

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02982

研究課題名(和文) ステムセルエイジング制御による歯周組織再生効果増強と新規治療法開発への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to the development of new treatments applying the enhancement of periodontal tissue regeneration by controlling stem cell aging

研究代表者

北村 正博 (Kitamura, Masahiro)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：10243247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯根膜幹細胞のステムセルエイジング機構を分子レベルで解明し、幹細胞のステムセルエイジング制御が歯周組織再生効果の増強をもたらす可能性を探索した。その結果、歯根膜細胞の老化過程におけるmiRNAの発現プロファイル解析により、老化歯根膜細胞において、miRNA-137の発現上昇と損傷ミトコンドリアの処理過程の遅延に關与する遺伝子群との關連性が明らかとなった。そして、miRNA-137と相同配列を有する人工microRNA模倣鎖を導入した歯根膜細胞において、それらの遺伝子の有意な発現減少が認められたことから、ステムセルエイジング制御による歯周組織再生効果の増強の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、miRNA-137と損傷ミトコンドリアの処理過程の遅延に關与する遺伝子群との關連性が明らかとなり、幹細胞のエネルギー代謝の中心となるミトコンドリア代謝の調節経路の異常が歯根膜細胞のステムセルエイジングに關与する可能性が示唆された。そして、miRNA-137などの人工microRNA模倣鎖を導入した歯根膜細胞において、損傷ミトコンドリアの標識と隔離膜への囲い込みに關与する遺伝子群の有意な発現減少が認められたことから、これらのmiRNAsを標的とするマイトファジー制御を基盤とする核酸治療薬がステムセルエイジング制御に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, elucidating the aging mechanism of periodontal ligament stem cells at the molecular level, we investigated the possibility that aging control of stem cells enhances the effect of periodontal tissue regeneration. As a result, the analysis of the miRNA expression profile during the aging process of periodontal ligament cells revealed a relationship between the increased expression of miRNA-137 and the genes involved in delaying the processing of damaged mitochondria in the aged periodontal ligament cells. Furthermore, since a significant decrease in the expression of these genes was observed in periodontal ligament cells into which artificial microRNA-mimicking strands having a sequence homologous to miRNA-137 were introduced, it was suggested that the control of stem cell aging may enhance the regeneration effect of periodontal tissue.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生 ステムセルエイジング 歯根膜細胞

1. 研究開始当初の背景

従前の歯周組織再生療法は、人工膜やエナメルマトリクスタンパクなどの歯周組織再生用医療機器を用いて歯根膜などに内在する幹細胞の能力を効果的に発揮させることにより歯周組織再生を図るものであった。しかし、歯周組織の幹細胞は供給量に限界があり加齢に伴いその数の減少や増殖・分化能の低下が認められ、更なる歯周組織再生効果の増強には幹細胞の供給や機能向上が必要であると考えられていたことから、幹細胞を量的に補完する方法としては、我々が手がけている脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) をはじめとして、骨髄や埋伏智歯などから採取した間葉系幹細胞を歯周組織欠損部へ移植することで歯周組織の再生を目指す細胞治療の将来の臨床応用が期待されていた。そして、平成 28 年 12 月に、我々の研究グループが研究開発した塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を有効成分とする歯周組織再生剤「リグロス®」が世界初の歯周組織再生用“医薬品”として日本で誕生し臨床応用が開始されたが、「リグロス®」を用いた歯周組織再生療法においても組織幹細胞の質的劣化がその再生効果に負の効果をもたらす問題は依然解決されず残ったままであった。

一方、近年の幹細胞研究の目覚ましい進歩により、幹細胞と幹細胞の維持に必要な微小環境 (ニッチ) の加齢変化 (ステムセルエイジング) が幹細胞の自己複製能の低下や分化異常を来らし、結果として、幹細胞の枯渇や機能劣化を招いていることが明らかにされて来ている。そして、このステムセルエイジングを制御することにより幹細胞の質的劣化の改善や幹機能向上の可能性が達成される可能性が示唆されていたことから、歯周組織においても、歯根膜幹細胞を頂点とした、前駆細胞、そして分化細胞と続く幹細胞システムの制御メカニズムを解析し、ステムセルエイジングを制御することにより歯周組織の再生効果の増強が誘導される可能性があると考えられていた。

2. 研究の目的

歯周組織再生において、幹細胞の量的制限を解決するために他組織から採取した幹細胞を歯周組織欠損部へ移植し幹細胞を量的に補完する細胞治療はすでに一部で臨床応用されている。しかしながら、幹細胞の質的劣化の改善や機能向上による再生効果の増強を目指した試みは皆無に近い。そこで、本研究では、歯周組織の恒常性維持や歯周病によって破壊された歯周組織の修復再生において必須の役割を果たしている歯根膜幹細胞など組織幹細胞のステムセルエイジング機構を細胞機能の面から分子レベルで解明し、幹細胞のステムセルエイジング制御が歯周組織再生効果の増強をもたらす可能性を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

1) *in vitro* の歯根膜幹細胞老化モデルを構築

細菌感染や外傷性咬合などの環境ストレスに曝露していない埋伏智歯より採取したヒト初代培養歯根膜細胞を NIH-3T3 変法に基づいた継代培養して細胞老化を誘導し、*in vitro* 歯根膜幹細胞老化モデルを構築した。

2) 歯根膜幹細胞のステムセルエイジング機構の解析

1) で樹立した *in vitro* 歯根膜幹細胞老化モデルを用いて、各継代において幹細胞の表面抗原マーカーの確認を行った後、顕微鏡での形態観察、細胞周期制御に関わる P16 および P53 発現の確認、ライソゾームの senescent-associated β -galactosidase 活性の免疫細胞染色、老化関連ヘテロクロマチン病巣 (Senescence-associated heterochromatin foci, SAHF) 発現などの老化マーカーの動態を評価し細胞老化状態の解析を行った。また、細胞が産生する老化関連分泌 (Senescence-Associated Secretory Phenotype: SASP) 蛋白を real-Time PCR と ELISA 法にて解析した。

3) 歯根膜幹細胞におけるステムセルエイジングに関する miRNAs の解析

in vitro 歯根膜細胞老化モデルにおける各継代の歯根膜幹細胞から miRNA を精製、標識化し、human miRNA Microarray を使用して miRNA 発現プロファイルの解析を行った。また、同様に歯根膜幹細胞の total RNA 画分より mRNA を精製、標識化し、マイクロアレイを用いて mRNA 発現を解析した。そして、miRNAs 解析用ソフトウェアを用いて、継代数の増加/減少に伴い発現変動した miRNAs を特定し、それらの候補 miRNAs と mRNA 解析の結果を Ingenuity Pathway Analysis にて解析し、miRNAs の標的遺伝子を明らかにすることにより歯根膜幹細胞のステムセルエイジングに関する miRNAs について検討した。

4) 歯根膜幹細胞のステムセルエイジングにおけるトランスクリプトーム解析

in vitro 歯根膜幹細胞老化モデルにおける各継代数の歯根膜細胞から mRNA を精製、ライブラリを調整した後、次世代シーケンサ「Illumina HiSeq」による RNA シークエンスを実施し、継代数 7(P7) と 27(P27) の歯根膜細胞の mRNAs プロファイルを GeneSpring ソフトにより比較検討した。

5) miRNAs を標的とした核酸治療薬によるステムセルエイジング制御の検討

歯根膜幹細胞のステムセルエイジングに關与することを明らかにした miRNA-137 と miRNA181a の RNA 配列と相同配列を有する人工 microRNA 模倣鎖を合成しマウス歯根膜幹細胞に導入して、CellRox Green 染色により活性酸素種 (ROS) の細胞内局在を觀察するとともに、損傷ミトコンドリアの標識と隔離膜への囲い込みに關与する遺伝子である *FUNDC1* および *PARK2* (Parkin) の発現をリアルタイム PCR 法にて検討し、miRNAs を標的とした核酸治療薬によるステムセルエイジング制御の可能性を検討した。

6) ADSC の老化過程におけるプロテオーム解析

継代数 7(P7)と 23(P23)の ADSC の蛋白質画分を nano-LC カラムにて分画後、LC-MS/MS によるショットガン質量分析による網羅的な蛋白解析を実施し、線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) 添加群と非添加群の蛋白発現の変化を比較、検討した。

7) ビーグル犬歯周組織欠損モデルを用いたステムセルエイジング制御 ADSC の歯周組織再生効果の検討

microRNAs-mRNA-ミトコンドリア機能制御タンパク経路を標的としたステムセルエイジング制御による歯周組織再生効果増強を検証するため、ミトコンドリア代謝とアポトーシスに關連するサイトカイン X 処理によりステムセルエイジングを制御した ADSC と通常の ADSC をビーグル犬歯周組織欠損モデルに移植し、臨床のおよび組織学的に歯周組織再生効果を検討した。

8) ステムセルエイジングが亢進した高齢者における、歯周病と動脈硬化との關連についての検討

高齢者 (70 歳) を対象に、4 mm 以上ポケットの割合と超音波装置により測定した頸動脈肥厚との關連を縦断的に調査し、歯周病と動脈硬化との關連を多くの交絡因子の補正が可能な多変量解析を用いて検討した。

4. 研究成果

1) *in vitro* 歯根膜幹細胞老化モデルを用いて継代培養したヒト初代培養歯根膜細胞は、継代の増加に伴って肥大した細胞形態を呈し、細胞増殖能や幹細胞マーカーの発現低下に加え、クロマチンの異常を示した。継代数 30 以上の歯根膜細胞には、透過電子顕微鏡觀察により、ミトコンドリアと染色体構造の異常が多数認められた。また、遺伝子レベルでは、継代数の多い歯根膜細胞において、細胞周期の調節制御に關わる P53、P16 の発現増強並びに、炎症性サイトカイン IL-6、IL-8 などの発現増強が認められ、SASP 蛋白の産生増強も確認された。

2) *in vitro* 歯根膜幹細胞老化モデルにおける各継代の歯根膜細胞における miRNA の発現プロファイルとマイクロアレイを用いた mRNA 発現を検討し、Ingenuity Pathway Analysis 法を用いたトランスクリプトーム解析を行った結果、老化歯根膜細胞において細胞周期、炎症性応答、代謝能に關する miRNAs の増加が認められた。また、老化歯根膜細胞において、miRNA-137 の発現上昇と損傷ミトコンドリアの処理過程の遅延に關与する遺伝子群との關連性が明らかとなったことから、幹細胞のエネルギー代謝の中心となるミトコンドリア代謝の調節経路の異常が歯根膜細胞のステムセルエイジングに關与する可能性が示唆された。

3) 次世代シーケンサにより P7 と P27 の歯根膜細胞の mRNAs プロファイルを GeneSpring ソフトにより比較検討し、P7 に比べ P27 において 2 倍以上の発現変動を認めた mRNAs を対象とした GO term 解析を行なった結果、細胞分裂、核タンパク、DNA 修復およびコラーゲンをはじめとする細胞外基質タンパクに關する mRNAs 群が大きく変動することが明らかとなった。また、歯根膜幹細胞のステムセルエイジングに關与する miRNAs の機能解析を行った結果、歯根膜細胞の細胞老化に關与する miR-34a の導入により、炎症性サイトカイン (IL-6、IL-8 など) 産生が増強し、細胞外基質蛋白の一つであるペリオスチン産生の増加が認められた (図 1) ことから、歯根膜幹細胞のエイジングに miRNAs が關与している可能性が明らかとなった。

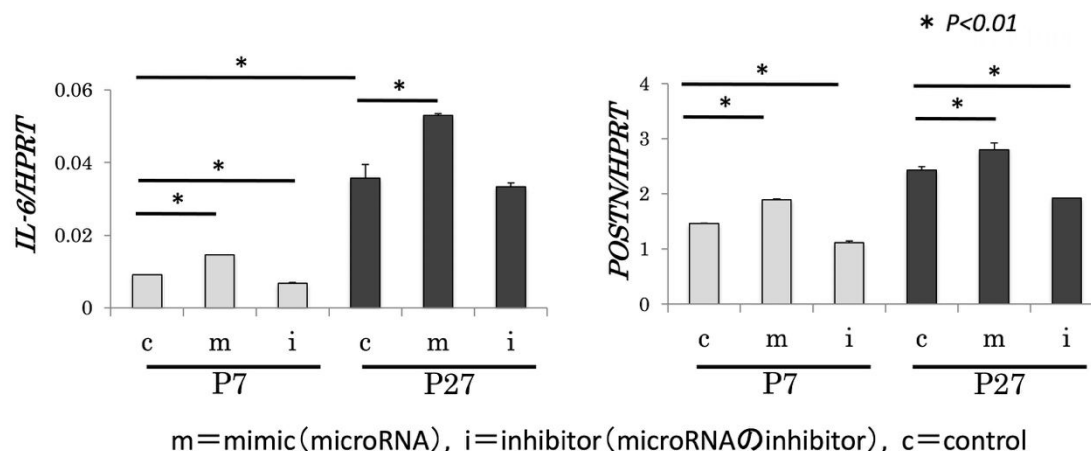


図1 miR-34a 合成オリゴヌクレオチド(mimic)の導入による遺伝子発現の変動

4) miRNA-137 および miRNA181a と相同配列を有する人工 microRNA 模倣鎖を導入した歯根膜幹細胞内において ROS が増加していることが観察された。また、これら人工 microRNA 模倣鎖を導入した歯根膜幹細胞において、*FUNDC1* および *PARK2* (Parkin) の有意な発現減少が認められたことから、miRNA-137 および miRNA181a を標的とするミトファジー制御を基盤とする核酸治療薬がステムセルエイジング制御に有用である可能性が示唆された (図2)。

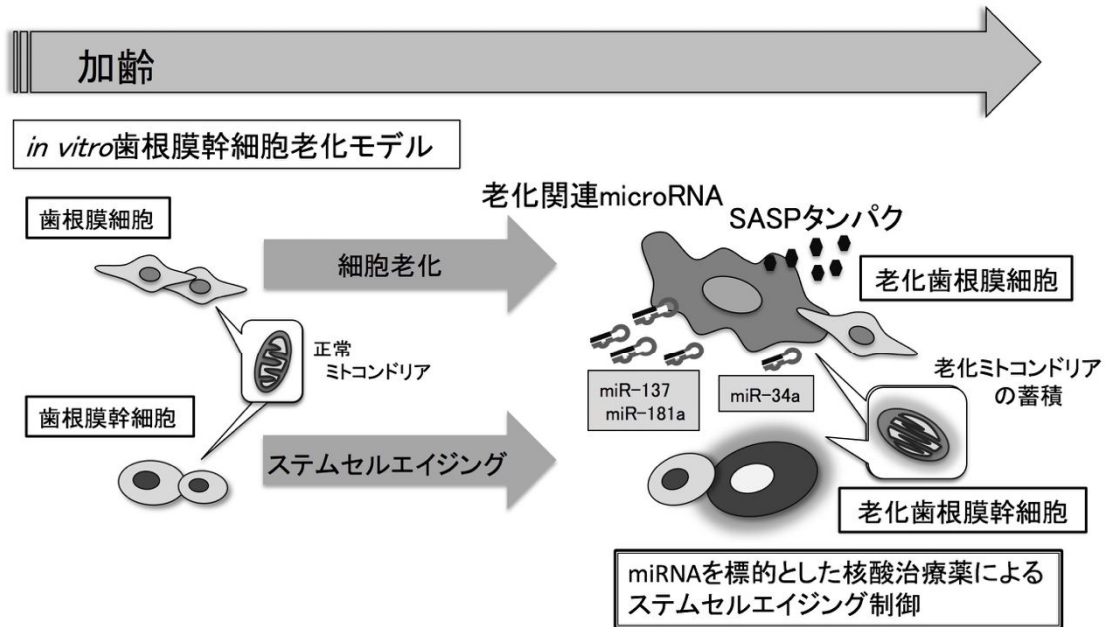


図2 研究成果の概要

5) P23 のADSCでは、P7と比べN-alpha-acetyltransferase 15 NatA auxiliary subunit (NAA15)、Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2 (LTBP2)などの発現が低下していたが、FGF-2添加によりこれらの蛋白発現の回復が認められたことから、機能低下した老化ADSCの増殖や再生能がFGF-2により賦活化できる可能性が示唆された。

6) ビーグル犬歯周組織欠損モデルにおいて、通常のADSCに比べサイトカインX処理によりステムセルエイジングを制御したADSCにより歯周組織再生効果が増強される可能性が示唆された。

7) 高齢者(70歳)において、医学的および社会経済的な多くの交絡因子とは独立して4mm以上ポケットの割合と頸動脈肥厚との間に有意な関連が認められたことから、ステムセルエイジングが亢進した高齢者において歯周病と動脈硬化とが関連する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitamura M, Ikebe K, Kamide K, Gondo Y, Yamashita M, Takedachi M, Nozaki T, Fujihara C, Yamada S, Kashiwagi Y, Miki K, Iwayama T, Hatta K, Mihara Y, Kurushima Y et al	4. 巻 109
2. 論文標題 Association of periodontal disease with atherosclerosis in 70-year-old Japanese older adults	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 506 ~ 513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-020-00567-z	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 該当する

1. 著者名 沢田啓吾, 北村正博, 長谷川詩織, 森本千晶, 平井麻絵, 今井 昂, 川崎公輔, 橋本康樹, 麻生桃子, 辻井翔一, 野田亜利紗, 花田滉輔, 政近健司, 藤田翔子, 鈴木美麻, 八木寛子, 池上久仁子, 山本智美, 森 健太, 中村友美, 小笹匡雄, 北垣次郎太, 岩山智明, 柏木陽一郎, 藤原千春, 三木康史, 竹立匡秀, 山下元三, 野崎剛徳, 村上伸也	4. 巻 63
2. 論文標題 塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）製剤を用いた歯周組織再生療法の治療成績	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 219 ~ 227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11471/shikahozon.63.219	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20件（うち招待講演 4件/うち国際学会 13件）

1. 発表者名 竹下登, 三木康史, 山下元三, 北村正博, 村上伸也
2. 発表標題 歯根膜細胞の分化過程におけるCGRPの機能解析
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ikegami K, Yamashita M, Miki K, Nishikawa A, Hashimoto K, Morikawa T, Takeshita N, Ikebe K, Kitamura M and Murakami S.
2. 発表標題 Genetic and Environmental Factors on Periodontitis in Elderly Twins.
3. 学会等名 106th Annual Meeting American Academy of Periodontology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎本梨沙、藤原千春、松本昌大、山本優、北垣次郎太、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子Paraxonase-1の機能解析
3. 学会等名 第153回日本歯科保存学会2020年度秋季学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T Nantakeeratipat, C Fujihara, M Matsumoto, R Masumoto, J Kitagaki, Y Yamamoto, M Kinoshita, M Kitamura, S Murakami
2. 発表標題 Identification of genetic riskfactors of aggressive periodontitis in the Japanese population
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川詩織、北村正博、今井昴、川崎公輔、橋本康樹、花田滉輔、麻生桃子、野田亜利紗、辻井翔一、政近健司、藤田翔子、鈴木美麻、平井麻絵、森本千晶、八木寛子、池上久仁子、沢田啓吾、中村友美、岩山智明、柏木陽一郎、藤原千春、三木康史、竹立匡秀、山下元三、野崎剛徳、村上伸也
2. 発表標題 大阪大学歯学部附属病院（口腔治療・歯周科）における塩基性線維芽細胞（FGF-2）製剤を用いた歯周組織再生療法の治療実績
3. 学会等名 第151回秋季日本保存学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikegami K, Yamashita M, Suzuki M, Nishikawa A, Hashimoto K, Nakamura T, Miki K, Yanagita M, Kitamura M, Murakami S.
2. 発表標題 MiR-34a Regulates Stem Cell Aging in Periodontal Ligament Stem Cells.
3. 学会等名 13th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamashita M, Suzuki M, Ikegam K, Nakamura T, Nishikawa A, Hashimoto K, Morikawa T, Miki K, Yanagita M, Kitamura M, Shinya Murakami.
2. 発表標題 Analysis of Mitophagy in Senescent HPDL Cell.
3. 学会等名 13th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木美麻, 山下元三, 池上久仁子, 中村友美, 西川有彩, 橋本康樹, 北村正博, 村上伸也
2. 発表標題 老化ヒト歯根膜細胞における活性酸素産生に及ぼすマイトファジーの役割
3. 学会等名 日本歯科保存学会春季学術大会 (第150回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hashimoto K, Yamashita M, Suzuki M, Ikegami K, Nakamura T, Nishikawa A, Morikawa T, Kitamura M, Murakami S
2. 発表標題 NMN Improves the Accumulation of ROS in Senescent HPDL Cells
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishikawa A, Yamashita M, Suzuki M, Ikegami K, Nakamura T, Hashimoto K, Morikawa T, Kitamura M, Murakami S
2. 発表標題 Activation of HSPs Ameliorates the Collagen Production in HPDL Cells
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takedachi M, Sawada K, Morimoto C, Hirai A, Shimomura J, Kawasaki K, Iwayama T, Kitamura M, Murakami S
2. 発表標題 Therapeutic efficacy and stem cell characteristics association in stem cell transplantation therapy
3. 学会等名 13th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Nishikawa, M. Yamashita, M. Suzuki, K. Ikegami, T. Nakamura, K. Hashimoto, T. Morikawa, M. Kitamura, S. Murakami
2. 発表標題 Roles of HSPs for Type 1 Collagen Synthesis in HPDL Cells
3. 学会等名 98th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北村正博
2. 発表標題 歯周組織再生剤「リグロス」の開発から学んだ歯科用薬剤開発の難しさ
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahide Takedachi
2. 発表標題 Stem cell therapy for periodontal regeneration
3. 学会等名 104th American Academy of Periodontology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahide Takedachi, Shinya Murakami
2. 発表標題 Evaluation of periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells in a clinical study
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辰巳真理、柳田学、長谷川詩織、鈴木美麻、池上久仁子、山下元三、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 タバコ煙の長期曝露が歯肉線維芽細胞の細胞機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第61回春季日本歯周病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahide Takedachi, Keigo Sawada, Chiaki Morimoto, Satomi Yamamoto, Asae Hirai, Junpei Shimomura, Yuki Narukawa, Yoichiro Kashiwagi, Tomoaki Iwayama, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
2. 発表標題 Clinical Evaluation of Periodontal Tissue Regeneration by ADMPC Transplantation
3. 学会等名 96th IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mio SUZUKI, Motozo YAMASHITA, Kuniko IKEGAMI, Tomomi NAKAMURA, Koji MIKI, Manabu YANAGITA, Masahiro KITAMURA, Shinya MURAKAMI
2. 発表標題 Impairment of mitophagy in senescent HPDL cells
3. 学会等名 96th IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motozo Yamashita, Mio Suzuki, Kuniko Ikegami, Tomomi Nakamura, Arisa Nishikawa, Koji Miki, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
2. 発表標題 Optical dissection of the mitophagy dynamics in HPDL cells
3. 学会等名 AAP 104th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuniko Ikegami, Motozo Yamashita, Mio Suzuki, Arisa Nishikawa, Tomomi Nakamura, Koji Miki, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
2. 発表標題 Senescence-associated miR-34a suppress osteoblastic differentiation in periodontal stem cell
3. 学会等名 66th JADR (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	竹立 匡秀 (Takedachi Masahide) (60452447)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	
研究分担者	村上 伸也 (Murakami Shinya) (70239490)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	山下 元三 (Yamashita Motozo) (90524984)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------