

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19651

研究課題名（和文）iPS創薬とゲノム創薬の融合による歯根膜幹細胞賦活化物質の創出と再生医療への応用

研究課題名（英文）Generation of a compound that has the potential to induce the formation of PDLSCs using iPS- and genome-based drug discovery technology.

研究代表者

友清 淳（Atsushi, Tomokiyo）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20507777

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではiPS細胞のゲノム解析結果を基に、歯周組織に存在する神経堤細胞(NC)を賦活化し、歯周組織の再生に重要な役割を果たす歯根膜幹細胞(PDLSCs)へと分化誘導する低分子化合物の創出を目的とし、研究を遂行した。本研究結果から、低分子化合物Xおよび歯根膜細胞由来細胞外器質存在下で培養したヒトNC細胞株において、歯根膜細胞関連遺伝子であるCOL-1, OPN, FBN1, およびPOSTNの発現が上昇することが明らかとなった。本研究より、低分子化合物Xが、NCを賦活化しPDLSCsへの分化を誘導する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

現在までに歯周組織再生療法に用いられる薬剤として、いくつかのタンパク製剤が知られているが、それらは高価であり、またロット間でのばらつきも指摘されている。そこで申請者が本研究にて着目したCompoundXは低分子化合物であることから、人工的に大量生産が可能であり、また科学的修飾により安定性や安全性を高めることができる。したがって、本研究結果は、現在用いられている歯周組織再生療法薬にとってかわる可能性を有していることから、本研究の持つ社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Periodontal ligament stem cells (PDLSCs) are known to be of great importance in the regeneration of periodontal tissues, however they are extremely rare population. Our research aim is developing a compound that induces the differentiation of neural crest cells (NC) to PDLSCs. Our recent study demonstrated that human NC line cultured with periodontal ligament cell-derived extra cellular matrix and the compound X increased the expression of periodontal ligament-related genes, such as COL-1, OPN, FBN1, and POSTN. Our study suggested that the compound X would have the potential to induce the differentiation of NC into PDLSCs and it may become a new medicine for the regeneration of destructed periodontal tissues.

研究分野：歯周組織再生医療

キーワード：歯周組織再生 歯根膜幹細胞 神経堤細胞 低分子化合物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯は歯槽骨、セメント質、歯肉および歯根膜組織 (PDL) で構成される歯周組織によって支持されている。歯周病による歯周組織の破壊は歯の動揺や疼痛を引き起こし、重度の場合には抜歯が選択されることから、歯周病は長きに渡り日本人の抜歯原因の一位である。したがって、歯周病により破壊された歯周組織の再生は、残存歯数の増加による審美性および咀嚼機能の維持を介して、歯周病患者の QOL 向上へ繋がることが予想される。また歯周病の罹患率は、先進国において約 34% であるのに対し、発展途上国では約 70% となっている。そのため、世界規模での歯周病患者の歯周組織再生を実現するためには、発展途上国のような、歯科医療設備が十分整っていない環境下でも実施可能な治療法を開発する必要があった。

### 2. 研究の目的

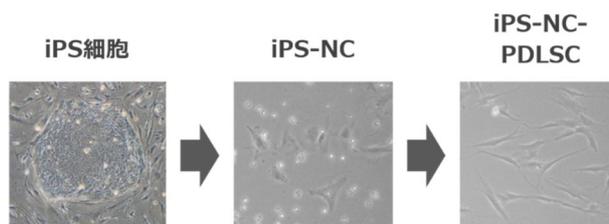
申請者らは、人工多能性幹細胞(iPS)から、神経堤細胞に類似した表現型を示す神経堤細胞様細胞(iPS-NC)を樹立し、さらに iPS-NC を、歯根膜細胞の表現型を有する歯根膜細胞様細胞(iPS-PDLSC)へと分化させる方法を確立している。本研究では、これらに応用した包括的な遺伝子解析を行い、神経堤細胞が歯根膜細胞へ分化する過程において、分化度に応じて発現上昇し、PDL 再生を誘導する遺伝子群の特定、およびそれらを標的とする化合物の合成を目的とした。

### 3. 研究の方法

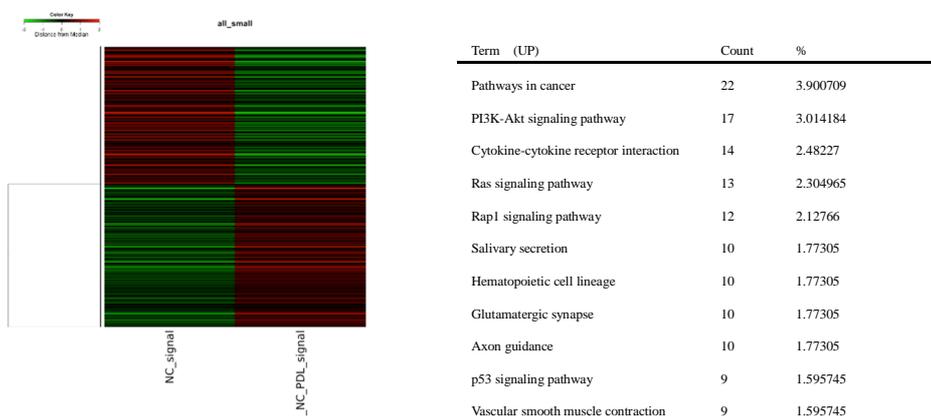
iPS-NC および iPS-PDLSC を用いて、神経堤細胞が歯根膜細胞へ分化する過程で、分化段階に応じて発現上昇する遺伝子群について検索を行った。またヒト神経堤細胞株(SK-N-SH) を使用し、これらに iPS-NC と同様の分化誘導を行い、誘導後にこれらの遺伝子群が変動するかを検討した。さらにこれらの遺伝子群を標的とする化合物を SK-N-SH へ添加し、この化合物が PDLSC への分化誘導促進効果を示すかについて検証した。

### 4. 研究成果

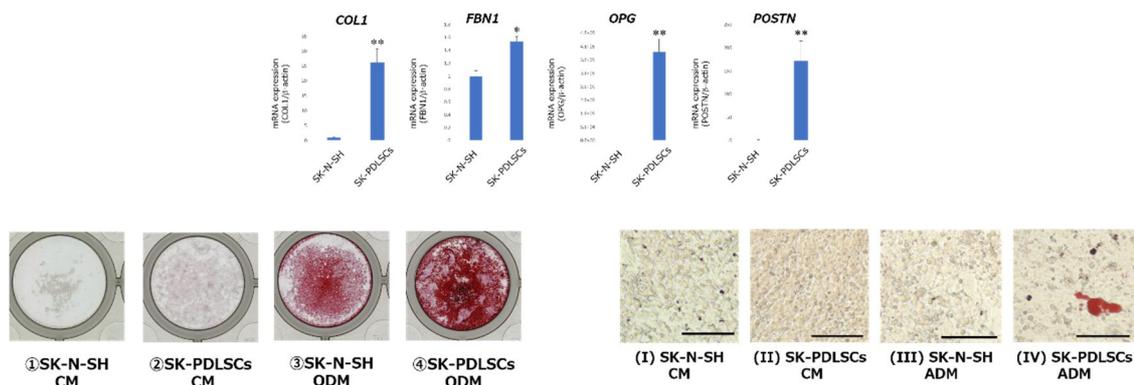
まず、申請者らがこれまでに樹立した iPS-NC および iPS-PDLSC を用い(下図)、マイクロアレイ解析およびパスウェイ解析を行った。



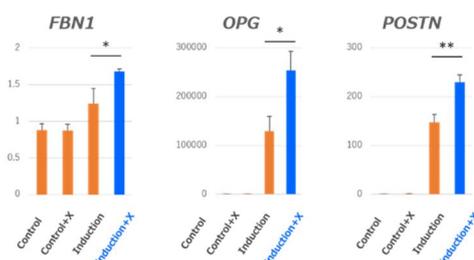
この結果から、iPS-NC が iPS-PDLSC へと分化する際に、ある遺伝子ファミリーにおいて複数の遺伝子が発動することを明らかにした (下図)。



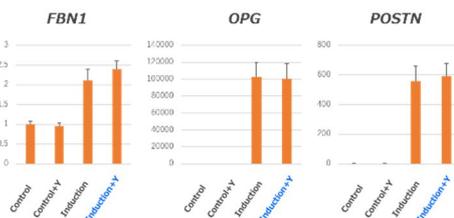
一方、iPS 細胞から iPS-NC への分化誘導には 2 週間を有し、また iPS 細胞の維持には高価な培地等が必要となる。そこで申請者らは、ヒト神経堤細胞株である SK-N-SH を実験に使用することを計画した。SK-N-SH を iPS-NC と同様の方法を用いてヒト歯根膜細胞へと分化誘導したところ、歯根膜関連遺伝子の上昇を認め、さらに脂肪および骨芽細胞へと分化誘導された(下図)。この結果から、SK-N-SH を本実験モデルに使用することができると判断した。



さらに、この遺伝子ファミリーを標的とする低分子化合物 (CompoundX) を SK-N-SH へ添加し、PDL への分化誘導を行ったところ、非添加群と比較して、歯根膜細胞関連遺伝子である FBN1, OPG および POSTN の発現が上昇することを明らかにした (下図)。



興味深いことに、CompoundX と同様の標的を持つ低分子化合物(CompoundY)を SK-N-SH へ添加し、PDL への分化誘導を行ったところ、CompoundX と異なり、歯根膜細胞関連遺伝子である FBN1, OPG および POSTN の発現に変化は認められなかった (下図)。



以上の結果より、iPS-NC および iPS-PDLSC を用いた遺伝子解析の結果から、神経堤細胞から歯根膜幹細胞への分化に重要な役割を果たす遺伝子群を同定することに成功した。またこの遺伝子群を標的とする低分子化合物 CompoundX が、神経堤細胞から歯根膜幹細胞への分化を促進する効果を示すことが明らかとなった。一方で、同じ遺伝子群を標的とする低分子化合物 CompoundY は歯根膜幹細胞への分化誘導をしめさなかったことから、この遺伝子群を標的とするすべての低分子化合物が歯根膜幹細胞分化誘導能を示すわけではないことが示唆された。

今後、本研究の結果を基に、CompoundX をリード化合物として最適化を行うと共に、SK-N-SH だけでなく iPS-NC を使用した評価を進める予定である。さらに in vivo 実験として、歯周病モデルマウスを使用し、最適化後の低分子化合物に対する再生能評価および毒性評価を行い、歯周病治療薬として臨床応用できる可能性について検討していく計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujino Shoko, Hamano Sayuri, Tomokiyo Atsushi, Itoyama Tomohiro, Hasegawa Daigaku, Sugii Hideki, Yoshida Shinichiro, Washio Ayako, Nozu Aoi, Ono Taiga, Wada Naohisa, Kitamura Chiaki, Maeda Hidefumi	4. 巻 235
2. 論文標題 Expression and function of dopamine in odontoblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 4376 ~ 4387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.29314	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 Tomokiyo Atsushi, Wada Naohisa, Maeda Hidefumi	4. 巻 28
2. 論文標題 Periodontal Ligament Stem Cells: Regenerative Potency in Periodontium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 974 ~ 985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2019.0031	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 Arima Mai, Hasegawa Daigaku, Yoshida Shinichiro, Mitarai Hiromi, Tomokiyo Atsushi, Hamano Sayuri, Sugii Hideki, Wada Naohisa, Maeda Hidefumi	4. 巻 54
2. 論文標題 R-spondin 2 promotes osteoblastic differentiation of immature human periodontal ligament cells through the Wnt/ -catenin signaling pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 143 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12611	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 Tomokiyo A, Yoshida S, Hamano S, Hasegawa D, Sugii H, Maeda H.	4. 巻 26
2. 論文標題 Detection, Characterization, and Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells in Periodontal Ligament Tissue.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells Int.	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/5450768	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Aoi Nozu, Sayuri Hamano, Atsushi Tomokiyo, Daigaku Hasegawa, Shinichiro Yoshida, Hideki Sugii, Hiromi Mitarai, Keita Ipposhi, Naohisa Wada, Hidefumi Maeda.
2. 発表標題 Effects of TNF- $\alpha$ on Senescent human dental pulp cells.
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center Joint International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shoko Fujino, Hamano Sayuri, Atsushi Tomokiyo, Daigaku Hasegawa, Shinichiro Yoshida, Hideki Sugii, Ayako Washio, Hiromi Mitarai, Naohisa Wada, Chiaki Kitamura, Hidefumi Maeda.
2. 発表標題 Effects of dopamine on odontoblastic differentiation through PKA signaling.
3. 学会等名 The 97th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉井英樹、友清淳、濱野さゆり、長谷川大学、吉田晋一郎、Mhd Safwan Albougha、前田英史
2. 発表標題 Activin Aが有する二極性の細胞分化誘導能に関する分子機構の解明.
3. 学会等名 日本歯科保存学会2019年度春季学術大会.
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 友清 淳	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 532-537
3. 書名 Precision Medicine.	

1. 著者名 友清 淳	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 1373-1377
3. 書名 BIO Clinica.	

〔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	前田 英史  (Maeda Hidefumi)  (10284514)	九州大学・歯学研究院・教授   (17102)	
研究分担者	長谷川 大学  (Hasegawa Daigaku)  (20757992)	九州大学・大学病院・助教   (17102)	
研究分担者	吉田 晋一郎  (Yoshida Shinichirou)  (30778866)	九州大学・大学病院・助教   (17102)	
研究分担者	濱野 さゆり  (Hamano Sayuri)  (40757978)	九州大学・歯学研究院・助教   (17102)	
研究分担者	和田 尚久  (Wada Naohisa)  (60380466)	九州大学・大学病院・教授   (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	杉井 英樹  (Sugii Hideki)  (80802280)	九州大学・大学病院・助教    (17102)	

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