

令和 3 年 5 月 25 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：19K19031

研究課題名（和文）iPS細胞と歯根膜幹細胞誘導因子FBN2を融合させた革新的歯周組織再生療法の創出

研究課題名（英文）Creation of innovative periodontal tissue regeneration therapy by using iPS cells and periodontal ligament stem cell inducer FBN2

研究代表者

濱野 さゆり（Hamano, Sayuri）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40757978

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）：歯根膜幹細胞は、歯周組織再生において中心的役割を果たすが、それらは希少な細胞集団であるため、臨床応用が難しい。

申請者はiPS細胞に着目し、ヒト歯根膜細胞（HPDLC）の細胞外基質（ECM）を用いることで、iPS細胞を歯根膜幹細胞様細胞へ分化誘導することに成功した。一方で、この方法は、感染等の問題を含んでおり臨床への応用が困難である。そこで申請者は、HPDLCに由来するECMの網羅的解析を行い、歯根膜幹細胞誘導因子の有力な候補としてFBN2に着目した。本研究では、FBN2を用いてiPS細胞から安全に歯根膜幹細胞様細胞を分化誘導することを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者はまずFBN2のベクター作製に着手したが、発現ベクターの作製が困難であったため、リコンビナントタンパクを用いてFBN2の歯根膜幹細胞誘導能について検討した。その結果、FBN2単独ではiPS細胞から歯根膜幹細胞様細胞への分化誘導能は困難であることが明らかとなった。このことから、FBN2は他のECMと結合して歯根膜幹細胞への分化を促進することが示唆された。

今後は、FBN2と結合して歯根膜幹細胞への分化誘導を促す因子を同定する計画である。

研究成果の概要（英文）：Periodontal ligament stem cells play a important role in periodontal tissue regeneration. However, they are difficult to apply clinically, since these cells that are rare.

We focused on iPS cells and succeeded in inducing differentiation of iPS cells into periodontal ligament stem cell-like cells by using the extracellular matrix (ECM) of human periodontal ligament cells (HPDLC). On the other hand, this method includes problems such as infection and is difficult to apply clinically. Therefore, we conducted a comprehensive analysis of HPDLC-derived ECM and focused on FBN2 as a periodontal ligament stem cell inducer. The purpose of this study was to safely differentiate iPS cells into periodontal ligament stem cell-like cells using FBN2.

研究分野：歯科保存学研究分野

キーワード：FBN2 歯根膜幹細胞様細胞 歯根膜幹細胞誘導因

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

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おいて主要な組織である。歯根膜組織中には幹細胞が存在し、この歯根膜幹細胞は、歯周組織の再生において中心的役割を持つ(Seo et al. 2004)。しかしながら、歯根膜組織から得られる幹細胞は0.07%と極めて少なく(Hidaka et al. 2012)、研究および臨床へ応用することが困難である。そのため、歯根膜幹細胞を簡便かつ多量に獲得する方法の確立が求められている。

iPS細胞は2006年にYamanakaらによって樹立された細胞であり、胚性幹細胞と同様に高い自己複製能と多分化能を示す(Takahashi et al. 2006)。またiPS細胞は、様々な体細胞から樹立可能であることから多量に入手することができ、さらに患者の体細胞から樹立したiPS細胞を自己移植することで、拒絶反応のリスクを低く抑えることができる(Takahashi et al. 2013)。そのため様々な分野において、iPS細胞を応用した再生療法の開発が進められているが、歯周組織における核心的な治療法は未だ開発されていない。申請者は既に、iPS細胞を歯根膜幹細胞の発生源である神経堤細胞へと分化させ(iPS-NC細胞)、初代ヒト歯根膜細胞(HPDLC)から得た細胞外基質(ECM)上にて培養することで、高い増殖能ならびに多分化能を有し、間葉系幹細胞マーカーおよび歯根膜細胞マーカーを高発現する歯根膜幹細胞様細胞へと分化誘導することに成功している(Hamano et al. 2018)。しかしながら、ヒト由来細胞のECMを用いて分化誘導した細胞を臨床応用する場合には、感染等が生じる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、HPDLCを必要とせず、安全にiPS-NC細胞から歯根膜幹細胞様細胞へと分化誘導する方法の確立を目的とした。

申請者は既に、ヒト皮膚線維芽細胞(SF)から得たECM上では、iPS-NC細胞が歯根膜幹細胞様細胞へと分化誘導されないことを明らかにしている。これらの結果を基に、HPDLCに由来するECM中に、歯根膜幹細胞様細胞へと分化誘導する因子(Factor-X)が含まれており、Factor-Xを用いて分化誘導した歯根膜幹細胞様細胞は、安全に臨床応用できるのではないかと考えに至った。そこで申請者は、HPDLCおよびSFにおける遺伝子の網羅的解析を行い、HPDLCに高発現している歯根膜幹細胞誘導因子の有力な候補としてFibrillin-2(FBN2)に着目した。本研究では、FBN2がiPS細胞由来の神経堤細胞(iPS-NC細胞)の歯根膜幹細胞分化に及ぼす影響について明らかにすることとした。

### 3. 研究の方法

歯根膜幹細胞様細胞への分化誘導能を示さない細胞へのFBN2遺伝子導入

申請者は既に、SF由来ECM上にてiPS-NC細胞の培養を行っても、それらが歯根膜幹細胞様細胞へと分化誘導されないこと、およびSFではHPDLCと比較してFBN2の遺伝子発現が低いことを明らかにしている。そこで、SFにFBN2遺伝子の発現ベクターを導入し、FBN2遺伝子を強発現する細胞(SF-FBN2)を作製する。次にiPS-NC細胞を、(i)SF-FBN2由来ECM、(ii)SF由来ECM(Negative control)、および(iii)HPDLC由来ECM(Positive control)の上に播種する。2週間後に歯根膜幹細胞特性について解析を行い、各条件下で培養したiPS-NC細胞を比較することで、FBN2の遺伝子導入がiPS-NC細胞の歯根膜幹細胞様細胞へ及ぼす影響を明らかにすることとした。

rhFBN2によるiPS-NC細胞の歯根膜幹細胞様細胞分化誘導

FBN2のリコンビナントタンパク(rhFBN2)を用いて、細胞培養皿のコーティングを行う。その際、5 ug/mLのrhFBN2にてコーティングを行った報告(Brinckmann et al. 2010)を参考に、0.05~500 ug/mL程度の幅を持たせてコーティングを行い、その上にiPS-NC細胞を播種する。2週間培養後に、歯根膜幹細胞特性について比較検討を行い、rhFBN2コーティングが歯根膜幹細胞への分化誘導に及ぼす影響について検討した。

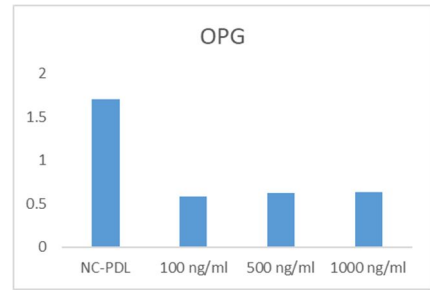
FBN2と結合するタンパクの同定

細胞が形成するECMには複数のタンパクが含まれており、それらは相互に作用することが報告されている(Ingham et al. 1990)。そこでHPDLCおよびSFを用いた遺伝子の網羅的解析の結果を基に、免疫沈降法を用いてFBN2と結合するタンパクを選出することを計画した。

### 4. 研究成果

### FBN2 タンパクが歯根膜幹細胞への分化誘導に及ぼす影響について

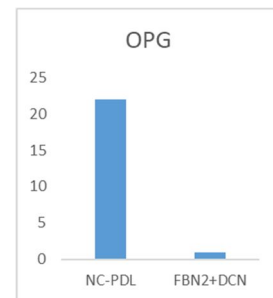
申請者はまず FBN2 のベクター作製に着手したが、FBN2 は CDS が約 9000bp と大きく、FBN2 タンパクが発現するベクターの作製が困難であった。そのため、次に 100 ng/ml ~ 1000 ng/ml の濃度に調整した rhFBN2 タンパク上にて iPS-NC 細胞を培養し、そこで得られた細胞の歯根膜幹細胞特性についての解析を行った。rhFBN2 を用いて分化誘導した細胞は、歯根膜幹細胞細胞 (NC-PDL 細胞) と比較して、歯根膜細胞マーカーの発現が上昇しないことが明らかとなった(右図)。このことから、FBN2 単独では iPS 細胞から歯根膜幹細胞様細胞への分化誘導が困難であることが示唆された。



FBN2 は他の ECM と結合して働く ECM として有名であるため、歯根膜幹細胞誘導能を持つ HPDLC の ECM 中において FBN2 と結合して働くタンパクを同定することとした。

### FBN2 と結合して働くタンパクの同定

歯根膜幹細胞様細胞への分化誘導能を持つ HPDLC の ECM 中から FBN2 と結合するタンパクを同定することとした。免疫沈降法を用いて FBN2 と結合したタンパクの同定を行ったが、HPDLC の ECM 中には FBN2 と結合するタンパクが少なく、MAS 解析にてその因子を特定することは困難であった。



また、免疫沈降法と並行して遺伝子間ネットワークの検索ソフトウェアである GeneMANIA を利用し、FBN2 と相互作用する因子として DCN を選出した。FBN2 と DCN を複合し、iPS-NC 細胞から歯根膜幹細胞様細胞の分化誘導を試みたが、目的とする細胞の分化誘導はできなかった(右図)。今後は、DCN 以外に選出した Matrilin-2 に着目して、同様の実験を行っていく予定である。

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 0件）

1. 著者名 Sayuri Hamano, Atsushi Tomokiyo, Daigaku Hasegawa, Asuka Yuda, Hideki Sugii, Shinichiro Yoshida, Hiromi Mitarai, Naohisa Wada, Hidefumi Maeda	4. 巻 inpress
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 inpress
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 -

1. 著者名 Shoko Fujino, Sayuri Hamano, Atsushi Tomokiyo, Tomohiro Itoyama, Daigaku Hasegawa, Hideki Sugii, Shinichiro Yoshida, Ayako Washio, Aoi Nozu, Taiga Ono, Naohisa Wada, Chiaki Kitamura, Hidefumi Maeda	4. 巻 235
2. 論文標題 Expression and function of dopamine in odontoblasts.	5. 発行年 2020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 -

〔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 濱野 さゆり
2. 発表標題 iPS細胞由来歯根膜幹細胞様細胞の樹立
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayuri Hamano
2. 発表標題 Establishing periodontal ligament stem cell-like cells derived from iPS cells
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center Joint International Symposium 2020
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
---------	---------