

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03832

研究課題名(和文) オミックス解析を用いた歯根膜発生機構の解明と幹細胞誘導型組織再生技術への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of periodontal ligament development using omics analysis and application to stem cell-induced tissue regeneration technology

研究代表者

和田 尚久 (Wada, Naohisa)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：60380466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯胚発生期に着目してオミックス解析により歯根膜発生・形成に重要な特異的因子を同定、機能解析することで歯根膜発生機構の一端を解明し、さらに歯根膜発生・形成に重要な同定因子を幹細胞分化制御候補因子として歯根膜細胞への分化誘導能について検討することを目的として研究を進めた。本研究により、歯胚発生期に着目してオミックス解析を行ったところ、歯乳頭と比較して歯小嚢に強発現する971遺伝子を見出した。その中から抽出したActa2, IGFBP3およびTmem100が各々、歯小嚢の分化組織である歯根膜組織の機能や分化能に重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々のQOLの維持のために、歯や歯周組織の維持法や再生治療法の開発は必要不可欠である。複雑な構造物である歯および歯周組織の再生治療には多面的な治療戦略が必要と考えられる。段階的、多角的に検証を行った本研究から得られた歯周組織の構成要素である歯根膜に特異的に発現している因子の機能解析結果は、歯周組織再生研究を展開するにあたって有益な情報を提供するもので、さらに汎用性の高い新規歯周組織の再生方法の開発につながっていくものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the tooth germ development, we performed omics analysis, which is a comprehensive analysis of genes, and found that 971 genes are abundantly expressed in the dental follicle tissue which is the source of the periodontal ligament tissue, a component of the periodontal tissue. Functional analysis of the extracted genes Acta2, IGFBP3, and Tmem100 revealed that each of them plays a role in the fibrous tissue function of the periodontal ligament tissue, the inflammation control function, and the bone formation function which is a differentiation potential.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯胚 歯根膜 歯小嚢

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、重度歯周病によって大きく喪失した歯根膜および歯槽骨を含む歯周組織に対する、より予知性の高い効率的な再生治療法の開発が待望されており多くの研究がなされている。しかしながら、確度の高い再生効果が得られる方法の確立にはいまだ至っていない。理由として、従来の治療法は主に残存歯周組織中の細胞を誘導する方法であるため歯周組織の重要な構成組織である歯根膜組織由来の幹細胞の不足が原因で、組織の再生あるいは形成が十分に得られないことや、主に硬組織である歯槽骨と線維成分が豊富で歯根と歯槽骨のアンカーとなる歯根膜組織という特徴の異なる組織を適切に再生させる方法が確立していないことなどが考えられる。このため、充分量の高品質な幹細胞を的確に分化制御し、デリバリーすることで歯周組織再生を促す方法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、まず、歯胚発生期の歯小嚢が歯根膜組織のオリジンであり歯根膜幹細胞が豊富であることに着目してオミックス解析により歯根膜発生・形成に重要な特異的因子を同定、機能解析することで歯根膜発生機構の一端を解明すること、さらに、歯根膜発生・形成に重要な同定因子を幹細胞分化制御候補因子として歯根膜細胞への分化誘導能について機能解析を行い、歯根膜組織再生のための幹細胞分化制御機構を解明することで、新たな幹細胞誘導型歯周組織再生方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 微量 RNA-seq 解析

胎生 18 日齢 C57BL/6J マウスの臼歯歯胚より、歯胚上皮組織、歯乳頭組織、歯小嚢組織を分離し、各組織の mRNA を回収した。各組織に特異的な遺伝子 (keratin および vimentin) の発現の検討により組織の isolation の確度が高いことを確認したのち、微量 RNA-seq にて発現遺伝子の網羅的解析を行った。

(2) 細胞培養

本研究では、ヒト歯髄幹細胞クローン (2-23 細胞)、ヒト歯根膜細胞株 (HPDLCs) および胎生 14 日齢マウス歯胚より樹立した間葉細胞株を用いた。

(3) 試薬

2-23 細胞および HPDLCs に対して rhTGF-beta1 にて刺激し、その影響を検討した。

(4) 各因子の発現解析法

マウス胎生期臼歯歯胚における insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) の局在は、免疫細胞化学的染色法にて観察した。歯根膜細胞における actin alpha 2, smooth muscle (Acta2)、IGFBP3、imprinted gene mesoderm-specific transcript (MEST) および 2 adrenergic receptor (β2-AR) の発現は RT-PCR 法および western blot 法にて解析した。

(5) siRNA 導入実験

siRNA により歯根膜細胞 (2-23 細胞および HPDLCs) における Acta2、IGFBP3、Smad3 および MEST 発現をノックダウンし、影響を検討した。

(6) 遺伝子導入実験

ベクターを用いて歯根膜細胞 (2-23 細胞) に MEST および β2-AR を導入し、影響を検討した。

(7) 細胞増殖実験および wound healing assay

細胞増殖実験：2-23 細胞を 48 ウェルプレートに播種後、3 日間培養し WST-1 アッセイにて細胞増殖率を測定した。加えて、定量的 RT-PCR 法を用いて細胞増殖関連遺伝子発現解析を行った。

wound healing assay：2-23 細胞を 12 ウェルプレートに播種後 24h に、培養細胞コロニー上に scratch-wound を付与し、6-10h 後の移動細胞割合を解析した。

(8) 細胞分化誘導実験

コラーゲン形成誘導実験：2-23 細胞を 24 ウェル細胞培養プレートに播種し、TGF-beta1 添加培地にて培養した。培養 5 日後に Picrosirius red 染色を行い、定量解析を行った。

骨芽細胞分化誘導 (石灰化誘導) 実験：各細胞クローンを 24 ウェル細胞培養プレートに播種し、石灰化誘導培地にて培養した。4 週間培養後 Alizarin Red S 染色を行い、また定量的 RT-PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行った。

(9) 歯胚器官培養

マウス胎生 15 日齢臼歯歯胚を器官培養し、**IGFBP3 siRNA** を 8 日間添加し、影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 微量 RNA-seq 解析結果

胎生 18 日齢マウス臼歯歯胚から、歯胚上皮組織、歯乳頭および歯小嚢を分離回収し、各組織における発現遺伝子の網羅的解析 (バルク RNA-seq 解析) を行った結果、歯乳頭と比較して歯小嚢に発現が高い 971 遺伝子が見出された。本遺伝子群から抽出した候補遺伝子について、歯胚上皮組織、歯乳頭および歯小嚢における発現を定量的 RT-PCR 法を用いて確認し、次にマウス歯胚発生過程における発現局在を観察したところ、**Acta2**、**IGFBP3** および **Tmem100** が歯小嚢組織に特異的に発現していた。本研究では、これらの遺伝子が歯根膜細胞において必須で重要な機能を有していると仮説を立て、機能解析を行った。

(2) 歯根膜における Acta2 の機能解析

細胞骨格を形成する isoform である **Acta2** は多くの細胞機能において重要な役割を果たしていることが知られているが、歯根膜組織における機能はいまだ不明である。本研究にて歯胚歯小嚢に高発現していたため、歯根膜細胞における機能を解析した。

HPDLCs および **2-23** 細胞において **Acta2 mRNA** およびタンパクの発現が観察された。**2-23** 細胞に対して **rhTGF-beta1** にて刺激したところ、歯根膜関連遺伝子 (**type1 collagen**, **periostin** および **fibrillin-1**) および **Acta2 mRNA** の発現が上昇し、また不溶性コラーゲン産生が増加した。一方で、**TGF-beta1** 刺激 **2-23** 細胞に対して **Acta2 siRNA** 導入により **Acta2** 発現を抑制させたところ、歯根膜関連遺伝子およびコラーゲン産生を強く抑制した。さらに、**Acta2** 発現抑制により、**TGF-beta** シグナリングに関与する **Smad2** および **Smad3** のリン酸化が有意に抑制された。以上により、歯根膜細胞に於いて **Acta2** は、**Smad2/3** リン酸化を介した歯根膜関連マーカーの発現とコラーゲン産生において重要な役割を担っていることが明らかになった。

(3) 歯胚発生と歯周組織リモデリングにおける IGFBP3 の機能解析

IGFBP3 は細胞増殖やアポトーシス制御など多くの細胞機能において重要な役割を果たしていることが知られているが、歯根膜組織における機能はいまだ不明である。本研究にて歯胚歯小嚢に高発現していたため、歯根膜細胞における機能を解析した。

胎生 14 日齢マウス歯胚の歯小嚢組織において、**IGFBP3** が強発現していることが観察された。**2-23** 細胞に対して **IGFBP3 siRNA** 導入により **IGFBP3** 発現を抑制させたところ、歯根膜関連遺伝子 (**fibrillin-1**, **type1 collagen**, **collagen3** および **Acta2**) の発現が減少していた。他に、走化性も減少し、細胞形態にも影響があった。一方で、**2-23** 細胞の細胞増殖については、**IGFBP3** 発現のノックダウンにより、増殖率、**Ki67** 陽性細胞数および **cyclin** の発現が上昇した。**TGF-beta1** 刺激 **2-23** 細胞に対して **IGFBP3 siRNA** 導入により **IGFBP3** 発現を抑制させたところ、歯根膜関連遺伝子およびコラーゲン産生を強く抑制した。更に、歯胚器官培養実験にて **IGFBP3 siRNA** 導入により **IGFBP3** 発現を抑制させたところ、歯根膜関連遺伝子 (**periostin**, **alkaline phosphatase** および **Acta2**) の発現が減少していた。以上により、歯根膜細胞に於いて **IGFBP3** は **TGF-beta1** 刺激による歯根膜関連マーカーの発現とコラーゲン産生において重要な役割を担っていることが明らかになった。加えて、炎症関連遺伝子の発現に対する影響を検討したところ、**IGFBP3** 発現のノックダウンにより、**IL-6**、**IL-8** および **toll like receptor4** の発現が上昇したことから、**IGFBP3** は歯根膜における炎症制御にも重要な機能を有する可能性が示唆された。

(4) 歯根膜における Tmem100 の機能解析

Tmem100 は様々な器官に発現しており、器官の発生や形態形成に関与していることが報告されている。本遺伝子は、本研究にて歯胚発生過程の歯小嚢に特異的に発現していたことから、歯根膜細胞における機能を解析した。

2-23 細胞における **Tmem100** 発現を免疫蛍光染色法にて検討したところ、細胞膜に局在していた。**HPDLCs** の骨芽細胞分化誘導を行ったところ、分化とともに **Tmem100** の発現が上昇した。以上より、**Tmem100** は歯根膜細胞の骨芽細胞分化に関与している可能性が示唆された。

(5) 歯根膜細胞におけるその他因子の機能解析

歯根膜細胞に発現している **MEST** について発現および機能を解析した。**MEST** は **2-23** 細胞に強発現していたため、**siRNA** にて発現を抑制したところ、間葉系幹細胞マーカー発現、細胞増殖率および多分化能が低下し、一方で **MEST** を遺伝子導入したところ、間葉系幹細胞マーカーおよび歯根膜関連遺伝子発現が増加した。以上より、**MEST** が歯根膜幹細胞の特性維持に関与している可能性が考えられた。また、**HPDLCs** における **β2-AR** についても検討したところ、

ストレッチ刺激に対して発現が増加し、 $\beta 2$ -**AR** を遺伝子導入したところ、歯根膜関連遺伝子の発現が上昇した。以上より、 $\beta 2$ -**AR** は歯根膜細胞の特性維持に参与している可能性が考えられた。

以上の結果より、歯根膜細胞は様々な特異的因子を発現しており、本研究により明らかになった各因子の機能を組み合わせていくことで、将来臨床応用実現可能な汎用性の高い新規歯周組織の再生方法の開発につながっていくものと期待される。

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 Fakatava N, Mitarai H, Yuda A, Haraguchi A, Wada H, Hasegawa D, Maeda H, Wada N.	4. 巻 18
2. 論文標題 Actin alpha 2, smooth muscle, a transforming growth factor- 1-induced factor, regulates collagen production in human periodontal ligament cells via Smad2/3 pathway.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Dent Sci.	6. 最初と最後の頁 567-576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jds.2022.08.030	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 Hasegawa Daigaku, Hasegawa Kana, Kaneko Hiroshi, Yoshida Shinichiro, Mitarai Hiromi, Arima Mai, Tomokiyo Atsushi, Hamano Sayuri, Sugii Hideki, Wada Naohisa, Kiyoshima Tamotsu, Maeda Hidefumi	4. 巻 2020
2. 論文標題 MEST Regulates the Stemness of Human Periodontal Ligament Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/9672673	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 Hamano Sayuri, Tomokiyo Atsushi, Hasegawa Daigaku, Yuda Asuka, Sugii Hideki, Yoshida Shinichiro, Mitarai Hiromi, Wada Naohisa, Maeda Hidefumi	4. 巻 121
2. 論文標題 Functions of beta2 adrenergic receptor in human periodontal ligament cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 4798~4808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.29706	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Naati Fakatava, 御手洗裕美, 祐田明香, 長谷川大学, 前田英史, 和田尚久
2. 発表標題 The role of ACTA2 in periodontal ligament cell stimulated with TGF- 1
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会（第152回）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 御手洗裕美、祐田明香、Naati Fakatava、長谷川大学、前田英史、和田尚久
2. 発表標題 TransgelinはIntegrinを介した細胞が基質への接着に関与する
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会（第152回）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王恕心、御手洗裕美、冉子晴、祐田明香、孫偉浩、原口晃、前田英史、和田尚久
2. 発表標題 IGFBP3は歯胚発生と歯周組織のリモデリングに関与する
3. 学会等名 日本歯科保存学会2023年度秋季学術大会（第159回）
4. 発表年 2023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	前田 英史 (Maeda Hidefumi) (10284514)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	友清 淳 (Tomokiyo Atsushi) (20507777)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	祐田 明香 (Yuda Asuka) (20814081)	九州大学・大学病院・助教 (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	藤井 慎介 (Fuji Shinsuke) (60452786)	九州大学・歯学研究院・講師 (17102)	
研究分担者	御手洗 裕美 (Mitarai Hiromi) (60801660)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	和田 裕子 (Wada Hiroko) (70380706)	九州大学・歯学研究院・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