

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号： 11301

研究種目： 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間： 2018～2019

課題番号： 17KK0182

研究課題名（和文）DNAメチル化調整による神経堤様MSCスフェアの分化能制御

研究課題名（英文）Control of Neural crest stem cell like MSC spheroids with DNA methylation

研究代表者

新部 邦透（Niibe, Kunimichi）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50468500

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間： 11ヶ月

研究成果の概要（和文）：エピジェネティクスは遺伝子の変異を伴わない形質変化であるが、歯原性間葉がエピジェネティクスの影響を受けるかはよく分かっていないのが現状である。今回、米国Mayo clinicに存在するHdac3-CKOosxトランスジェニックマウスを利用して、歯原性間葉組織におけるエピジェネティクスの影響を解析した。結果、HDAC3が抑制されると、野生型マウスは歯根が短く、成長が抑制されていた。さらに詳しく解析すると、HDAC3が存在しない象牙質やセメント質といった歯原性間葉は、分化が抑制されており、異常な構造を呈することが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、HDAC3抑制もしくは薬剤としてのインヒビターが歯原性間葉組織の成長や分化を抑制、停止する可能性があることが明らかとなった。これら得られた知見は、将来的に歯胚再生が実現した際に、再生歯胚の物理的な大きさや形態を人為的に調整できる可能性を示唆させるこれまでにない成果であると考えられる。今後、我々が研究している間葉系幹細胞スフェアを歯原性間葉に分化することが可能となれば、HDAC3インヒビターをうまく利用することで、その分化を調整できるかを検証していくことを予定している。

研究成果の概要（英文）：Studies on human and animal models have demonstrated the complex molecular regulatory network between dental mesenchyme and epithelium governing tooth development. However, epigenetic regulation of tooth development has not been well investigated. The aim of this study was to elucidate the relationship between an epigenetic modifier and dental root development using Hdac3-CKOosx mice. We show that Hdac3 depletion in Osterix expressing dental pulp stem cells, odontoblasts, and cementocytes cause a progressive postnatal obstruction resulting in comparatively short roots and smaller root apices of the molar. We observed degeneration in the histological development of dentin and cementum structures. Dentin and cementum had shaky borders and disordered hematoxylin staining; in addition, the Hdac3-CKOosx had thin cementum compared to that in the wild-type mice. These findings show that Hdac3 is essential in dental mesenchymal cells and regulates the rate of root formation and development.

研究分野：再生歯科学

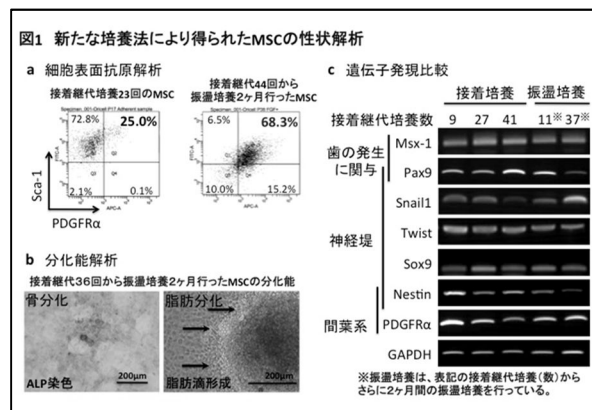
キーワード：エピジェネティクス 歯原性間葉 分化制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、骨髄中に存在する PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>の高純度間葉系幹細胞(PaS-MSCs)が神経堤幹細胞を含むことを明らかにしてきた (Morikawa et al, Biochem Biophys Res Commun, 2009, Niibe et al. Inframm Regen, 2011)。そこで、発生学的に神経堤由来である顎骨組織等の頭頸部間葉組織の再生に骨髄中の MSCs が有用なのではないかと考えた。しかしながら、接着継代培養を繰り返した MSC は未分化性を失うことが報告されており (Bonab et al. BMC Cell Biol, 2006, Bork et al. Aging Cell, 2010.) PaS-MSCs も同様に長期にわたる接着培養にて容易に未分化性を喪失し、PDGFR $\alpha$  の発現が喪失することが分かっている (図 1-a)

そこで我々は、未分化性を維持するための培養方法として、浮遊培養に着目した。MSCs をある一定の条件下で振盪培養を行うと、10~14 日でフラスコ中に細胞塊の形成が確認できた。面白いことに、接着継代培養を重ね未分化性を失った MSCs を浮遊振盪培養環境下で培養すると、細胞塊は未分化性を回復し、PDGFR $\alpha$  の発現も回復することが確認できた (図 1-a, b)



さらに興味深いことに、我々の方法で形成した細胞塊 (スフェア) は培養皿上で三次元的な形態を数継代保持し、未分化状態の MSCs を供給し続けることを見出した。このスフェアは、三次元的な幹細胞プールとして臨床応用できる可能性がある (特願: 2017-83483)。申請者はこの中で、頭頸部間葉組織が神経堤由来であることに着目し、この細胞塊が神経堤の性質をある程度維持していることも確認している (図 1-c)

神経堤幹細胞としての要件を維持した細胞ソースが得られれば、顎骨や歯原性間葉 (象牙質や歯髄) への誘導を行う予定である。しかし、予想されるのが移植先での免疫応答や環境因子の影響である。近年、エピジェネティクスに関わる因子として HDAC ファミリーのヒストン脱アセチル化が骨や軟骨など様々な細胞でその増殖や分化に影響を及ぼしていることが報告されている (MacGee-Lawrence et al. Bone, 2013)。我々が作製する神経堤様 MSC スフェアもエピジェネティクスの影響を受け、再生の場でうまく機能しない可能性もある。特に顎骨は、大腿骨など他の骨組織とは違い外界と容易に暴露される環境にある。口腔内のように様々な刺激を受ける環境下では、移植細胞はエピジェネティクスの影響を受けやすいことが予想され、その制御が可能なのかは分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、エピジェネティクスが発生学的に顎骨・歯組織中のどの細胞にどの様に影響するかを解析する。さらに *in vitro* において標的細胞の性質 (分化能や増殖能) を制御できるかを解析し、我々の作製した神経堤様 MSC スフェアもエピジェネティクス制御が可能かを検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本国際共同研究は、骨組織のエピジェネティクス研究の第一人者である米国 Mayo Clinic 整形外科の Westendorf 教授との共同研究により遂行した。Westendorf 研究室では、

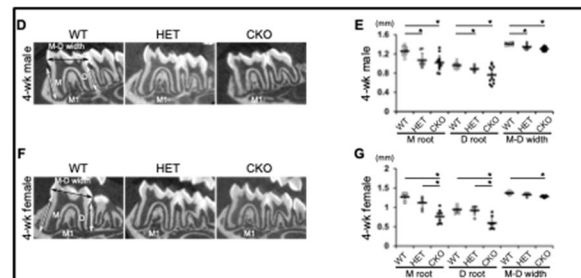
各種 HDAC を細胞選択的にノックアウト(CKO)できるマウスを数種類保有している。長管骨に発生異常をきたすトランスジェニックマウス(Osterix-cre/ Floxed-Hdac3) ( Razidlo et al. Plos One, 2010 ) を用いた顎骨領域の予備解析から、CKO マウスの顎骨及び切歯・大白歯歯根に劣成長が確認できた。そこで本研究は、

計画 1 : 各種 CKO マウスの歯・顎骨を  $\mu$ CT・免疫組織染色にて形態学的・組織学的に解析し、HDAC 阻害 (CKO) の影響を解析し、標的細胞を同定する。

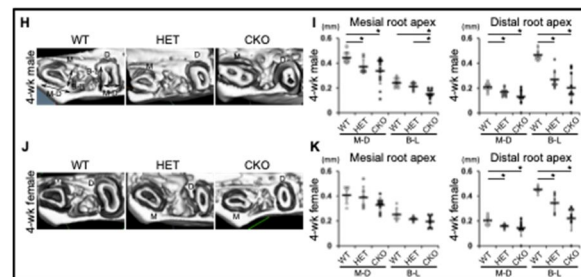
計画 2 : 標的細胞や神経堤様 MSC スフェアに HDAC インヒビターを添加することで、分化能・増殖能に変化が生じるかを比較解析する。

#### 4 . 研究成果

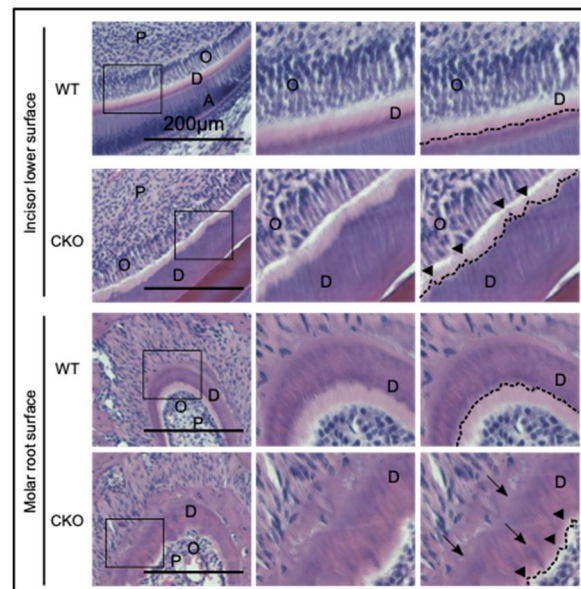
Osterix-cre/ Floxed-Hdac3 マウスの解析の結果、マイクロ CT 解析から切歯歯胚の位置異常が確認できた。さらに第 1 大白歯歯根が野生型に比較して短く、歯冠の近遠心径が短く、歯の劣成長が疑われた。



さらに、根尖部の 3 次元画像からは、トランスジェニックマウスの第 1 大白歯根尖は野生型マウスよりも近心根、遠心根ともに孔が小さく、早期閉鎖しているか劣成長が疑われた。この結果、歯根を形成する象牙質やセメント質への HDAC3 の影響 (分化抑制や細胞死) が考えられた。

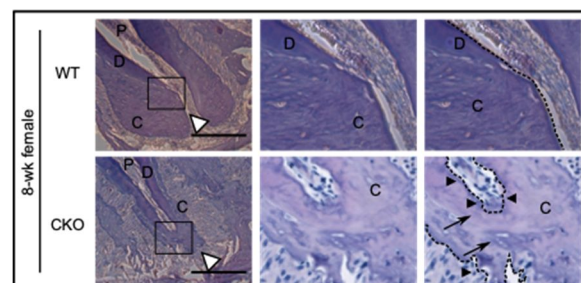


そこで、4 週齢の Osterix-cre/ Floxed-Hdac3 マウスの組織学的解析を行った。切歯下縁の象牙芽細胞層は野生型に比較して構造が不規則で直線的な配列が損なわれていた。



一方、トランスジェニックマウス大白歯歯根表面の象牙質も野生型に見られる規則的で直線的な構造とは異なり、不規則な構造を呈していた。さらにヘマトキシリン強陽生の不規則な構造を象牙質中に認めた。

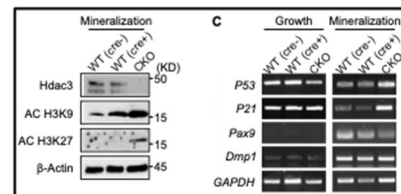
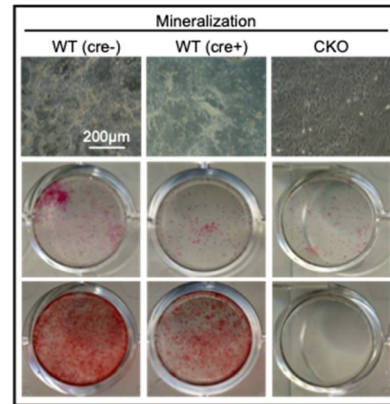
また 8 週齢マウス根尖部を解析すると、野生型マウスでは成長した規則的な層状構造を呈するセメント質層を確認できるが、トランスジェニックマウスではセメント質層が薄く、不規則な構造を呈し、根尖部が閉鎖していることが確認できた。



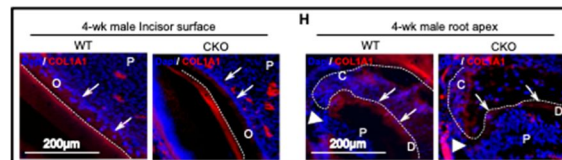
そこで、歯原性間葉組織が HDAC3 の欠失によって分化抑制や早期老化している可能性を考え、in vitro による細胞の解析を行った。

歯髄幹細胞は、象牙芽細胞へと分化し、象牙質（硬組織）を形成する。トランスジェニックマウスから採取した歯髄幹細胞を石灰化条件で培養すると、野生型で確認できるアルカリフォスファターゼやアリアリンレッド S 染色で、石灰化を確認できなかった。

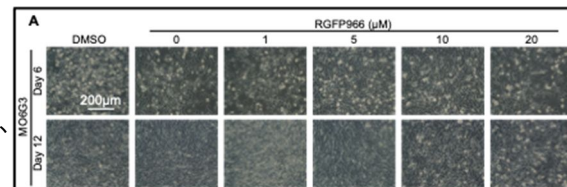
トランスジェニックマウスから採取した歯髄幹細胞は、石灰化の家庭でも HDAC3 は欠失しており、ヒストン(H)3K9 と H3K27 のアセチル化が確認でき、細胞の生存や老化に関わる P53 や P21 が高発現していた。



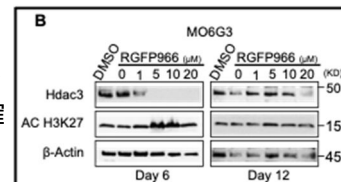
免疫組織学的解析では、切歯象牙芽細胞層、大白歯根尖部象牙芽細胞層で Type1 コラーゲンの発現の低下を認めた。



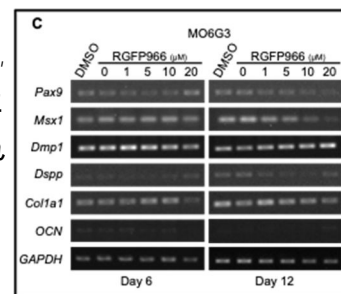
さらに、象牙芽細胞 (MO6-G3) のセルラインを入手し、HDAC3 インヒビターを加えた解析を行った。HDAC3 インヒビターの添加で、細胞の表現系には大きな差は確認できなかった。



しかしながら HDAC3 の抑制はタンパク質レベルで確認でき、H3K27 のアセチル化も培養 6 日において増強していることが確認できた。



一方、歯原性間葉の分化に関する遺伝子群 ( Pax9, Msx1, Dmp1, Dspp, Col1a1, OCN ) の発現は大きな変化を確認できなかった。これは細胞の不死化に伴い、HDAC3 抑制の効果がはっきりと現れなかったのではないかと考えられる。



本研究では、現在、MSC スフェアにおける HDAC3 抑制の効果を検証中である。我々の作製する神経堤様 MSCs 細胞塊の骨分化を制御できる、もしくは歯根の長さを制御できるなど、DNA メチル化を操作することで試験管内での幹細胞の分化や増殖を制御する技術へ発展させることを目標としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kunimichi Niibe, Hiroshi Egusa, Jennifer J. Westendorf
2. 発表標題 HDAC3 deletion in Osterix-expressing dental mesenchyme cells interferes development of tooth root.
3. 学会等名 東北 国立台湾・国立陽明デンタルシンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019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
主たる 要 領 先 の 主 たる 海 外 共 同 研 究 者	ウェステンドルフ ジェニファー  (Westendorf Jennifer)	メイヨークリニック・Orthopedic surgery・Professor	