

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102  
 研究種目：若手研究  
 研究期間：2019～2021  
 課題番号：19K19032  
 研究課題名（和文）アンキローシス発生機序探索の鍵となる新規TGF- $\beta$ 1シグナル関連因子分子機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of TGF- $\beta$ 1 signal transduction molecular mechanisms towards to inhibit the ankylosis

研究代表者  
 御手洗 裕美（Mitarai, Hiromi）  
 九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60801660  
 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）：我々は、歯根膜細胞に発現が報告されている細胞骨格関連因子  $\alpha$ -SMAの機能解析と下流のシグナル解析を行った。siRNAを用いて  $\alpha$ -SMAをノックダウンさせた歯根膜細胞株2-23（2-23）を用いて解析を行ったところ、細胞増殖能・遊走能の減少、成長因子TGF- $\beta$ 1による歯根膜関連因子発現制御、ならびにTGF- $\beta$ 1シグナル制御に関与していることを明らかにした。本研究で得られた知見により、歯根膜細胞に発現する  $\alpha$ -SMAが歯根膜組織の機能維持に重要な働きを有し、これらを応用した新規歯周組織再生療法に繋がること期待されると考えられる。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

意図的再植後にアンキローシスが生じると、正常な歯根膜感覚が消失し、置換性吸収を引き起こす可能性がある。しかしながら、アンキローシスの発生はコントロール困難であると考えられており、予知性の高い治療への改善が必要とされている。本研究では、平滑筋細胞や創傷部など収縮性が高い組織に発現が報告されている  $\alpha$ -SMAが歯根膜組織に発現し、その下流で制御するシグナルを解析する。  $\alpha$ -SMA機能解析は咬合力緩衝機能を有する歯根膜組織再生に重要であり、今後の歯周組織再生療法への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated  $\alpha$ -SMA function, which is known to express in human PDL cells, and signaling pathway via TGF- $\beta$ 1. After ACTA2 knockdown using siRNA, in human PDL cell line 2-23, cell proliferation and migration were significantly downregulated. Also, after stimulating with TGF- $\beta$ 1, PDL-related gene expression, for example periostin and fibrillin1, was significantly downregulated compared with control cells. Collagen production was also significantly downregulated compared with control. From western blotting analysis, we revealed that  $\alpha$ -SMA knockdown significantly downregulated the phosphorylation of Smad2, Smad3 and YAP1. These results suggests that  $\alpha$ -SMA involved in the function of PDL tissue and might be able to apply for periodontal regeneration therapy.

研究分野：歯根膜組織再生

キーワード：歯根膜細胞  $\alpha$ -SMA TGF- $\beta$ 1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯根膜組織は歯根を覆うセメント質と歯槽骨をつなぐ結合組織で、歯根の支持、咬合力に対する緩衝作用、咬合時の感覚受容など、重要な機能を担っている。歯根膜組織には、様々な成長因子が存在し、歯根膜細胞に作用して発生や組織形成・維持、再生に関わっている。正常歯周組織における成長因子下流のシグナルを詳細に解明することは、歯周組織疾患発生機序の探索、治療法の開発にとって大変重要である。

申請者らのグループは、歯根膜組織に豊富に含まれる成長因子の一つである Transforming Growth Factor-1 (以下 TGF-1) が、歯根膜細胞の増殖ならびに歯根膜関連因子発現の促進に重要であることを明らかにしている (Fujii et al., Cell Tissue Res. 2010)。加えて、TGF-1 は歯根膜細胞の骨芽細胞分化に対して抑制的に働くことが報告されていることから (Kawahara T et al., Biomed Res. 2017)、TGF-1 シグナルは歯根膜組織構造の維持へ関与していると考えられる。-smooth muscle actin (以下 -SMA) は、血管平滑筋細胞への発現や、皮膚の創傷治癒にも関連することが報告されている (Tomasek JJ et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 2002)。申請者らは、TGF-1 によりヒト歯根膜細胞に発現する -SMA の発現を上昇させることを明らかにしている (Kono et al., Cell Tissue Res. 2013)。

また、過去に申請者らは、TGF-1 下流の -SMA 発現制御因子として、アクチン結合タンパク transgelin の可能性に着目している。transgelin は、正常なヒト歯根膜細胞の細胞質内に発現し、TGF-1 による発現上昇ならびに細胞増殖に関連することを申請者らが明らかにした因子であるが (Mitarai H et al., J Periodontal Res. 2017)、transgelin siRNA 導入ヒト歯根膜細胞に TGF-1 刺激を行ったところ、-SMA の遺伝子発現上昇が有意に低下し、また transgelin siRNA 導入ヒト歯根膜細胞において、TGF-1 刺激で上昇する細胞内シグナル因子 Smad2/3 のリン酸化が抑制されることを確認した。このことから、transgelin の下流に存在する -SMA が、ヒト歯根膜細胞における TGF-1 の機能に影響を及ぼす可能性が考えられる。

以上の背景から、我々は TGF-1 - transgelin -SMA のシグナルを明らかにすることで意図的再植後のアンキローシス (骨性癒着) 発生機序の解明に繋がるのではないかと考えた。しかしながら、歯根膜細胞における -SMA の機能は明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、アンキローシス発生機序を明らかにする糸口を探索するために、-SMA の機能解析、TGF-1 下流のシグナルへの関連について解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

当研究室にて樹立したヒト不死化歯根膜細胞から作製した約 80 種類のクローン (細胞株) から樹立したヒト歯根膜細胞株 2-23 を抽出し、今回の実験に用いた (Hasegawa et al., 2018)。すべての実験は九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認の下で行った。

#### (2) ヒト歯根膜細胞株 2-23 における -SMA の遺伝子ならびにタンパク発現解析

以下の方法で検討した。

- ・半定量的 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)
- ・定量的 RT-PCR 法
- ・ウエスタンブロット法
- ・免疫組織化学染色

#### (3) -SMA がヒト歯根膜細胞株 2-23 の各種機能に及ぼす影響

以下の方法で検討した。

- ・scratch wound healing assay による細胞遊走能の解析
- ・WST-1 proliferation assay による細胞増殖能の解析
- ・sircol collagen assay、picosirius red staining によるコラーゲン産生解析

#### (4) -SMA が TGF-1 によるヒト歯根膜細胞株の機能への関連解析

Control siRNA もしくは -SMA siRNA を導入したヒト歯根膜細胞株を 35mm dish に播種し、TGF-1 (10 ng/ml) 刺激を行った。24 時間後、歯根膜関連因子 (Collagen1A1, Periostin, Fibrillin-1) の発現解析を行った。また、各種細胞を 24well プレートに播種し、5 日間 TGF-1 刺激を行った後、コラーゲン産生解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) -SMA の発現解析

ラット歯根膜組織における -SMA の発現を解析するため、免疫組織化学染色を行ったところ、抗 -SMA 抗体に対する陽性反応が、歯根膜組織全体に観察された。

また、ヒト歯根膜細胞クローン 2-23 において、 $\alpha$ -SMA の mRNA 発現ならびにタンパク質の発現を解析し（ウエスタンブロット法ならびに蛍光免疫染色）、ヒト歯根膜細胞クローンは抗  $\alpha$ -SMA 抗体に陽性反応を示した。

(2)  $\alpha$ -SMA がヒト歯根膜細胞クローンの細胞増殖能および遊走能に及ぼす影響

$\alpha$ -SMA がヒト歯根膜細胞クローンの細胞増殖能に及ぼす影響を検討するため、細胞増殖実験（WST-1 assay）を行った。 $\alpha$ -SMA siRNA を導入したヒト歯根膜細胞クローンは、コントロール群と比較して細胞増殖率が有意に減少した。

$\alpha$ -SMA がヒト歯根膜細胞クローンの細胞遊走能に及ぼす影響を検討するため、細胞遊走実験（scratch wound healing assay）を行った。創傷ギャップ作製 10 時間後、 $\alpha$ -SMA siRNA を導入したヒト歯根膜細胞クローンは、コントロール群と比較して細胞遊走面積が有意に減少した。

(3)  $\alpha$ -SMA がヒト歯根膜細胞クローンの TGF- $\beta$ 1 による歯根膜関連因子発現ならびにコラーゲン産生能に及ぼす影響

$\alpha$ -SMA がヒト歯根膜細胞クローンの TGF- $\beta$ 1 による歯根膜関連因子発現に及ぼす影響について検討するため、 $\alpha$ -SMA siRNA を導入したヒト歯根膜細胞クローンに、10 ng/ml の TGF- $\beta$ 1 で細胞を 24 時間培養後、定量的 RT-PCR 法を行った。その結果、TGF- $\beta$ 1 刺激により発現が上昇する歯根膜関連因子の発現が、 $\alpha$ -SMA siRNA を導入したヒト歯根膜細胞クローンにおいて、コントロール群と比較して有意に減少した。また、 $\alpha$ -SMA がヒト歯根膜細胞クローンの TGF- $\beta$ 1 によるコラーゲン産生能に及ぼす影響について検討するため、 $\alpha$ -SMA siRNA を導入したヒト歯根膜細胞クローンに、10 ng/ml の TGF- $\beta$ 1 で細胞を 5 日間培養後、sircol collagen assay ならびに picrosirius red staining を行った。その結果、TGF- $\beta$ 1 刺激により有意に上昇するコラーゲン産生量が、 $\alpha$ -SMA siRNA を導入したヒト歯根膜細胞クローンにおいて、コントロール群と比較して有意に減少した。

(4)  $\alpha$ -SMA がヒト歯根膜細胞クローンにおけるシグナル因子に及ぼす影響

$\alpha$ -SMA がヒト歯根膜細胞クローンにおけるシグナル因子に及ぼす影響を解析するため、発現制御の可能性があるシグナル阻害薬を用いて、 $\alpha$ -SMA、transgelin の遺伝子の発現解析、ならびにコラーゲン産生能を解析した。その結果 ALK5 阻害剤によってこれらの遺伝子発現、コラーゲン産生が減少した。また、ALK5 の下流にある転写因子 Smad3 が、ヒト歯根膜細胞クローンの TGF- $\beta$ 1 によるコラーゲン産生能に及ぼす影響について検討するため、Smad3 siRNA を導入したヒト歯根膜細胞クローンに、10 ng/ml の TGF- $\beta$ 1 で細胞を 5 日間培養後、picrosirius red staining を行った。その結果、TGF- $\beta$ 1 刺激により有意に上昇するコラーゲン産生量が、Smad3 siRNA を導入したヒト歯根膜細胞クローンにおいて、コントロール群と比較して有意に減少した。このことから、TGF- $\beta$ 1 由来の ALK5 ならびに Smad3 を介したシグナルが、TGF- $\beta$ 1 によるコラーゲン産生能に関与している可能性が示唆された。そこで、ALK5 の下流の canonical なシグナル因子（Smad2/3）に及ぼす影響について解析を行った。 $\alpha$ -SMA が TGF- $\beta$ 1 下流のシグナル伝達に与える影響を解析するため、siRNA を用いて  $\alpha$ -SMA siRNA 導入ヒト歯根膜細胞クローンに TGF- $\beta$ 1 刺激を行い、Smad2、Smad3 のリン酸化の解析をウエスタンブロット法にて行った。その結果、 $\alpha$ -SMA のノックダウンが、transgelin と同様に TGF- $\beta$ 1 による Smad2、Smad3 のリン酸化を抑制することが明らかとなった。さらに、non-canonical なシグナル因子の 1 つである YAP1 に着目し、

$\alpha$ -SMA が TGF- $\beta$ 1 下流の YAP シグナル伝達に与える影響を解析するため、siRNA を用いて  $\alpha$ -SMA siRNA 導入ヒト歯根膜細胞クローンに TGF- $\beta$ 1 刺激を行い、YAP1 のリン酸化の解析をウエスタンブロット法にて行った。その結果、 $\alpha$ -SMA のノックダウンが、TGF- $\beta$ 1 による YAP1 のリン酸化を促進することが明らかとなった。

なお、 $\alpha$ -SMA ならびに transgelin 遺伝子の発現、コラーゲン産生能に対し、複数のシグナル関与の可能性を検討している。そのため、今後さらに  $\alpha$ -SMA が歯根膜細胞に及ぼす複数のシグナルへの影響について解析を進めることで、アンキロシス発生予防のためのメカニズム解明に繋がる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 3.Akira Haraguchi, Shinichiro Yoshida, Masaaki Takeshita, Yasunori Sumi, Hiromi Mitarai, Asuka Yuda, Hiroko Wada, Fusanori Nishimura, Hidefumi Maeda, Naohisa Wada	4. 巻 6
2. 論文標題 Effects of ultraviolet irradiation equipment on endodontic disease-related bacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lasers in Dental Science	6. 最初と最後の頁 31-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 第152回日本歯科保存学会
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を介した細胞外基質への接着に關与する
3. 学会等名 第152回日本歯科保存学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naati Fakatava, 御手洗裕美, 祐田明香, 原口晃, 長谷川大学, 前田英史, 和田尚久
2. 発表標題 ACTA2 regulates human PDL function via interaction with or without TGF- 1
3. 学会等名 第156回日本歯科保存学会
4. 発表年 2022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. 本研究に關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