）、歯根膜中の歯根に沿った一層の細胞群（セメント芽細胞）をそれぞれ分取し、Maxwell RSC RNA FFPE Kit にて total RNA を精製した。得られた RNA の品質を Bioanalyzer 2000 にて評価後、Nugen 社 Trio RNA-seq kit にて rRNA の除去およびライブラリー作製を行い、Illumina HiSeq 4000 にてシーケンシングを実施した。さらに、同様に分取したダイセクションサンプルから nanoLC-MS/MS によるショットガン解析を行った。
- (2) 歯根膜細胞のセメント芽細胞への commitment を制御する因子を探索するため、マウス歯根膜組織由来細胞の初代培養プロトコルを確立し、得られた細胞集団を Sony 社 SH800 セルソーターを用いて well プレートに 1 細胞ずつ分取し、1 細胞由来の細胞集団を継代培養することで、マウス歯根膜クローンを得た。これらのクローンを石灰化誘導培地（グリセロリン酸およびアスコルビン酸含有 -MEM）で培養し、アリザリンレッド S 染色を行うことで、石灰化ノジュールを形成しやすいクローンと形成しにくいクローンを選別した。これらの石灰化能の異なるクローンから total RNA を精製し、TruSeq Stranded Total RNA Sample Prep Kit にてライブラリー作製を行い、Illumina HiSeq 4000 にてシーケンシングを実施した。
- (3) (2)にて樹立した歯根膜細胞クローンおよび骨芽細胞において、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術により(1)および(2)で同定した遺伝子および同定したタンパク質をコードする遺伝子をノックアウトした。すなわち、CRISPRdirect にて設計した gRNA と Cas9 タンパク質の複合体を培養細胞に Neon トランスフェクションシステムを用いて導入後、シングルセルソート法を用いてサブクローン化し、標的配列近傍の genomic PCR 産物の解析、qRT-PCR 法およびウェスタンブロッティング法にて、ゲノム DNA、mRNA、タンパクレベルで各クローンの検証を行った。得られたクローンを石灰化誘導培地で培養し、アリザリンレッド S 染色を行うことで、石灰化能を評価した。培養液中の Alkaline Phosphatase (ALP) 活性の評価は Abcam 社 Alkaline Phosphatase Assay Kit を用いた。さらに、逆の機能解析として、歯根膜細胞クローンにレンチウイルスベクターを用いることで同遺伝子を強発現させ、同様の解析を行った。ついで、RNAscope HD2.5 システムを用いて、歯周組織における同遺伝子群の発現局在を検討した。
- (4) 標的遺伝子座に EGFP-T2A-CreERT2-WPRE 配列をノックインするターゲティングベクターを作成し、ES 細胞へ電圧ポレーション法にて遺伝子導入し、得られた ES 細胞クローンから、PCR およびサザンブロット法にて相同組換え ES 細胞を選別した。得られた ES 細胞を用いてキメラマウスを作成した。

#### 4. 研究成果

- (1) マウス上顎骨組織からレーザーマイクロダイセクションを行うプロトコルについて、固定・脱灰法、凍結・パラフィン切片作成法、核酸抽出法について条件至適化を行った後、ホルマリン固定パラフィン切片から、歯根膜組織(図1) 骨芽細胞およびセメント芽細胞の存在する微小領域(図2) から RNA を抽出・精製した。同 RNA を用いた RNA-seq 解析および同様に分取したダイセクションサンプルからの nanoLC-MS/MS によるショットガン解析を行い、同定された遺伝子/タンパク質のうち、骨芽細胞およびセメント芽細胞間で発現差のある 18 分子を見出した。

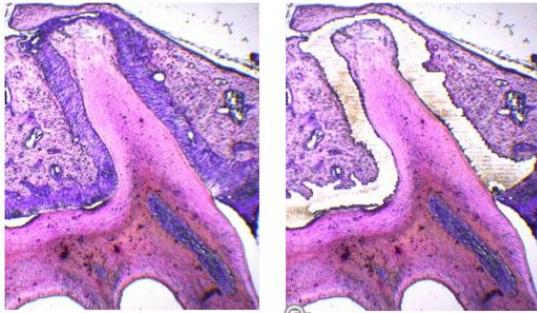


図 1: 歯根膜領域のダイセクション前(左側)と後(右側)の顕微鏡像

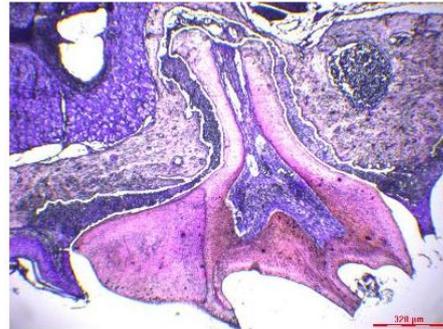


図 2: 歯根膜のうち、歯槽骨もしくはセメント質に接した一層の細胞をダイセクションした後の顕微鏡像

- (2) C57BL/6J マウスから上顎骨を採取し、歯肉由来細胞の混入を避けるため歯肉組織を一塊として剥離・除去後、第一臼歯を抜去し、同近心根周囲に付着した歯根膜組織を 0.5mm 径のスプーンキュレットを用いて採取した。以上の操作は実体顕微鏡下で行った。採取した歯根膜組織および歯肉組織から RNA を抽出・精製し、qRT-PCR 法にて歯根膜マーカーの発現を検討したところ、歯根膜組織に歯根膜マーカーの高い発現を認めた(図3)ことから、同手法により歯根膜が純度よく採取できていることが示唆された。この歯根膜を培養し、遊走・増殖した細胞を継代培養し、初代培養マウス歯根膜細胞(pMPDL)とした。この細胞を石灰化誘導培地にて培養すると、8日目および16日目でアリザリンレッド S 染色陽性の石灰化ノジュールを形成する(図4)ことから、pMPDL は高い石灰化能を持つ細胞を含んでいることが示唆された。ついで、シングルセルソート法を用いて、pMPDL から 1 細胞由来のクローン細胞株を 35 個得た。この中から石灰化誘導時のアリザリンレッド S 染色を指標に石灰化能の高いクローンと低いクローンを 3 つずつ選択(図5)し、これらの細胞形態、前駆細胞マーカー発現、ALP 活性、骨芽細胞関連タンパク発現などを検討したところ、有意な差は認めなかった。そこで、遺伝子発現を網羅的に解析するために RNA-seq 解析を行ったところ、石灰化能が高いクローンで有意に発現が増加している遺伝子 82 個を見出した(図6)。

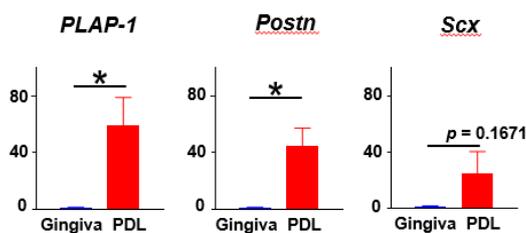


図 3: 採取歯根膜および歯肉組織における歯根膜マーカーの mRNA 発現 (n=4 mice、mean±/S.E.M.、\*p<0.05)

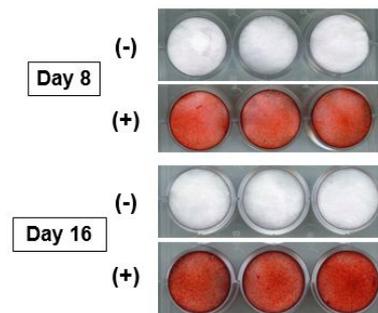


図 4: pMPDL を通常培地および石灰化誘導培地で培養 8、16 日目のアリザリン染色像

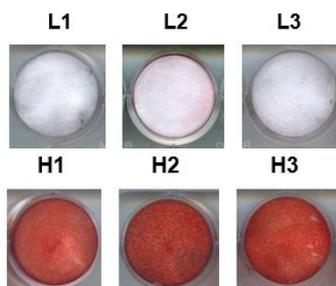


図 5: 石灰化能の異なるクローン (培養 8 日目のアリザリン染色像)

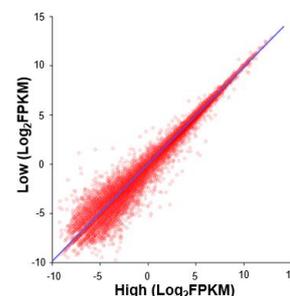


図 6: 石灰化能の異なるクローンの RNA-seq 解析・スキャタープロット

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

- (3) 培養歯根膜細胞および骨芽細胞を用いて、(1)および(2)の解析にて同定した遺伝子群の機能解析を行った。まず CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集とシングルセルソーティングにより遺伝子のノックアウト歯根膜細胞サブクローンを作製し、石灰化誘導培地で培養した際の分化能を検討した。

*Alpl* 遺伝子ノックアウト細胞は exon3 を標的とした gRNA を設計し、上清中の ALP 活性を測定することでノックアウトクローンの選別を行った (図 7)。作製したノックアウトクローンは標的配列近傍の genomic PCR 産物のシーケンス解析により、2bp/2bp の deletion が確認され (図 8)、ALP 活性が消失していた (図 9)。同細胞を石灰化誘導培地で培養しても、アリザリンレッド S 染色陽性の石灰化ノジュール形成を認めず、誘電率顕微鏡による基質小胞像や元素分析によるリン酸カルシウムのピークを認めなかった (図 10)。ALP が基質小胞形成に必須であることが示唆された。*Zbp1* 遺伝子についても同様にノックアウト細胞を作製し、mRNA レベルおよびタンパクレベルでのノックアウトを確認した。同細胞と親株の歯根膜細胞の石灰化能を比較したところ、石灰化誘導 8 日目におけるアリザリンレッド S 染色が大幅に遅延することが明らかとなった。

さらに、レンチウイルスベクターを用いた強発現細胞株を作製し、同様の解析を行った。一部の遺伝子については、RNAscope システムにより、その歯根膜における発現局在を検討した。

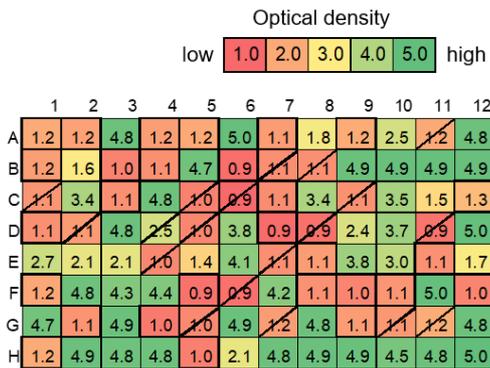


図 7: 96well プレートに播種したサブクローンの培養上清中の ALP 活性 (斜線は細胞増殖が認められなかった well)

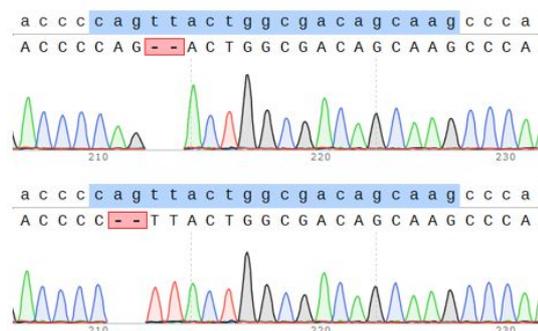


図 8: ゲノム編集部位近傍のシーケンス解析 (青色: gRNA の標的的特異的配列、赤色が欠失部位)

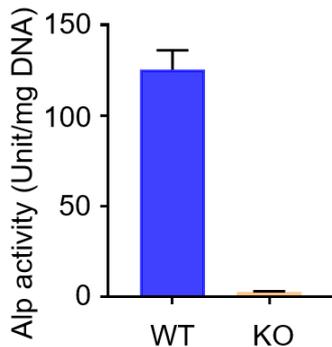


図 9: 野生型および *Alpl* ノックアウト細胞の ALP 活性

*Alpl* KO cells cultured in osteogenic media

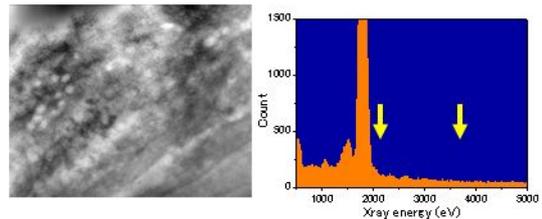


図 10: 石灰化誘導培地にて培養した *Alpl* ノックアウト細胞の誘電率顕微鏡像 (左側) および元素分析 (右側)

- (4) 新規ノックインマウス作製にむけて、PCR およびサザンブロット法にて相同組換え ES 細胞を選別した (図 13)。キメラマウスの作出を経て、今後、タモキシフェン誘導性の系譜解析により、歯根膜・セメント質の *in vivo* 解析を予定している。

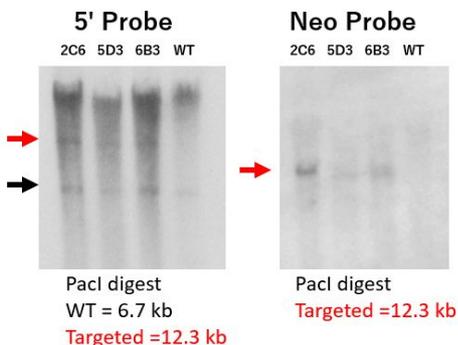


図 11: 5' および Neomycin カセットに設計した DNA プロブによるサザンブロット解析 (PCR 法によって陽性判定を行った 3 クローン及び野生型 ES 細胞)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- (1) T. Iwayama, T. Okada, T. Ueda, K. Tomita, S. Matsumoto, M. Takedachi, S. Wakisaka, T. Noda, T. Ogura, T. Okano, P. Fratzl, T. Ogura, S. Murakami, Osteoblastic lysosome plays a central role in mineralization, **Science Advances** (2019) in press. 査読あり

〔学会発表〕(計10件)

- (1) 上田 亜美、岩山 智明、富田 貴和子、松本 修治、村上 伸也；骨芽細胞コミットメント制御因子の探索、第62回春季日本歯周病学会学術大会、2019年5月24日、神奈川県
- (2) 富田 貴和子、岩山 智明、上田 亜美、松本 修治、村上 伸也；標識保持細胞の追跡による歯根膜間葉系幹細胞の同定、第62回春季日本歯周病学会学術大会、2019年5月24日、神奈川県
- (3) 岩山 智明；前骨芽細胞コミットメント調節因子の探索、第3回 Skeletal Science Retreat、2018年11月17日、神奈川県
- (4) 岩山 智明、上田 亜美、富田 貴和子、松本 修治、竹立 匡秀、村上 伸也；走査電子顕微鏡による基質小胞を介した石灰化過程の解明、第61回秋季日本歯周病学会学術大会、2018年10月27日、大阪
- (5) T. Ueda, T. Iwayama, K. Tomita, A. Hirai, M. Takedachi, S. Murakami；Clonal analysis of primary murine periodontal ligament-derived cells、2018 IADR GENERAL SESSION 2018年7月26日、London
- (6) 岩山 智明、竹立 匡秀、村上 伸也；非侵襲的イメージング法による骨芽細胞の石灰化機構解明、第3回口腔医科学フロンティア研究会、2018年3月5日、徳島
- (7) T. Iwayama, T. Ueda, S. Wakisaka, S. Murakami；Lineage analysis of nestin positive cells in periodontal tissue、International Symposium Oral and Craniofacial Development and Diseases 2016、2016年12月12日、大阪
- (8) T. Ueda, T. Iwayama, S. Murakami；Histological analysis of periodontal tissue in Col-GFP mice、International Symposium Oral and Craniofacial Development and Diseases 2016、2016年12月12日、大阪
- (9) 岩山 智明、脇坂 聡、村上 伸也；PDGFR シグナルによる pericytes の運命決定機構の解明、第58回歯科基礎医学会学術大会、2016年8月24日、北海道
- (10) 岩山 智明、脇坂 聡、村上 伸也；歯根膜 Nestin 陽性細胞の解析、第59回春季日本歯周病学会学術大会、2016年5月20日、鹿児島

## 6. 研究組織

- (1) 研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号(8桁)：
- (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。