

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17332

研究課題名(和文)免疫機構に着目したDown症患者の歯周疾患の基礎的解析および治療法の開発

研究課題名(英文) Basic analysis and development of treatment method of periodontal disease in Down Syndrome focusing on the immune system

研究代表者

赤澤 友基 (AKAZAWA, Yuki)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：10646152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Down症候群では、歯周疾患が好発するため、分子メカニズムレベルで解析することを目指した。Down症候群由来の歯肉細胞株の作製を試みたが、安定して21番染色体にトリソミーを示す細胞株を得ることができなかった。

そこで、同時に作製していた正常歯肉細胞株を用いて、抗てんかん薬バルプロ酸による副作用とEotaxin-1を含めた炎症性サイトカインの関性に注目した。そこで、正常歯肉細胞にバルプロ酸を投与すると、細胞増殖試験において、増殖傾向を認めることがわかった。バルプロ酸の投与により歯肉細胞の増殖が促進し、炎症を惹起することによりさらに増殖促進が進行する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Down症候群は染色体異常の中では疫学的に最も発生頻度が高い。臨床的には齲蝕罹患率は低いが、歯周疾患は発症しやすい。そのためDown症候群に関連した歯周疾患に関連したサイトカインネットワークを解析することにより、歯周疾患に対する新たな治療法の開発を目標としていた。

しかし、Down症候群の歯肉細胞株ができなかったため、全身投与の薬物により誘発される歯肉増殖症に注目した。歯肉増殖症は清掃不良になりやすく、清掃不良により症状はさらに増悪する。薬物性歯肉増殖症は歯科的には外科的歯肉切除しか治療がなく、口腔内管理がかなり難しい。その分子メカニズムの解明により、局所的な治療法を探ることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：In Down's syndrome, periodontal disease occurs frequently, so we aimed to analyze the molecular mechanism. First, we tried to prepare a gingival fibroblast cell line derived from Down's syndrome gingiva. Although a cell line showing trisomy on chromosome 21 could not be stably obtained.

Therefore, we focused on the relationship between the side effects of the antiepileptic drug sodium valproate and inflammatory cytokines including Eotaxin-1, using the normal gingival cell line. Then we found that when sodium valproate was administered to normal gingival fibroblast cells, a proliferation tendency was observed in a cell proliferation test. It was shown that the administration of sodium valproate promotes the proliferation of gingival fibroblast cells and inflammation may further promote the proliferation.

研究分野：小児歯科

キーワード：歯肉細胞 Down症候群 てんかん 薬物性歯肉増殖症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ダウン症は21番染色体のトリソミー症により発症し、早期老年症の形質を示し、歯科的には齲蝕の発生は少ないが歯周病の発生・進行が速い特徴を示す。当初、21番染色体に乗る遺伝子の強発現により、直接的に歯周疾患や寿命に関与していると考えていたが、単一染色体に乗る遺伝子のみが原因ではない可能性も示唆された。つまり、複雑な歯周組織で発症する歯周疾患は、21番染色体に乗る遺伝子が一部に介入する複数のサイトカインまたは細胞内シグナルネットワークが関与しているのではないかと考えられた。またダウン症の歯周疾患の早期発症メカニズムを解明できれば、健常人での発症リスクや進行速度を予測可能な可能性があり、さらに新たな治療法の開発に応用可能と考えられた。

炎症の増悪に関連する因子として Eotaxin-1 に注目した。これは医科ではアレルギー疾患(アトピー、喘息、リウマチ等)で、炎症の増悪に関与することが報告されている。しかし歯周疾患における Eotaxin-1 の報告は非常に少ない。研究代表者らの解析でも、hTERT を導入した不死化ヒト歯肉細胞で Eotaxin-1 が強発現していることが明らかとなった。このことから歯周疾患には歯肉細胞の Eotaxin-1 が関与していることが予想された。さらにダウン症の歯肉と健常人の歯肉細胞の比較によって早期発症リスクの指標や歯周疾患の発症・進行メカニズムの解明の一助になると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、Down 症候群の歯肉細胞株と健常人の歯肉細胞株を比較し、Down 症候群における歯周疾患の早期発症・進行メカニズムの解明を行うことを目的とした。また、そこから歯周疾患に対する新たな治療法の開発への応用を行うことも視野に入れた。

今回の研究では、歯肉に発現している Eotaxin-1 に注目して、Down 症候群での関連を検討することとした。Eotaxin-1 は、CCR3 受容体を発現する T helper 2 (Th2) 細胞を誘導し、局所の炎症の悪化を誘導すると考えられる。そこで、免疫低下が生じやすい Down 症候群において Eotaxin-1 の発現を抑制することによる歯周疾患の改善を試みることにした。これによって、Eotaxin-1 の機能調整を行い、歯周疾患の新たなメカニズムや治療薬への開発が可能となれば、局所の免疫機構への介入による新規治療薬の開発となり、新しい視点からの歯周疾患へのアプローチの探索であると考えられる。

また、Down 症候群以外にも全身疾患と関連した歯周疾患として、薬物性歯肉増殖症が挙げられる。これは、全身疾患に対する薬物の副作用として歯肉増殖症が発現するものである。薬物性歯肉増殖症は口腔内管理が難しく、増悪しやすい。薬物の種類は様々なものが挙げられるが、今回はバルプロ酸に注目した。バルプロ酸はてんかんの第一選択薬として使用されることが多く、副作用には歯肉増殖の記載はない。しかし、患者には歯肉増殖を認める症例も多く、症例報告も認められる。

本研究では Down 症患者の歯肉細胞の不死化細胞株を作成する。その細胞株の解析を行うことと、バルプロ酸による影響を解析することで、歯肉増殖症および歯周病の解析を行うことが目的である。本研究計画は歯周病治療に関して解析を行うので、歯科医療において非常に重要であると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) ダウン症歯肉細胞の採取

ダウン症候群の成人の抜去歯に付着した歯肉組織を無菌的に採取し、2%collagenase にて15分処理し組織を分解した後、ディッシュに播種した。

同様に、対比検討に用いるため、正常の脱落乳歯より採取した歯肉組織より、同様の方法を用いて歯肉細胞を採取した。

#### (2) ダウン症歯肉細胞の不死化細胞株の樹立

上記の方法で増殖してきた細胞に対して、ヒトテロメア逆転写酵素(hTERT; Human Telomerase Reverse Transcriptase)遺伝子の遺伝子導入を行った。ネオマイシン 200 µg/l でセレクション後、single-cell cloning を行い、細胞倍化指数(population doubling level, PDL)100PDL 以上の細胞を不死化細胞として細胞株とした。

同様の方法を用いて、正常歯肉細胞株も作成した。

#### (3) ダウン症歯肉細胞の不死化細胞株の解析

上記で作成した細胞株がダウン症候群由来の細胞であることを確認するために、2つの方法を用いて確認を行った。まず、21番染色体上に位置する遺伝子である dual-specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1A (DYRK1A) に着目した。DYRK1A はタンパク質リン酸化酵素としての働きを持つ。つまり、ダウン症候群の細胞であれば、DYRK1A が過剰発現していることを real-time PCR にて検討を行った。そののち、遺伝子の核型解析を行い、ダウン症候群の細胞である確認を行った。

#### (4) 健常歯肉細胞株の不死化細胞を使用した解析

ダウン症歯肉細胞株に対するバルプロ酸の影響を検討する前に、正常細胞に対するバルプロ酸の影響を検討するために解析を行った。最初に、バルプロ酸の濃度を検討するために、様々な濃度のバルプロ酸を投与した際の細胞増殖能を検討した。増殖能の解析には cell counting kit 8 を使用した。また RT-PCR 法により歯肉増殖にかかわる因子の発現を解析した。

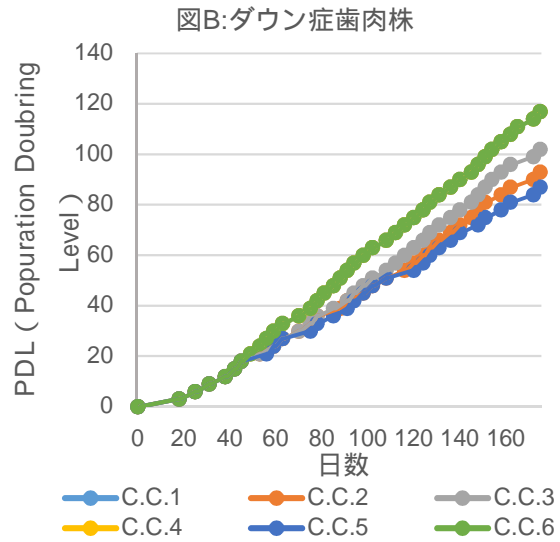
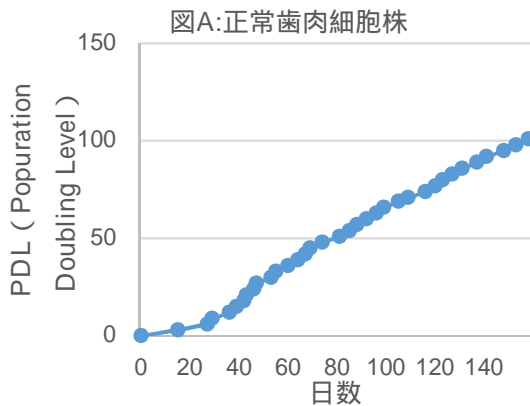
#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞形態の解析

分離した細胞は、形態的には線維芽細胞様の形態を示した。分離直後から、正常歯肉細胞もダウン症歯肉細胞も増殖し、両者とも形態的に違いは認められなかった。

##### (2) 細胞株の細胞倍化指数

TERT 遺伝子の安定的遺伝子発現細胞を single-cell cloning を行った。この中から 100 PDL 以上の細胞分裂を示したものを不死化細胞として樹立した。それぞれの細胞株の増殖についてグラフに示す (図 A, 図 B)。正常歯肉細胞株については、代表的なものを示す。ダウン症歯肉細胞株については、遺伝子導入にて得られた 6 つの細胞株すべてについて示す。



##### (3) DYRK1A の発現解析および核型分析

上記で得られたダウン症歯肉細胞株が、ダウン症の特性を持つか確認するために、2つの方法を用いて、解析を行った。まず、ダウン症は 21 番染色体がトリソミーになることで、様々な表現型を示すようになるため、21 番染色体上に位置する遺伝子である dual-specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1A (DYRK1A) に着目した。DYRK1A はタンパク質リン酸化酵素としての働きを持つ。つまり、ダウン症候群の細胞であれば、DYRK1A が過剰発現していることを real-time PCR にて検討を行った (図 C)。6 つの細胞株のうち、図 C に示す 3 つは control と比較して、DYRK1A の mRNA 発現が増加していた。そこで、その 3 つの細胞株に対して、遺伝子の核型解析を行い、ダウン症候群の細胞株の確認を行った (図 D、図 E、図 F)。

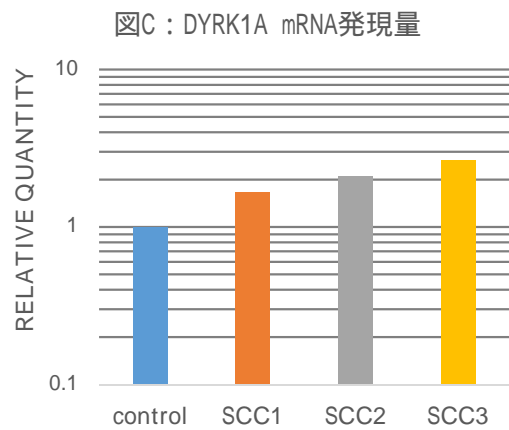


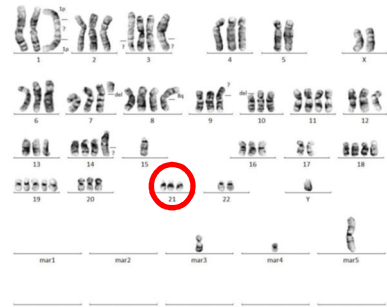
図 D: 核型解析 (SCC1)



図 E: 核型解析 (SCC2)



図 F: 核型解析 (SCC3)

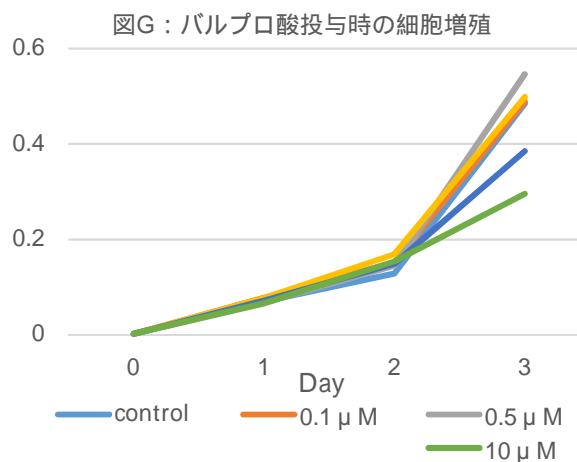


核型解析から、上記のように 2 つの細胞株は 21 番染色体がトリソミーを呈しておらず、残りの 1 つの細胞株は、21 番染色体はトリソミーだったが、他の染色体にも異常が見られた。

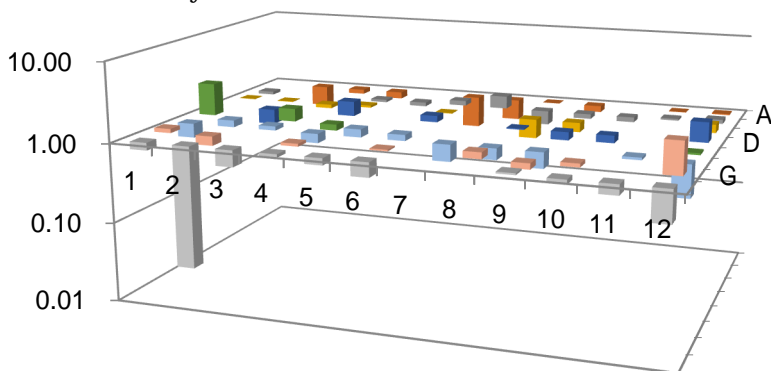
#### (4)バルプロ酸投与の解析

正常歯肉細胞株に対して、バルプロ酸の投与を行い、細胞の増殖を検討した。最初にバルプロ酸の濃度を検討した。(図G)

Control と比較してバルプロ酸投与時に細胞の増殖傾向が見られたため、primer array を用いて、関与が疑われる因子を網羅的に解析した(図H)。



図H：Primer array



#### 〔考察〕

今回の研究では、ダウン症歯肉細胞株を作製し同細胞を用いて、研究を行う予定であった。得られた細胞にヒトテロメア逆転写酵素(hTERT; Human Telomerase Reverse Transcriptase) 遺伝子の遺伝子導入を行い、細胞株を作製した。得られた細胞株は100 PDL以上の細胞倍化指数を示したため、不死化細胞株の作成には成功したと考えられる。

そこで、得られた不死化細胞株がダウン症由来の細胞株であることを確認するために、2つの方法にて解析を行った。まず、real-time PCR法にて21番染色体上に位置する遺伝子であるdual-specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1A(DYRK1A)の発現を調べた。ダウン症候群の細胞であれば、21番染色体がトリソミーであることより、DYRK1Aが通常より過剰発現していると予測し検討を行ったところ、6つの不死化細胞株のうち、3つはDYRK1Aの発現に上昇傾向が確認された。そこで、その3つの不死化細胞株について、遺伝子の核型分析を行った。核型分析では、どの不死化細胞株もダウン症と断定できなかった。

近年iPS細胞などのヒト多能性幹細胞でも核型異常が認められたことから、ヒト多能性幹細胞のゲノム安定性が問題となっている。ある報告では、長期培養中の細胞株の20%以上に核型異常が確認されたとの報告もある。また、遺伝子導入により染色体数の異常が生じる可能性も示唆された。以上のような理由から、今回の不死化細胞株では、hTERTを遺伝子導入していること、長期培養を行っていることから、遺伝子の核型異常が生じやすかった可能性が高いと考えられる。したがって、ゲノムの安定性を得るために、さらに考察が必要であると考えられる。

また、正常歯肉細胞株に対する、バルプロ酸投与に対する研究では、バルプロ酸を投与することにより0.5 μMをピークに、濃度依存的に細胞の増殖を抑制する可能性が示唆された。0.5 μMのバルプロ酸の投与では、細胞増殖の促進傾向が見られた。したがって、0.5 μMにて今後の研究を行うこととした。バルプロ酸投与時の様々な因子を網羅的に評価するため、primer arrayを用いて解析を行った。この解析から、バルプロ酸の投与により発現が1/100程度に抑制される因子があることが確認された。以上のことより、バルプロ酸の投与による歯肉増殖に、今回発見された因子がどのように関与するか、今後検討を行う必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kimiko Ueda Yamaguchi, Yuki Akazawa, Kawarabayashi Keita, Asuna Sugimoto, Hiroshi Nakagawa, Miyazaki Aya, Weih Falk, Kurogoushi Rika, Iwata Kokoro, Takamasa Kitamura, Yamada Aya, Tomokazu Hasegawa, Fukumoto Satoshi and Tsutomu Iwamoto	4. 巻 19
2. 論文標題 Combination of ions promotes cell migration via ERK1/2 pathway in human gingival fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 5039-5045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aya Miyazaki, Asuna Sugimoto, Keigo Yoshizaki, Keita Kawarabayashi, Kokoro Iwata, Rika Kurogohshi, Takamasa Kitamura, Kunihiro Ootsuka, Tomokazu Hasegawa, Yuki Akazawa, Satoshi Fukumoto, Naozumi Ishimaru and Tsutomu Iwamoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Coordination of WNT signaling and ciliogenesis during odontogenesis by piezo type mechanosensitive ion channel component 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 - 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51381-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugimoto Asuna, Miyazaki Aya, Kawarabayashi Keita, Masayuki Shono, Yuki Akazawa, Tomokazu Hasegawa, Kimiko Ueda Yamaguchi, Takamasa Kitamura, Yoshizaki keigo, Fukumoto Satoshi and Tsutomu Iwamoto.	4. 巻 7
2. 論文標題 Piezo type mechanosensitive ion channel component 1 functions as a regulator of the cell fate determination of mesenchymal stem cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18089-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊澤 里莉、守谷 有紀、長谷川 智一、赤澤 友基、岩本 勉
2. 発表標題 歯根膜細胞における低酸素環境下でのエピジェネティクス制御の解析
3. 学会等名 徳島県歯科医学大会・第56回四国歯学会例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒厚子 璃佳、長谷川 智一、赤澤 友基、杉本 明日菜、河原林 啓太、上田 公子、岩本 勉
2. 発表標題 乳歯歯髄細胞におけるEotaxin-1の発現調節機構の解析
3. 学会等名 第56回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒厚子璃佳、赤澤友基、長谷川智一、杉本明日菜、上田公子、岩本 勉
2. 発表標題 乳歯歯髄細胞におけるケモカインCCL11の発現解析
3. 学会等名 小児歯科学会 第36回中四国地方会大会および総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉本明日菜、赤澤友基、長谷川智一、宮寄 彩、河原林啓太、岩本 勉
2. 発表標題 PIEZ01は歯髄細胞の分化運命決定に関与し、象牙芽細胞への分化を促進させる
3. 学会等名 第55回小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮崎 彩、杉本明日菜、井上秀人、北村尚正、上田公子、河原林啓太、赤澤友基、長谷川智一、岩本 勉
2. 発表標題 当科における10年間の口唇口蓋裂児の実態調査
3. 学会等名 第55回小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----