

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 2日現在

機関番号：17701
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792482
 研究課題名(和文) 歯周組織再生に向けたmTORを軸とした分子生物学的基盤の確立に関する研究
 研究課題名(英文) Study on establishment of the molecular biologic base which assumed mTOR for the periodontal regeneration.
 研究代表者
 中村 利明 (NAKAMURA TOSHIAKI)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
 研究者番号：60381183

研究成果の概要(和文)：歯周病により破壊された歯周組織を再生させる歯周組織再生療法において、再生に適した状態へ宿主細胞群・移植細胞群を効率的に制御する視点が重要と考えられる。本研究では、The mammalian target of rapamycin (mTOR)を軸とした歯周組織再生に適した状態へ細胞を制御する分子生物学的基盤を確立することを目的とした。結果、ヒトセメント芽細胞(HCEM)においては BMP-2 が誘導する骨芽細胞様分化を FK506 が FKBP12 を介して smad 経路のリン酸化を亢進し分化制御を行っている可能性が示唆された。また、ヒト歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞(hGFIPS)に対して各種 mTOR 抑制剤を添加培養したところ、コロニー形成や分化マーカーの遺伝子発現に変化が認められ mTOR 経路が分化制御を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the periodontal regenerative therapy, we have considered that it is important to control host cells in periodontium and transplant cells to a state suitable for regeneration. In this study, it was intended that we established the molecular biologic base that controlled a cell to a state suitable for the periodontal regeneration by using the mammalian target of rapamycin (mTOR). As a result, we had observed that FK506 enhanced BMP-2-induced-osteoblastic differentiation through smad-signaling pathway via FKBP12 on human cementoblasts (HCEM). Furthermore, in the induced pluripotent stem cells derived from a human gingival fibroblast (hGFIPS) culture system, we had observed that the colonization and gene expression patterns were altered in the addition of some mTOR inhibitors. This result may indicate that mTOR pathway plays a pivotal role in the hGFIPS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

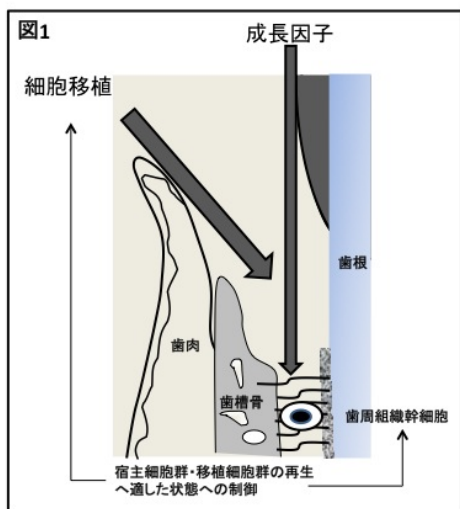
キーワード：歯周病・歯周組織再生・mTOR

1. 研究開始当初の背景

歯周病は組織破壊性の慢性炎症性疾患であり、歯周病により破壊される歯周組織は歯槽骨、セメント質、歯根膜といった複数の異なる組織によって構成される。現在、臨床応用されている歯周組織再生療法は、宿主細胞

に Signaling molecules を作用させるか、再生に必要な空間を維持することに主眼が置かれている。しかしながらその適応症の狭さゆえ、多くの患者がその恩恵を受けているとは言い難い状況である。そのためさらなる適応症の拡大、効率的な組織再生を成すために

Tissue engineering の3要素の観点から、①成長因子②細胞移植③Scaffold について様々な研究が行われている。申請者は以上の3点の他に、歯周組織再生に適した状態へ宿主細胞群・移植細胞群を効率的に制御することが重要であると考えている(図 1)。例としては



エナメルマトリックスデリバティブ(EMD)や b-FGF を投与するだけでなく、歯根膜にわずかに存在する幹細胞、いわゆる

「歯周組織幹細胞」がそれらの作用を効率的に受容できる状態に制御できれば、治療効果・予知性の向上に寄与すると考えられる。また細胞移植の有力なソースとして考えられている人工多能性幹細胞(iPS細胞)について、申請者らはマウス iPS 細胞を用いたラット歯周組織欠損における再生の可能性を発表しているが(第 53 回秋季日本歯周病学会学術大会)、どのようなフェノタイプの iPS 細胞が有効かは不明であり、間葉系幹細胞・骨芽細胞などへの効率的な分化誘導は困難で、iPS 細胞を制御する技術の確立は急務である。そこで申請者はこれらを制御するターゲット分子群として mTOR に着目した。mTOR とは、Cyclosporin、FK506 に続く第 3 世代の免疫抑制剤である rapamycin の標的という意味で名付けられた TOR というタンパク質の中で、ほ乳類に見られる細胞内分子のことである。mTOR が関与する生理反応には DNA の転写・翻訳の制御、細胞の大きさや細胞骨格の再構成の制御、自食作用の制御などがあげられるが、ヒトの悪性腫瘍や、2 型糖尿病のような代謝不全において rapamycin に代表される mTOR 阻害剤が有効であるとする報告があり注目されている。この mTOR が、胚性幹細胞(ES 細胞)において、その自己複製や分化段階を制御する因子として機能している可能性が近年示された(Cell Stem Cell 2008; 2:448-460)。また、歯周組織再生療法への応用が検討されている TGF- β superfamily に属する成長因子

(BMP-2, GDF-5, etc.)の受容体に mTOR 経路に關与する FKBP12 が結合し、シグナル伝達を抑制しているとの報告もある(Biochem Biophys Res Commun 2005;)。このように mTOR に関して、免疫抑制剤の標的分子として以外の知見が、様々な研究分野で得られているが、歯周組織やその構成細胞に関する報告はほとんど無い。

2. 研究の目的

研究では、宿主細胞としてヒトセメント芽細胞(HCEM)や、有力な細胞移植のソースとして、ヒト歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞(hGFIPS)を用い、mTOR を軸とした歯周組織再生に適した状態へ向けた制御の分子生物学的基盤を確立することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)HCEM の細胞増殖に与える FK506 および Cyclosporin A の影響
HCEM を維持培地(α -MEM+10%FBS+抗生物質)で培養。FK-506 および Cyclosporin A を添加、培養 0, 1, 3, 5, 7 日後に Cell counting kit-8 (同仁化学)を用い MTT 変法にて細胞増殖を解析。

(2) HCEM の BMP-2 刺激による骨芽細胞様分化に与える FK506 および Cyclosporin A の影響
A: ALP 活性
維持培地または分化培地(維持培地+10mM β -Glycerophosphate+10nM Dexamethason+10 μ g/ml Ascorbic acid)+各種添加因子存在下で 6 日培養後、ALP 活性、ALP 染色を行った。ALP 活性についてはタンパク定量後、総タンパク量にて補正を行った。

B: 石灰化
維持培地または分化培地+各種添加因子にて培養 28 日後、Alizarin Red S 染色にて評価した。

(3)HCEM の BMP-2 刺激による smad1/5/8 のリン酸化への FK506 の影響
各種添加因子にて刺激後(0-60 分)、RIPA buffer にて Sample を回収、Western blot 法にて p-smad 1/5/8 および smad 1 を解析。

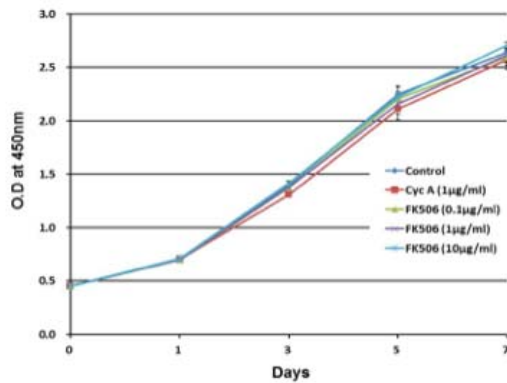
(4)HCEM の BMP-2 刺激下での骨関連遺伝子の発現に与える FK506 の影響および FKBP12-siRNA 導入 HCEM における BMP-2 刺激下での遺伝子発現変化
各種添加因子を含む分化培地にて 24 時間培養後、Isogen にて RNA を回収、通法に従い Real-Time PCR 法(SYBR Green)にて解析した。内在性コントロールとしては GAPDH を用い補正を行った。また FKBP12 は siRNA および LipofectamineRNAiMAX を用いて遺伝子発現

抑制を行い、Western blot および Real-Time PCR をもちいて発現抑制を確認したのち、各種遺伝子発現変化を上述の方法に従い解析した。

(5) hGFIPS に対する mTOR 抑制剤の効果の検討
 A: MEF 上での hGFIPS 細胞のコロニー形成に与える影響を Rapamycin 10nM および 100nM 添加培養 6 日後、ALP 染色を行い、光学顕微鏡下にて観察した。
 B: hGFIPS の胚様体を与える影響を、胚様体の浮遊培養中に mTOR 抑制剤 (Rapamycin, BEZ235, OSI-027) を添加、6 日後に RNA を回収し Real-Time PCR にて解析した。

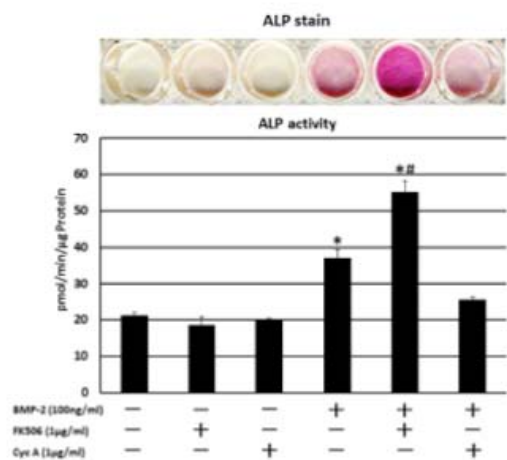
4. 研究成果

(1) HCEM の細胞増殖に与える FK506 の影響
 FK506 は 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度および 0-7 日の刺激期間において HCEM の細胞増殖に影響は認められなかった。

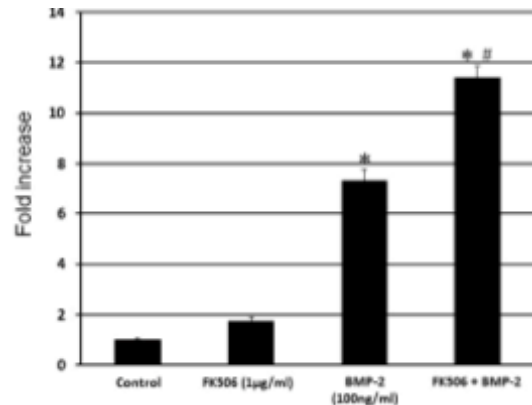


(2) HCEM の BMP-2 刺激による骨芽細胞様分化に与える FK506 および Cyclosporin A の影響

(A)



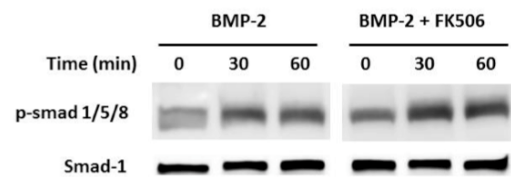
(B)



HCEM において BMP-2 刺激 (100ng/ml) により上昇した ALP 活性は FK506 添加 (1 $\mu\text{g/ml}$) により有意に促進された (A)。また、BMP-2 刺激により観察された石灰化は同様に FK506 添加により促進された (B)。Cyclosporin A についてはその効果は認められなかった。

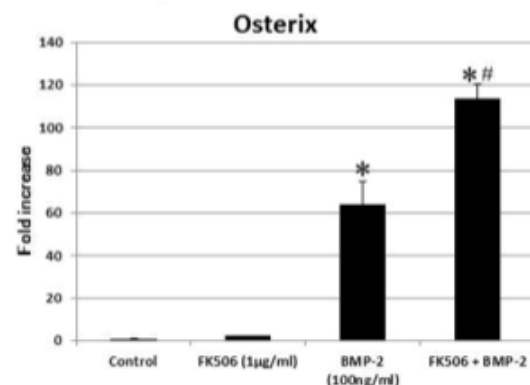
*: vs control ($p < 0.05$), #: vs BMP-2 ($p < 0.05$).

(3) HCEM の BMP-2 刺激による smad1/5/8 のリン酸化への FK506 の影響



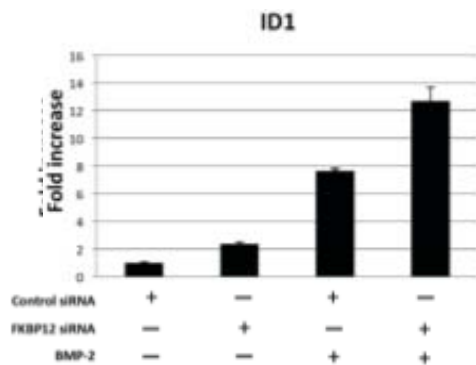
刺激後 30, 60 分において BMP-2 刺激による smad1/5/8 のリン酸化は FK506 の添加により促進された。

(4) HCEM の BMP-2 刺激下での骨関連遺伝子の発現に与える FK506 の影響



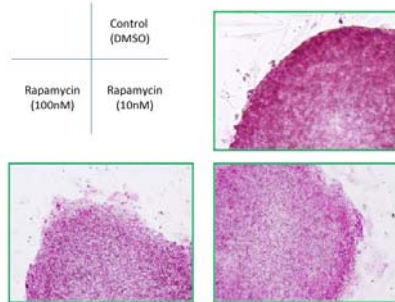
HCEM において骨関連遺伝子の一つである Osterix は BMP-2 によりその発現が認められ、FK506 添加により有意にその発現は促進された。*: vs control ($p < 0.05$), #: vs BMP-2 ($p < 0.05$).

(5)FKBP12-siRNA
導入 HCEM における BMP-2 刺激下での FK506
の影響

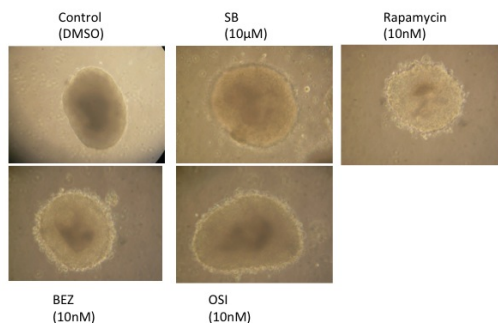


HCEM において FKBP12 の発現を抑制し BMP-2 刺激を行ったところ、非抑制群と比較して ID1 の発現が促進された。

(6)hGFIPS に対する mTOR 抑制剤の効果の検討
A: コロニー形成に与える影響

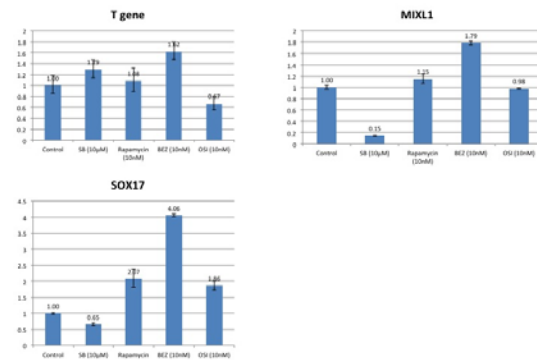


MEF 上での hGFIPS のコロニーは Rapamycin 添加 6 日後においてその辺縁の明瞭性の低下が観察された。



B: hGFIPS の胚様体に与える影響
浮遊培養における hGFIPS の胚様体形成時に各種抑制剤を添加(4 日間)したところ、非添加群と比較して、胚様体辺縁の明瞭性に低下が観察され、また Rapamycin と BEZ235 は胚様体の大きさも小さく、形成される数も減少していた。
また、中胚葉、外胚葉系のマーカー遺伝子の発現を解析したところ、BEZ235 において両胚

葉系のマーカー遺伝子 (T gene, MIXL1, SOX17) の発現の亢進が観察された。



(7)まとめ
本研究において
①ヒトセメント芽細胞の BMP-2 刺激による骨芽細胞様分化において mTOR 経路の構成要素の一つである FKBP12 を介して FK506 がその分化を促進している可能性が示唆された。
②hGFIPS において mTOR 経路がその形態維持、分化において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
〔雑誌論文〕 (計 0 件)
〔学会発表〕 (計 2 件)
① Toshiaki Nakamura, Kozue Hasegawa -Nakamura, Masae Kitagawa, Mutsumi Miyauchi, Takashi Takata and Kazuyuki Noguchi.

Effects of FK506 on BMP-2 -induced osteo/cementoblastic differentiation in human cementoblast.
第 98 回アメリカ歯周病学会 (AAP) 共催日本歯周病学会 (JSP) 2012 年大会, 2012 年 9 月 29 日~2012 年 10 月 2 日 (ロサンゼルス).
② 中村利明、中村梢、北川雅恵、宮内睦美、高田隆、野口和行
免疫抑制剤 FK506 がヒトセメント芽細胞の BMP-2 による細胞分化誘導に与える影響の検討 第 54 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2011 年 9 月 24 日(山口).

6. 研究組織
(1)研究代表者
中村 利明 (NAKAMURA TOSHIAKI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教, 研究者番号: 60381183
(2)研究協力者
長谷川 梢 (HASEGAWA KOZUE)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教, 研究者番号: 00404492