

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593091

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞(iPS細胞)を利用した、ロンベルグ症候群の病因解明に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of the etiology of Parry-Romberg syndrome using induced pluripotent stem cells

研究代表者

川邊 紀章(Kawanabe, Noriaki)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：00397879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ロンベルグ症候群患者より得られた歯根膜細胞の幹細胞特性について検討を行った。ロンベルグ症候群歯根膜細胞は健常歯根膜細胞に比べてICAM-1、NCAM-1、SSEA-4の発現が有意に高かった。また、脂肪細胞および骨芽細胞への分化能が健常歯根膜細胞と比較して有意に低かった。ICAM-1・NCAM-1・SSEA-4に対する中和抗体を添加することによって脂肪細胞分化および骨芽細胞分化能が改善された。このことから、ICAM-1・NCAM-1・SSEA-4の発現の亢進がロンベルグ症候群の表現型の一つの原因である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the stem cell property of periodontal cells derived from Parry-Romberg syndrome patient (Romberg PDL cells). Romberg PDL cells expressed significantly higher levels of ICAM-1, NCAM-1 and SSEA-4 compared to normal PDL cells. In addition, adipogenic and osteogenic differentiation potentials of Romberg PDL cells were inferior to that of normal PDL cells. Pulsing neutral antibodies against ICAM-1, NCAM-1 and SSEA-4 improved their adipogenic and osteogenic differentiation potentials. Taken together, facilitating expression of ICAM-1, NCAM-1 and SSEA-4 appears to cause the phenotype of Parry-Romberg syndrome.

研究分野：矯正歯科

キーワード：ロンベルグ症候群 歯根膜細胞 人工多能性幹細胞(iPS細胞)

## 1. 研究開始当初の背景

ロンベルグ症候群は、Parry CH (1825) および、Henoch E と Romberg HM (1846) によって初めて報告された疾患である。非常に稀な疾患であり、顔面の半側の皮膚および軟組織の進行性萎縮を生じる。発症年齢は通常5歳から15歳であり、2年から10年程度の進行期の後、安定期に入る。その症状は軟組織だけでなく、顎骨や歯の形成にも影響を及ぼし著しい咬合異常を引き起こすことから、ロンベルグ症候群は、平成20年4月より歯科矯正の保険給付対象疾患として定められている。

現在、ロンベルグ症候群の病因は解明されておらず、その進行を抑制する治療法も開発されていない。そのため、患者に対する治療は対処療法のみである。一般的には、成長終了後の歯科矯正治療による咬合の確立、および外科手術による顎顔面の再建が行われる。

これまでロンベルグ症候群に関する多くの報告がされているものの、本症候群の症状に関する報告だけである。ロンベルグ症候群の病因を分子生物学的に解明した報告はこれまでに存在しない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いて、顎顔面形態に異常を及ぼす先天性疾患の一つである「ロンベルグ症候群」の病因を解明することである。

本研究では、研究期間内に以下の内容について明らかにする。

1.ロンベルグ症候群歯根膜細胞の幹細胞特性を明らかにする。：付着性・抗原発現パターン・多分化能について調べる。

2.ロンベルグ症候群歯根膜細胞の組織形成への影響を明らかにする。：ロンベルグ症候群歯根膜細胞からiPS細胞(induced pluripotent stem cells; 人工多能性幹細胞)を作製し、免疫不全マウスに移植して、この幹細胞がロンベルグ症候群を発症する原因であるかどうかの検討を行う。

3.ロンベルグ症候群歯根膜細胞に特異的に発現する遺伝子の機能を明らかにする。：ロンベルグ症候群歯根膜細胞に特異的な遺伝子発現を、マイクロアレイ・フローサイトメトリー・RT-PCRを用いて網羅的に明らかにする。また、これらの遺伝子群から、幹細胞の分化能を抑制する遺伝子を同定し、その機能や制御メカニズムについて明らかにする。

## 3. 研究の方法

平成24年度

I.ロンベルグ症候群歯根膜細胞の幹細胞特性を明らかにする。

### (1) 細胞培養

岡山大学病院矯正歯科を受診したロンベルグ症候群患者に対して説明と同意を行った後、治療上抜歯が必要であると診断された抜去歯の歯根膜細胞を実験に使用する。歯根膜細胞の採取・培養の手技は、既に習熟している。

### (2) 幹細胞特性の解析

ロンベルグ症候群歯根膜細胞において、間葉系幹細胞の特性である細胞付着性、表面抗原マーカーの発現、脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞への分化能、の詳細な検討を行う。これらの実験手技は、既に習熟している。

II.ロンベルグ症候群歯根膜細胞がin vivoにおいて組織形成へ及ぼす影響を明らかにする。

### (1) iPS細胞の作製

ロンベルグ症候群歯根膜細胞が歯周組織以外の組織への分化能を有することができるように、細胞にOCT4・SOX2・KLF4・C-MYC遺伝子を導入してiPS細胞の作製を行う。

### (2) 免疫不全マウスへの移植

iPS細胞化されたロンベルグ症候群歯根膜細胞を、幼弱な免疫不全マウスの顔面皮下に移植する。これらのマウスが成熟した後、CTおよび切片による観察を行い、顔面の軟組織および硬組織形成に及ぼす影響を調べる。

平成25年度以降

III．ロンベルグ症候群歯根膜細胞に特異的に発現する遺伝子の同定を行う。

ロンベルグ症候群歯根膜細胞に特異的に発現する遺伝子を、健常者の歯根膜細胞を対照群に用いて調べる。mRNAの発現は、マイクロアレイを用いて調べる。また、mRNAレベルでは検出できない糖鎖などの発現は、フローサイトメトリーを用いて調べる。

IV．ロンベルグ症候群歯根膜細胞に特異的に発現する遺伝子の機能を明らかにする。

マイクロアレイ・フローサイトメトリーで検出されたロンベルグ症候群歯根膜細胞に特異的に発現する遺伝子群から、データベースを用いて細胞分化にかかわる遺伝子を同定する。その後、同定された遺伝子の強制発現または発現抑制を行うためのレトロウイルスを作製し、歯根膜細胞より作製したiPS細胞へ遺伝子導入を行った後、その細胞の分化能をin vitro（脂肪細胞分化・骨芽細胞分化など）およびin vivo（免疫不全マウスへの移植実験）において調べる。

V．以上の結果を国内、海外学会にて報告した後、論文にまとめる。

#### 4．研究成果

平成24年度に実施した研究成果として、まずロンベルグ症候群歯根膜細胞の採取を行い、培養してロンベルグ症候群歯根膜細胞の樹立を行った。そして、このロンベルグ症候群歯根膜細胞を用いて、間葉系幹細胞特性の同定を行った。間葉系幹細胞の特性としては、細胞付着性、表面抗原マーカーの発現、多分化能、の3項目について検討を行った。比較は、健常者から採取された健常歯根膜細胞を用いた。その結果、ロンベルグ症候群歯根膜細胞は、細胞付着性に違いは認められなかった。しかし、表面抗原マーカーの発現パターンには違いが認められ、ロンベルグ症候群歯根膜細胞は健常歯根膜細胞に比べてICAM-1、NCAM-1、SSEA-4の発現が高く、ICAM-2の発現が低いことが確認された。また、

多分化能の違いを調べるために、脂肪細胞、骨芽細胞への分化能を比較した。その結果、ロンベルグ症候群歯根膜細胞は、oil red O染色性の脂肪滴を形成する脂肪細胞への分化能は有していたが、その形成能は健常歯根膜細胞と比較して有意に低かった。また、同様に、alizarin red S染色性の石灰化物沈着能を有する骨芽細胞への分化能も有していたが、その形成能も健常歯根膜細胞と比較して有意に低かった。また、ロンベルグ症候群歯根膜細胞を用いたiPS細胞の作成も行った。この細胞は今後の研究を行うためにも必要であるので、複数のクローン細胞株を樹立し、それぞれのクローン細胞株の特性や違いを明らかにするための検討を行った。

平成25年度に実施した研究成果として、ロンベルグ症候群歯根膜細胞に特異的に発現する遺伝子の同定を行った。フローサイトメトリーによるロンベルグ症候群歯根膜細胞の表面抗原マーカーの発現の違いを調べたが、その結果として、ロンベルグ症候群歯根膜細胞は正常歯根膜細胞と比較してICAM-1、NCAM-1、SSEA-4の発現が高く、ICAM-2の発現は低かった。しかし、これら表面抗原の発現は細胞膜に存在する物質に限定されるため、ロンベルグ症候群歯根膜細胞の生物学的現象を説明するには不十分であると考えられた。そのため、ロンベルグ症候群歯根膜細胞に特異的に発現している遺伝子を網羅的に解析するために、mRNAを回収しマイクロアレイにて解析を行った。方法としては、フローサイトメトリーを行った時と同じく、培養ロンベルグ症候群歯根膜細胞と対照群として健常ヒト歯根膜細胞を用い、それぞれのmRNAを回収して解析を行った。その結果、ロンベルグ症候群歯根膜細胞で発現している遺伝子群の上流にPOU3F2、PSCD1、TNFSF8、SPASTが存在していることが明らかとなった。また、フローサイトメトリーおよびマイクロアレイでロンベル

グ症候群歯根膜細胞に特異的に発現していることが確認できた遺伝子群がロンベルグ症候群歯根膜細胞の表現型に關与しているのかについて確認するためにはこのiPS細胞化したロンベルグ症候群歯根膜細胞を用いる必要がある。そのため、ロンベルグ症候群歯根膜細胞を用いたiPS細胞の作成も行った。

平成26年度に実施した研究成果として、フローサイトメトリーおよびマイクロアレイでロンベルグ症候群歯根膜細胞に特異的に発現していることが確認できた遺伝子群がロンベルグ症候群歯根膜細胞の表現型に關与しているのかについて確認するための研究を行った。まず、ロンベルグ症候群歯根膜細胞をiPS細胞化した細胞株の作成を行った。この細胞が樹立できれば、ロンベルグ症候群歯根膜細胞に特異的に発現する遺伝子の機能解析を行っていくことができる。しかし、実際にはロンベルグ症候群歯根膜細胞にOCT4・SOX2・KLF4・C-MYC等の遺伝子導入を行いiPS細胞化することができなかつた。これまでヒト歯根膜細胞を用いてiPS細胞を作成したという報告はあるので、今回用いたロンベルグ症候群歯根膜細胞に遺伝子導入がされにくい特性があったことが考えられる。そこで、このiPS細胞化したロンベルグ症候群歯根膜細胞の作成と別に、培養ロンベルグ症候群歯根膜細胞を用いて、これまでフローサイトメトリーやマイクロアレイで発現の違いが認められた遺伝子等がロンベルグ症候群歯根膜細胞の表現型に關与しているのかどうかを調べた。ICAM-1・NCAM-1・SSEA-4に対する中和抗体を用いて脂肪細胞および骨芽細胞への分化能を調べた結果、これらの中和抗体を添加することによってin vitroにおける脂肪細胞分化および骨芽細胞分化が促進されることが認められた。このことから、ICAM-1・NCAM-1・SSEA-4の発現の亢進がロンベルグ症候群の表現型の一

つの原因であ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 1件)

Kawanabe N, Fukushima H, Ishihara Y, Yanagita T, Kurosaka H, Yamashiro T. Isolation and characterization of SSEA-4-positive subpopulation of human deciduous dental pulp cells. Clin Oral Investig. 2015 Mar;19(2):363-371. 査読有

[学会発表](計 2件)

川邊 紀章, 菅原 康代, 上岡 寛, 山城 隆. ロンベルグ症候群患者の歯根膜細胞における表面抗原分子の発現の網羅的解析. 第73回日本矯正歯科学会大会, 幕張, 2014年10月20-22日.

川邊 紀章, 菅原 康代, 上岡 寛, 山城 隆. ロンベルグ症候群患者における歯の組織学的検討. 第32回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2014年7月24-26日.

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川邊 紀章 (KAWANABE, Noriaki)  
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授  
研究者番号: 00397879

(2) 研究分担者

柳田 剛志 (YANAGITA, Takeshi)  
岡山大学・大学病院・講師  
研究者番号: 90534793

住吉 久美 (SUMIYOSHI, Kumi)  
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教  
研究者番号: 80625161

山城 隆 (YAMASHIRO, Takashi)  
大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授  
研究者番号: 70294428

菅原 康代 (SUGAWARA, Yasuyo)  
岡山大学・大学病院・講師  
研究者番号：70379775

(3)連携研究者  
なし