

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10145

研究課題名(和文) 歯周病における転写因子mohawk homeobox(Mkx)の関与

研究課題名(英文) Functions of Mkx in periodontal ligament homeostasis

研究代表者

原田 浩之 (HARADA, HIROYUKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：40343149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Mkxの欠損が歯根膜細胞にどのような影響を及ぼすのか検討した。Mkx^{-/-} PDLにおいて骨化関連遺伝子の発現が間葉系細胞および骨芽細胞クラスターで上昇した。Mkx^{-/-} PDLのマクロファージクラスターでは、細胞数の増加と炎症性サイトカインなどの炎症関連因子の発現上昇がみられた。以上より、Mkxは骨化と炎症に関わる遺伝子の発現を制御することにより、PDLの恒常性維持を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以上の成果はMkxが歯周炎や骨性癒着に関与していることを示唆しており、Mkxの発現制御が歯周治療における新たな治療になりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to clarify the effects of a Mkx deficiency on PDL cellular heterogeneity and differences between gene expression in PDL tissues from wild-type (WT) and Mkx knockout rats using single-cell RNA sequencing. We identified 12 cell clusters comprising mesenchymal cells and macrophages. The expression of Mkx and scleraxis, was mutually exclusive, and partitioned mesenchymal cell clusters into Mkx and Scx types that dominantly expressed proteoglycans and elastic fibers, and type 1 and 3 collagen, respectively. Ossification-related genes were upregulated in mesenchymal cell and osteoblast clusters with more Mkx^{-/-} than Mkx^{+/+} PDLs. Increased number of cells and inflammatory mediators were observed in macrophage clusters of Mkx^{-/-} PDL. These results suggested that Mkx plays an important role in maintaining PDL homeostasis by regulating specific cell populations and gene expression.

研究分野：口腔外科学

キーワード：Mkx 歯根膜

1. 研究開始当初の背景

口腔内では、歯周組織の一つとして歯と歯槽骨をつなぎ、歯周組織の恒常性維持に重要な役割を果たしているのが歯根膜であることが知られている。歯根膜はセメント質と歯槽骨の間に介在する密な線維性結合組織である。主要な細胞成分は線維芽細胞であるが、その他の細胞として歯根表面にセメント芽細胞、上皮由来のマラッセの上皮遺残が、歯槽骨表面には骨芽細胞、破骨細胞が存在する。さらにマクロファージ、リンパ球、肥満細胞、血管周囲には未分化間葉系細胞も含まれる。

歯根膜を構成する線維芽細胞の70~80%は1型コラーゲンが占めており、そのほかには2型や3型など別タイプのコラーゲン、そのほかにペリオスチン、グリコプロテインなどの細胞外マトリックスタンパク質も含まれている。歯根膜は歯肉歯周組織に栄養を供給し、咀嚼のインプットを感知する上で、自己修復能力も有する。今まで歯根膜の発生、再生を司る転写因子は不明であったが、我々はその転写因子 *mohawk homeobox (Mkx)* の同定に成功した。Mkx は、マウスの腱に発現し、1型コラーゲンの変性を制御することでその恒常性を維持するために必要なマスター転写因子であることを明らかにしたが、その後 Mkx が歯根膜にも発現し、その構成のほとんどを占める1型コラーゲン線維の変性を調整することも明らかになった。さらに歯根膜では腱よりも発現量が著しく多いことが qPCR 分析によって分かった。そこで Mkx ノックアウトマウスを作製し、加齢による歯根膜変化を野生型と比較したところ、10週齢では変化がないものの、6か月齢および12か月齢では野生型に比べ Mkx ノックアウトマウスのほうでは歯根膜幅が明らかに拡大し(図2)、線維芽細胞の紡錘形が消失し骨細胞に似た形になり、コラーゲン線維束の断面が粗造で不明瞭になっていた。さらに mRNA の解析からエイジングに伴う退化が加速していることが報告されている(Koda Development 2017)。これらの結果から、Mkx は歯根膜において、コラーゲン線維の強度を維持し、老化に伴う衰弱の進行を減速させる重要な役割を果たしていると言える。

2. 研究の目的

歯周病とは、歯周組織に発症し、歯周組織を破壊する疾患の総称である。通常、臨床において多く遭遇する疾患としては歯肉炎、歯周炎がある。

歯肉炎・歯周炎は、歯頸部に付着する細菌性プラークにより引き起こされる慢性炎症であり、歯肉炎は歯肉に限局し、付着の喪失や歯槽骨吸収を伴わないのに対し、歯周炎は歯肉、セメント質、歯根膜、歯槽骨まで炎症が波及し歯槽骨吸収が生じる。歯根膜のバリアが破壊されると歯と歯槽骨の緊密な結び付きがなくなり、歯槽骨の吸収や歯牙の動揺が起きてしまう。

歯周炎と全身疾患とは密接な関連があり、全身疾患が歯周炎を進行させることが明らかになっているが、近年では歯周炎が全身疾患の進行を促進することも多く報告されている。心筋梗塞などの心血管系疾患、誤嚥性肺炎、低体重児出産・早産、糖尿病などが挙げられており、歯周炎は、口腔領域ばかりでなく全身をも脅かす可能性が指摘されている。

そこで、歯根膜に多く存在し、その恒常性維持に寄与していることが分かっている Mkx は歯周病の病態進行において制御的機能をもつのではないかと予想する。Mkx をノックアウトさせることによって、歯周病の進行機序、野生型との比較における差異を調べると同時に、Mkx がノックアウトしていない野生型では歯周病を誘発した際に Mkx 発現量の変化を解析することにした。歯周病予防における Mkx の機能を明らかにすることが今後の歯周病の予防および治療においても大きな意味をもつ。

本グループでは Mkx ノックアウトマウスとラットの両方の作製に成功しているが、体がより大型であるラットは歯周病を再現しやすく、マウスでは十分にできなかった病理的、生理的研究において好ましいため本実験ではラットを用いることとしている。また先行研究では Mkx ノックアウトラットのアキレス腱においてマウスよりさらに顕著な表現型を呈することがわかっており、口腔領域での表現型も期待される。

3. 研究の方法

Mkx^{+/+}および *Mkx*^{-/-}ラットのそれぞれ両側上下顎から合計12本の臼歯を採取した。抜歯した臼歯をコラゲナーゼ処理し、デブリスを70 μ mのフィルターで除去した後、PIおよびHoechst 33342で染色し、MoFlo XDPを用いてPI陰性、Hoechst33342陽性の生細胞を単離した。Chromium Next GEM Single Cell 3' Library Kit v3を用いて、24,000個の単一細胞からライブラリーを構築し、HiSeq XシステムまたはNextSeq1000システムを用いて2x150 bpリードでシーケンスし、1サンプルあたり4~8億リードを生成した。データ解析はCell Ranger (v.6.1.1, 10x Genomics)、R (v.4.1.2)およびRパッケージSeurat (v.4.0.6)、Metascape、Pscanを用いて

解析した。

4 . 研究成果

Mkx^{+/+}および *Mkx*^{-/-}ラット由来の PDL を scRNA-Seq で解析した結果、周皮細胞、赤血球マクロファージ、骨芽細胞、および間葉系、上皮系、血管内皮系、神経細胞を含む細胞集団が同定された。クラスターC1、C2、C4、C6 は間葉系細胞 (mesenchymal stromal cells: MSCs) からなり、PDL で最大の集団であった (C1_MSCs, C2_MSCs, C4_MSCs および C6_MSCs)。歯根膜の形成・維持に重要な転写因子である *Mkx* と *Scx* はすべての間葉系細胞クラスターで発現が確認された。その中でも *Mkx* と *Scx* を発現する細胞は、それぞれ C2 および C4_MSC クラスターに最も多く存在した。*Mkx* と *Scx* を同時に発現している細胞はわずかであったため、これらの発現は相互に排他的であると考えられた。*Mkx* を発現している細胞を多く含む C2_MSC において、*Mkx*^{+/+} と *Mkx*^{-/-} PDL で発現が上昇した遺伝子を解析したところ、多くが結合組織形成および骨格系形成に関与していた。

Mkx 発現細胞を多く含む C2_MSCs クラスターでは細胞外マトリックスやオキシタラン線維の生成に関わる遺伝子の発現が高く、*Scx* 発現細胞を多く含む C4_MSCs クラスターでは 1 型および 3 型コラーゲンやコラーゲンの成熟に関わる遺伝子の発現が高く、*Mkx* 発現細胞と *Scx* 発現細胞が歯根膜線維の形成において異なる役割を有することが示唆された。一方で、*Mkx*^{-/-}ラット C4_MSCs では *Scx* 陽性細胞が有意に増加し、骨化に関与する遺伝子の発現が低下していることから、*Mkx* の欠損は *Scx* を介して PDL の恒常性を維持する代償機構を促進することが示唆された。

クラスターC5 は骨芽細胞のクラスター (C5_osteoblasts [OBs]) であり、*Mkx*^{-/-}ラット PDL 由来の C5_OBs では、骨芽細胞の発生に関わる遺伝子の発現が増加していたことから *Mkx*^{-/-}ラット PDL において、歯槽骨の形成に関与する骨芽細胞の分化が促進されていることがわかった。C3 および C9 は上皮細胞クラスターであり、PDL で 2 番目に大きな細胞集団 (C3_Epi) および C9_Epi) であった。C3_Epi は *Odam* を豊富に発現し、C9_Epi は *Msx2* を豊富に発現しており、異なる機能を持つ上皮性細胞集団であることが示唆された。また、血管内皮細胞 (C8_Endo)、神経細胞 (C12_NC)、周皮細胞 (C10_Peri)、赤血球 (C11_Eryth) も確認された。マクロファージクラスター (C7_Mac) において *Mkx*^{-/-}ラット PDL は *Mkx*^{+/+}ラット PDL に比べて多くの細胞を含んでいた (883 細胞および 316 細胞)。*Mkx*^{-/-}ラット PDL マクロファージは *TNF* や *Nos2* などの炎症に関わる遺伝子の発現が上昇していた。さらに、マクロファージの強い炎症性遺伝子発現を裏付けるように、間葉系細胞においても炎症に関わる遺伝子の発現が上昇していた。

これらの成果は *Mkx* が歯周炎や骨性癒着に関与していることを示唆しており、*Mkx* の発現制御が歯周治療における新たなアプローチ法となることが期待される。

5. 主な発表論文等

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

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Takada Kaho, Chiba Tomoki, Miyazaki Takayuki, Yagasaki Lisa, Nakamichi Ryo, Iwata Takanori, Moriyama Keiji, Harada Hiroyuki, Asahara Hiroshi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Single Cell RNA Sequencing Reveals Critical Functions of Mxk in Periodontal Ligament Homeostasis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology | 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） 10.3389/fcell.2022.795441 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 千葉朋希、高田嘉宝、宮崎貴行、中道亮、栗本遼太、松島隆英、原田浩之、浅原弘嗣。 |
| 2. 発表標題 RNA シーケンスによるMxk ノックアウトラット歯根膜組織の解析 |
| 3. 学会等名 第8回JCR ベーシックリサーチカンファレンス2021.11.05 |
| 4. 発表年 2021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 | 青木 章 (AOKI AKIRA) (30302889) | 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602) | |
| 研究分担者 | 浅原 弘嗣 (ASAHARA HIROTUGU) (70294460) | 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|