

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19002

研究課題名(和文) 歯根膜幹細胞転換を基盤とした歯周組織再生の有用性の検討とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Evaluation of periodontal tissue regeneration based on the conversion of periodontal ligament cells into stem cells and elucidation of its mechanism

研究代表者

長谷川 大学 (Hasegawa, Daigaku)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20757992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、MESTの高発現に伴い誘導されたヒト歯根膜幹細胞様細胞が、マウス生体内において、骨および歯根膜様組織を形成することが明らかになった。また、MESTの遺伝子導入により誘導されたヒト歯根膜幹細胞様細胞を用いたcDNAマイクロアレイ解析の結果、この歯根膜幹細胞転換には、PITX2やHOXD8といった転写因子、ならびにWntシグナルが関与する可能性が示唆された。

以上の知見から、本研究が今後、より効果的な歯根膜幹細胞転換法の確立、およびこの幹細胞転換法を用いた新たな歯周組織再生法の開発へと繋がることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、幹細胞転換によって得られた歯根膜幹細胞の、生体内における組織再生能が明らかになり、歯根膜幹細胞転換の臨床応用に対する有用性を評価することができた。また本研究では、歯根膜細胞の幹細胞転換メカニズムの一端が明らかとなったことにより、歯根膜幹細胞を用いた歯周組織再生治療法の開発における課題であった、歯根膜幹細胞の大量確保に対し、ブレイクスルーになりうる新たな知見を見出すことができた。

したがって、本研究の成果は、歯根膜幹細胞転換を用いた歯周組織再生治療法の開発を実現へと近づけるものであり、超高齢社会を抱える我が国の口腔保健衛生向上の一助となりうる意義高いものになると考えられる。

研究成果の概要(英文)： In this study, it was found that human periodontal ligament stem cells-like cells (HPDLSCs) induced by high expression of MEST form the alveolar bone and periodontal ligament-like tissues in mice. Moreover, the cDNA microarray analysis using HPDLSCs induced by overexpression of MEST suggested that transcription factors such as PITX2 or HOXD8 and Wnt signaling pathway may be involved in the conversion into HPDLSCs.

These findings may lead to the establishment of a more effective method of conversion into HPDLSC and the development of a novel periodontal tissue regeneration therapy using this method.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯根膜細胞 幹細胞転換 MEST 歯周組織再生 PITX2 HOXD8 Wntシグナル

## 1. 研究開始当初の背景

重度のう蝕や歯周病によって歯周組織が大きく傷害された場合、組織の修復・再生が困難となり、治癒に至らず抜歯となるケースが少なくない。そのため、不可逆的に喪失した歯周組織を積極的かつ効率的に修復・再生する治療法の開発が待望されている。歯周組織は歯肉、セメント質、歯槽骨、および歯根膜組織により構成されており、その中でも歯根膜組織は歯の植立に重要な組織である。近年、この歯根膜組織において、骨芽細胞、脂肪細胞および軟骨細胞への分化といった多分化能を有する未分化な細胞(歯根膜幹細胞)が存在し、歯周組織再生の有用なツールになることが報告された(Seo et al., 2004)。この報告を皮切りに、世界中で歯根膜幹細胞に関する研究が進められ、最近では、筋、神経、血管、さらには網膜、脾臓、腱・靭帯など全身の様々な組織細胞への分化が可能であると報告され(Techawattanawisal et al., 2007 他) その汎用性はますます拡大している。

申請者らは過去に、未分化なヒト歯根膜細胞株(ヒト歯根膜幹細胞株)を樹立し、この細胞がマウス生体内において骨および歯根膜様組織形成能を有していることを示した(Fujii et al., 2008)。また別の研究では、歯根膜幹細胞が免疫抑制能を有することを見出した(Wada et al., 2009)。これらの結果から、破壊された歯周組織の再生における移植細胞源として歯根膜幹細胞が有用であることを明らかにしてきた。しかしながら、臨床応用を想定した場合、患者自身の抜去歯から採取した歯根膜組織より分離できる幹細胞の数は極めて少ないため、十分な数の幹細胞を獲得することが困難である。そのため、歯根膜幹細胞を用いた歯周組織再生治療法は未だ実用化されていない。この問題に対し、申請者らは最近、iPS細胞から歯根膜幹細胞を誘導する方法を確立する(Hamano et al., 2018)など、歯根膜幹細胞を大量に獲得する方法の確立を企図し研究を進めてきた。しかしながら、これまでの方法は、誘導に時間を要することなどの課題もあった。

そこで、申請者は最近、歯根膜幹細胞を誘導する新たな戦略として、歯根膜幹細胞に高発現する因子を同定し遺伝子導入することで歯根膜幹細胞を誘導することを発案した。研究を進めた結果、歯根膜幹細胞に高発現する因子として mesoderm-specific transcript (MEST) を同定し、さらに、多分化能を有さないヒト歯根膜細胞株に MEST 遺伝子を導入することで、多分化能を有する幹細胞様の細胞に転換させることに成功した(Hasegawa et al., 2020)。この方法は、成長因子など様々な液性因子を用いずに単一の遺伝子の導入のみで効率的に歯根膜幹細胞の誘導を行うという過去に報告のない画期的なものであり、歯周組織再生治療法の開発研究における新たな選択肢となることが期待できる。一方で、この細胞の生体内における組織再生能や、この転換のメカニズムについては未だ明らかにできていない。臨床応用を想定した場合、組織再生に有効な歯根膜幹細胞を安定して獲得および供給を行うためには、これらの詳細な検討が必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では、MEST の導入により得られたヒト歯根膜幹細胞様細胞における歯周組織再生能を動物実験モデルにより検討すること、また、この歯根膜幹細胞転換を制御する転写因子やシグナル経路を明らかにし、歯根膜幹細胞転換のメカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) MEST により誘導されたヒト歯根膜幹細胞における歯周組織再生能の検討

MEST により誘導されたヒト歯根膜幹細胞における歯周組織再生能について検討するため、本研究室で既に確立されているマウス背部皮下細胞移植モデルを用いた。MEST 導入ヒト歯根膜細胞株(2-52\_MEST)をスキャフォールド( $\beta$ -TCP)とともに SCID マウス背部皮下に移植(対照群にはコントロールベクター導入ヒト歯根膜細胞株(2-52\_empty)を用いた)し、4週間後に移植片を摘出した。そして、骨および歯根膜様組織形成の解析として、ヘマトキシリン・エオジン染色およびマッソン・トリクローム染色を行った。

### (2) MEST 高発現ヒト歯根膜幹細胞における歯周組織再生能の検討

我々は、当研究室にて確立した方法により、iPS細胞からヒト歯根膜幹細胞様細胞を誘導し(Hamano et al., 2018) さらにその細胞が MEST を高発現することを明らかにしている(未発表)。そこで、この細胞を用いて、実験(1)と同様にマウス背部皮下細胞移植モデルにより歯周組織再生能について検討した。

### (3) ヒト歯根膜細胞の幹細胞転換を制御する因子の同定

MEST による歯根膜細胞の幹細胞転換メカニズムを解明するため、cDNA マイクロアレイ解析法を用いて、この幹細胞転換を制御する転写因子を同定することとした。まず、2-52\_MEST および 2-52\_empty を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行い、2-52\_MEST において高発現する転写因子を複数同定した。次に、これらの因子の siRNA を用いて、2-52\_MEST における幹細胞特性への影

響について以下の方法で評価した。

- (a) 多分化能解析...分化アッセイ系(骨芽細胞、脂肪細胞、および軟骨細胞分化)の誘導培地を用いて各細胞を一定期間培養後、石灰化物、脂肪滴、および軟骨基質形成能について、各種染色法にて検討する。
- (b) 幹細胞マーカー発現解析...各細胞における間葉系幹細胞マーカー(N-cadherin、CD146、および p75NTR)の発現について、RT-PCR 法またはフローサイトメトリー分析法にて検討する。

#### (4) ヒト歯根膜細胞の幹細胞転換を制御するシグナル経路の同定

MEST による歯根膜細胞の幹細胞転換メカニズムを解明するため、cDNA マイクロアレイ解析法、および siRNA を用いたノックダウンアッセイを用いて、この幹細胞転換を制御するシグナル経路を同定することとした。まず、実験(3)と同様、2-52\_MEST および 2-52\_empty を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行い、2-52\_MEST において高発現するシグナル関連因子を複数同定した。次に、実験(3)で同定した転写因子の siRNA を 2-52\_MEST に導入し、これらのシグナル関連因子の発現への影響について、RT-PCR 法にて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) MEST により誘導されたヒト歯根膜幹細胞における歯周組織再生能の検討

マウス背部皮下細胞移植モデルにより、2-52\_MEST における骨および歯根膜様組織形成能を評価した結果、コントロール群と比較して、明らかな組織形成物は認められなかった。その原因として、MEST 遺伝子導入による MEST 過剰発現のレベルが不十分であり、in vivo における組織形成に十分なだけの幹細胞特性(分化能)を有していない可能性が考えられた。

#### (2) MEST 高発現ヒト歯根膜幹細胞における歯周組織再生能の検討

実験(1)の結果を受けて、我々は、当研究室にて確立した方法により、iPS 細胞から、MEST をより高発現するヒト歯根膜幹細胞様細胞を誘導し、その歯周組織再生能を検討した。その結果、この細胞を移植した群において、エオジン好染の骨様組織、およびマッソン・トリクローム好染の歯根膜様組織の形成を認めた。このことから、MEST の高発現に伴い誘導されたヒト歯根膜幹細胞は、歯槽骨や歯根膜などの歯周組織再生に有用である可能性が示された。

#### (3) ヒト歯根膜細胞の幹細胞転換を制御する転写因子の同定

2-52\_MEST および 2-52\_empty を用いた cDNA マイクロアレイ解析の結果、2-52\_MEST において PITX2 や HOXD8 といった転写因子の発現が上昇していることが明らかになった。次に、これらの因子の siRNA を用いて、2-52\_MEST における PITX2 あるいは HOXD8 の発現をノックダウンさせたところ、2-52\_MEST における多分化能(石灰化物、脂肪滴、および軟骨基質形成能) および幹細胞マーカー発現(N-cadherin、CD146、および p75NTR)が低下した。以上のことから、歯根膜細胞の幹細胞転換に PITX2 や HOXD8 が関与することが示唆された。

#### (4) ヒト歯根膜細胞の幹細胞転換を制御するシグナル経路の同定

2-52\_MEST および 2-52\_empty を用いた cDNA マイクロアレイ解析の結果、2-52\_MEST において Frizzled4 (Fzd4)、Ror1、および Ror2 といった Wnt シグナルレセプターの発現が上昇していることが明らかになった。さらに、実験(2)で同定した幹細胞転換関連因子 PITX2 および HOXD8 を siRNA によりノックダウンした 2-52\_MEST において、これらの Wnt シグナルレセプターの発現が低下していることが分かった。以上のことから、歯根膜細胞の幹細胞転換には Wnt シグナルが関与している可能性が示唆された。

MEST の遺伝子導入により誘導されたヒト歯根膜幹細胞は in vitro においては高い分化能を有するものの、in vivo においては組織形成に不十分であった。一方、より MEST が高発現しているヒト歯根膜幹細胞では in vivo においても組織形成が認められた。これらのことから、組織形成のためには、MEST をより高発現させる遺伝子導入法を用いた歯根膜幹細胞転換法の確立が必要と思われる。

また本研究により、MEST による歯根膜幹細胞転換は、PITX2 や HOXD8 といった転写因子の発現上昇を介して、Wnt シグナルが活性化することにより引き起こされていることが推察された。今後、これらの因子およびシグナルをターゲットに、より効果的な歯根膜幹細胞転換法の確立、およびこの幹細胞転換法を用いた歯周組織再生法の開発へと繋がることを期待している。

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 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Daigaku Hasegawa, Kana Hasegawa, Hiroshi Kaneko, Shinichiro Yoshida, Hiromi Mitarai, Mai Arima, Atsushi Tomokiyo, Sayuri Hamano, Hideki Sugii, Naohisa Wada, Tamotsu Kiyoshima, Hidefumi Maeda	4. 巻 -
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 -
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hidefumi Maeda	4. 巻 12(9)
2. 論文標題 Mass acquisition of human periodontal ligament stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Journal of Stem Cells	6. 最初と最後の頁 1023-1031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4252/wjsc.v12.i9.1023.	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 兼子大志、長谷川大学、糸山知宏、友清淳、濱野さゆり、吉田晋一郎、杉井英樹、前田英史
2. 発表標題 Non-canonical Wntシグナル経路の阻害が未分化なヒト歯根膜細胞株の骨芽細胞様分化に及ぼす影響
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉浦梨紗、濱野さゆり、友清淳、長谷川大学、吉田晋一郎、杉井英樹、前田英史
2. 発表標題 iPS細胞から歯根膜幹細胞様細胞への分化誘導能を有する転写因子の同定
3. 学会等名 第153回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------