

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18595

研究課題名(和文) 歯根膜線維の組織化が細胞外微小環境として幹細胞分化に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of periodontal ligament fiber organization on stem cell differentiation as an extracellular microenvironment

研究代表者

井田 貴子 (Ida, Takako)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60790285

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)：本研究では、細胞外微小環境を制御する因子としてのⅤ型コラーゲンが細胞外基質の特性に及ぼす影響および幹細胞分化制御に及ぼす影響を解析した。4週齢雄性SDラットより得た歯根膜細胞に対してsiRNAによるCOL5A1ノックダウンを行い、Lysyl Oxidase(LOX)およびⅠ型コラーゲンの遺伝子発現およびタンパク質発現を解析した。COL5A1のノックダウンにより、LOXおよびCOL1A2の遺伝子発現およびタンパク質発現は抑制された。また、COL5A1遺伝子をノックダウンした骨髄由来幹細胞の分化能についても解析した結果、分化マーカーの遺伝子発現の低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究に期待される成果は、歯根膜恒常性維持機構の解明という観点から歯科医学に貢献するだけでなく、Ⅴ型コラーゲンによる線維形成と幹細胞分化制御機構の解明という観点から幹細胞生物学の発展に寄与する。Ⅴ型コラーゲンは幼弱な結合組織症状を呈する、エーラスダンロス症候群の原因遺伝子であるだけでなく、線維形成の亢進を伴う様々な病態における発現の亢進が認められる。したがって、その機能の解明は結合組織疾患の病態の理解の一端に寄与するものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I analyzed the effects of type V collagen as a factor controlling the extracellular microenvironment on the properties of extracellular matrix and the regulation of stem cell differentiation. Knockdown of COL5A1 by small interfering RNA (siRNA) affected gene expression and protein expression of lysyl oxidase (LOX) and type I collagen in periodontal ligament cells of rat. In addition, knockdown of COL5A1 suppressed gene expression of a differentiation marker (BMP2) in bone marrow-derived stem cells.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯学 歯根膜 Ⅴ型コラーゲン 幹細胞分化

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は歯と歯槽骨の間に介在する線維性の結合組織であり、歯の支持、咬合感覚の感知だけでなく、周囲の歯周組織への細胞供給も担っており、歯周組織の恒常性維持に大きく寄与している。歯根膜組織の特徴として、その極めて早い代謝回転が知られているが、これを可能としているのは広範な多分化能を有する幹細胞の存在であると考えられてきた。歯根膜の幹細胞は骨髄由来幹細胞や歯髄由来幹細胞に比べて高い増殖能を有していることが報告されている (Eleuterio *et al*, 2013)。加えて歯根膜の幹細胞は、歯周組織のみならず、神経細胞や筋芽細胞に分化することが可能であることから、再生医療における細胞源としても期待されている。したがって歯根膜幹細胞の維持と分化を制御するメカニズムの解明は、歯根膜再生による天然歯の保存や、歯根膜付きインプラント開発を含め、今後の歯科医療を大きく発展させることが出来る可能性を有している。

細胞外基質は物理的な構造物として、組織の形態を形作るだけでなく、細胞外微小環境の一部として、細胞機能の維持を担っている (Yamada *et al*, 2019)。歯根膜の基質線維は主に線維型の I、III、V 型コラーゲンにより組織構造を維持している。中でも、V 型コラーゲンは I 型コラーゲンとともにヘテロタイプな線維を形成し、線維の組織化に寄与している。V 型コラーゲンをコードする *COL5A1* 遺伝子の完全なノックアウトマウス (*COL5A1*^{-/-}) は胎生致死であるが、*Col5a1* 遺伝子の発現量が減少するヘテロ・ノックアウトマウス (*COL5A1*^{+/-}) では、コラーゲンの量や線維数の減少、線維構造の異常が報告されており (Wenstrup *et al*, 2004)、V 型コラーゲンは線維形成に重要な機能を果たしていることが示唆されている。さらに *COL5A1* 遺伝子を靭帯特異的にノックアウトしたマウスでは、靭帯の弾性率が低下する (Sun *et al*, 2015)。また培養細胞における解析では *COL5A1* 遺伝子のノックアウトが、細胞の形態、成長、遊走などの細胞挙動に影響を及ぼすことも報告されているだけでなく (Bruels *et al*, 2009)、真皮においては、V 型コラーゲンが幹細胞の未分化状態の維持に関与する可能性も示唆されている (Hasebe *et al*, 2018)。さらに癌や炎症により V 型コラーゲンの発現が亢進することが報告されていることから、V 型コラーゲンは病態特異的な線維形成にも関連があると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では歯根膜線維に含まれ、線維の組織化に寄与する V 型コラーゲンが、細胞外基質の特性を介して幹細胞の維持と分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) V 型コラーゲンが細胞外基質の特性に及ぼす影響の解明

4 週齢雄性 SD ラットより上下顎臼歯を抜歯し、*Liberase* を用いて歯根膜細胞を採取した。siRNA により *COL5A1* 遺伝子を 3 日間ノックダウンした後、MTT 法による細胞増殖能の評価を行った。ノックダウン後さらに 4 日間培養して得た細胞外基質をサンプルとして用いて、コラーゲン修飾酵素である *Lysyl Oxidase (LOX)* および V 型コラーゲンと会合体を形成する I 型コラーゲン (*COL1A2*) の遺伝子発現をモニターし、*COL5A1* の阻害が *LOX* および I 型コラーゲンに及ぼす影響を解析した。形成されたマトリックスの特性に関しては、シリウスレッドおよびファストグリーンによる半定量測定を行った。関連するタンパク質発現については、Western blotting にて評価した。

(2) *COL5A1* ノックダウンが幹細胞の分化に及ぼす影響の解明

歯根膜幹細胞の一定量は骨髄に由来することから、4 週齢雄性 SD ラットより得た骨髄由来間細胞 (BMSC) を用いて、*COL5A1* 遺伝子を 3 日間ノックダウンした後、骨芽細胞分化誘導を行い、遺伝子発現解析による分化能の評価を行った。

4. 研究成果

(1) V 型コラーゲンが細胞外基質の特性に及ぼす影響の解明

siRNA により *COL5A1* がノックダウンされていることを確認した (図 1)。

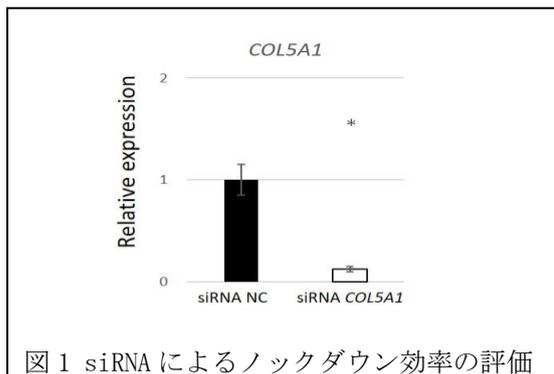
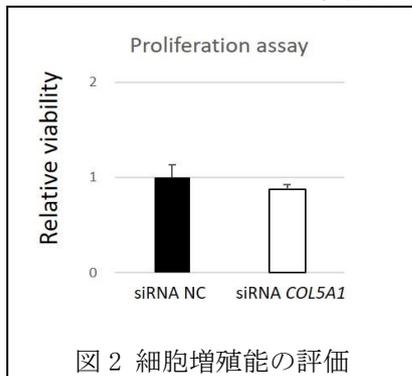
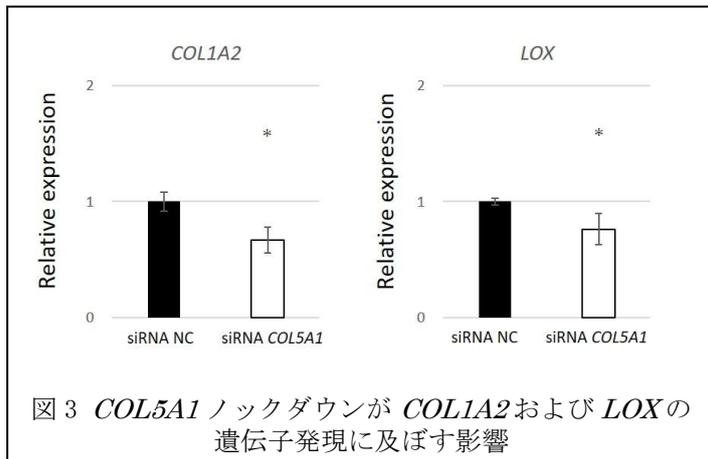


図 1 siRNA によるノックダウン効率の評価

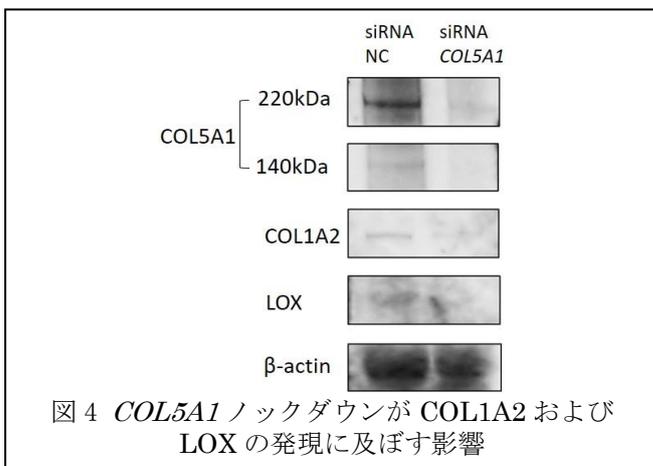
COL5A1 ノックダウンは、歯根膜細胞の増殖能に影響を及ぼさなかった (図 2)。



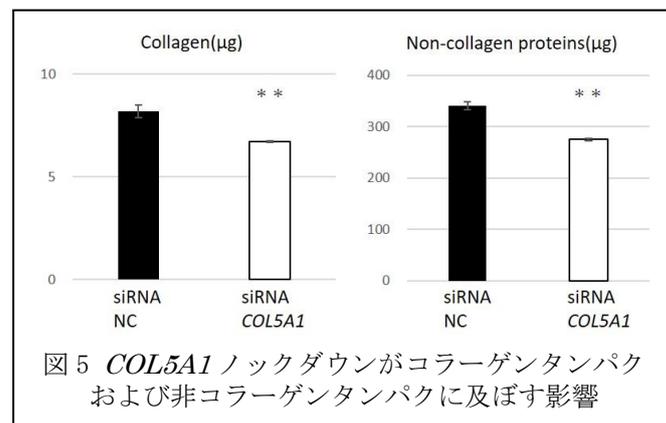
COL5A1 ノックダウンにより *COL1A2* および *LOX* の遺伝子発現が抑制された (図 3)。



タンパク質発現についても遺伝子発現と同様に抑制された (図 4)。



コラーゲン量を半定量的に測定したところ、*COL5A1* ノックダウンによりコラーゲンタンパク量および非コラーゲンタンパク量は低下した (図 5)。



(2) *COL5A1* ノックダウンが幹細胞分化に及ぼす影響の解明

COL5A1 ノックダウンにより、骨芽細胞分化誘導後の骨芽細胞分化マーカーである *BMP2* の発現は低下した。一方、*SPP1* の遺伝子発現には影響がなかった (図 6)。

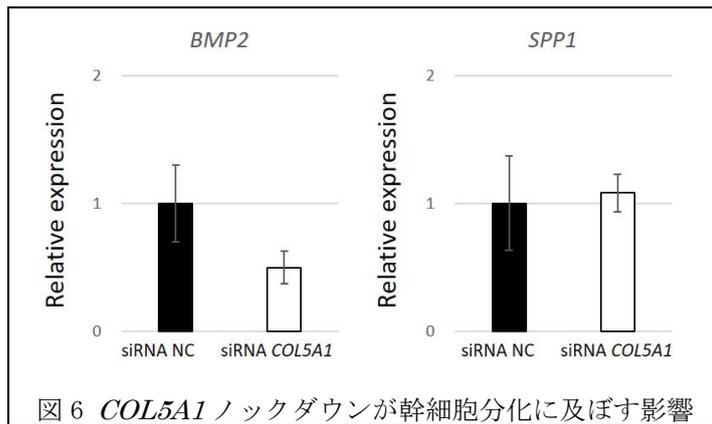


図 6 *COL5A1* ノックダウンが幹細胞分化に及ぼす影響

以上の結果より、*COL5A1* 遺伝子は LOX および I 型コラーゲンの発現および基質線維形成に影響を及ぼすことが示された。さらに、*COL5A1* 遺伝子は幹細胞の分化についても影響を及ぼすことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------