

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862049

研究課題名(和文)ポリコーム遺伝子発現制御に着目した歯周組織構成細胞の多方向制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of multi-directed regulatory mechanism focused on regulation in polycomb genes expression for periodontal cells

研究代表者

岩田 倫幸 (IWATA, TOMOYUKI)

広島大学・大学病院・助教

研究者番号：30418793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、ヒト間葉系幹細胞(MSC)におけるポリコーム遺伝子発現が低酸素および低酸素誘導性マイクロRNAにより影響されることから、酸素濃度が低酸素誘導因子HIF-1、ポリコーム遺伝子群およびマイクロRNAの発現調整を介してMSC細胞機能を制御する可能性が示唆された。これにより、酸素濃度調整を主としたポリコーム遺伝子群とマイクロRNAの発現制御により、効果的な歯周組織再生が実現することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, it can be suggested that oxygen tension regulate mesenchymal stem cell (MSC) function via hypoxia inducible factor (HIF)-1, a group of polycomb genes and micro RNA as the expression of polycomb genes were affected by hypoxic condition and hypoxia-induced micro RNA. Therefore, it is expected that much more effective periodontal regenerative therapy can be come true by the expression regulation of a group of polycomb genes and micro RNA, which controlled by, mainly, control in oxygen tension.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生 間葉系幹細胞 ポリコーム遺伝子 micro RNA HIF-1alpha 歯周靭帯細胞

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(MSC)は多能性細胞とされ、生体外で増殖させた後においても、骨、軟骨、脂肪組織を含む様々な組織を構成する細胞へと分化する能力を有する(Tsutsumi S et al.; Biochem Biophys Res Commun., 2001)。さらに、歯周組織を構成する骨とセメント質にも分化可能である(Hasegawa N et al.; J Periodontol., 2006)。これらのことから、MSCは歯周組織再生に有用であると考えられる。

MSCの分化メカニズムは未だ不明な点が多いが、HIF-1の標的遺伝子の一つであるDEC1が骨分化を促進すること(Iwata T et al.; Eur J Cell Biol., 2006)、さらには、同じく標的遺伝子の一つであるTWIST-1が歯周靭帯細胞(HPL cells)に高く発現され、HPL cellsの石灰化に関与している。また、MSCの未分化マーカーとして9つの転写因子: ETV1, SOX11, FOXP1, GATA6, SIM2, ETV5, HMGA2, PRDM16, KLF12があり(Kubo H et al.; Genes Cells., 2009)、低酸素環境においてこれらの転写因子の一部が上昇する(科学研究費補助金(若手研究(B))課題番号 23792478)ことから、細胞機能の制御には酸素濃度が深く関与していると考えられる。

さらに、低酸素においてHIF-1 α およびmicro RNAの一つであるmiR-210が誘導されること(Kim HW et al.; J Biol Chem., 2009)から、これらの遺伝子によってMSCの細胞機能が制御される可能性が考えられる。

ポリコーム遺伝子は、転写抑制因子としてポリコーム遺伝子群を構成し、Bmi1, PC, RNF2から構成されるpolycomb-repressor complex(PRC)1と、Ezh2, EED, SUZ12から構成されるPRC2の2種類に分類される。これらの遺伝子群は、ヒストンのメチル化を介して分化関連転写因子の発現制御ならびに転写活性制御を通じてMSCの分化制御に深く関わり、細胞機能制御に関与していることが示唆されている(Wei Y et al.; Nat Cell Biol.,

2011; Chen YH et al.; J Biol Chem., 2011; Cakouros D et al.; Mol Cell Biol., 2012)。

さらに、歯周炎治療による炎症除去によって局所の自発的な骨再生が認められる点および炎症性サイトカインによってHIF-1 α が誘導される点から、歯周炎局所における歯周組織構成細胞の細胞機能制御および恒常性の維持は、HIF-1 α およびこれらによって誘導されるmicro RNAの働きによることが示唆される。

これらのことから、低酸素状態により誘導されるHIF-1 α , micro RNAおよびポリコーム遺伝子の相互作用によって、歯周組織構成細胞および移植されるMSCの機能維持および歯周組織での恒常性維持への関与が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の全体構想は、間葉系幹細胞(MSC)を用いた歯周組織再生治療法の確立である。

歯周組織再生治療において、最も重要である移植に用いるMSCと歯周靭帯細胞(HPL cells)の細胞機能制御および移植前後における歯周組織の恒常性維持について、より効果的かつ安全な歯周組織の再生を目指し、本研究では、細胞の機能制御および恒常性維持に深く関わるポリコーム遺伝子ならびにmicro RNAに着目して、初期の炎症状態においてもHPL cellsを中心とした歯周組織構成細胞の機能を維持しつつ、移植するMSCの歯周組織構成細胞、主に骨芽細胞への効果的な分化誘導法を確立することを目的とする。移植時および炎症状態の低酸素状態において誘導されるMSCおよびHPL cellsのポリコーム遺伝子とmicro RNAの発現を確認し、遺伝子導入によって、これらの遺伝子発現を調整し、効果的な分化誘導法を確立する。

最終的には、これらの遺伝子を誘導する因子を解析することによって、歯周組織構成細胞

胞の多方向制御を実現し、より安全かつ効果的な歯周組織再生を確立する。

本研究課題の具体的な目的は、

- (1) 歯周組織構成細胞の炎症性サイトカイン発現に関わるポリコーム遺伝子および micro RNA 群を同定し、その影響を明らかにする
- (2) これらの micro RNA およびポリコーム遺伝子が歯周組織再生に関与することを明らかにする
- (3) ポリコーム遺伝子および micro RNA 群と歯周組織構成細胞の炎症性サイトカイン発現との関連を明らかにする点
- (4) これらの遺伝子発現を誘導または調整する因子を探索する

これらにより、本研究期間では、

- (1) ポリコーム遺伝子および micro RNA が歯周組織における炎症の惹起ならびに歯周組織再生に対して重要な役割を果たすことを明らかにする
- (2) ポリコーム遺伝子および micro RNA 群の発現制御によって歯周組織構成細胞の多方向制御をおこない、歯周組織構成細胞の機能を維持しつつ効果的な歯周組織再生を実現する

ことを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

(1) ポリコーム遺伝子発現に対する低酸素の影響

間葉系幹細胞 (MSC) を低酸素環境下で培養することで低酸素誘導因子 HIF-1 α を誘導し、0~120 時間でのポリコーム遺伝子の発現レベルに対する評価をおこなった。HIF-1 α 誘導因子として 低酸素 (1%酸素濃度) および mimic reagent として

Desferrioxamine (DFO ; 10 μ M) と 塩化コバルト (CoCl₂ ; 100 μ M) を用いた。

評価するポリコーム遺伝子として、polycomb-repressor complex (PRC)-2 を構成する遺伝子 Ezh2, EED, SUZ12 のうち Ezh2, PRC-1 を構成する遺伝子 Bmi1, PC, RNF2 のうち Bmi1 を選択し、mRNA 発現変化の検討をおこなった。

評価方法は リアルタイム PCR による mRNA レベルの検討をおこなった。

(2) ポリコーム遺伝子発現に対する HIF-1 α の影響

間葉系幹細胞 (MSC) を低酸素環境下で培養することで誘導される低酸素誘導因子 HIF-1 α を抑制することで、0~120 時間でのポリコーム遺伝子の発現レベルに対する評価をおこなった。

HIF-1 α 誘導因子として 低酸素 (1%酸素濃度) および 塩化コバルト (CoCl₂;100 μ M) を用いた。HIF-1 α の発現抑制は、Silencer® Select siRNA を Lipofectamine® RNAiMAX を用いて MSC に遺伝子導入することでおこなった。

評価するポリコーム遺伝子として、PRC-2 を構成する遺伝子 Ezh2, PRC-1 を構成する遺伝子 Bmi1 を選択し、mRNA 発現変化の検討をおこなった。

評価方法は リアルタイム PCR による mRNA レベルの検討をおこなった。

(3) Micro RNA 発現プロファイルに対する低酸素および HIF-1 α の影響

MSC に対して低酸素誘導因子 HIF-1 α を誘導し、72 時間での micro RNA 発現プロファイルの変化に対する評価をおこなった。

HIF-1 α 誘導因子として 低酸素 (1%酸素濃度), 塩化コバルト CoCl₂ (100 μ M) を用いた。

影響されうる micro RNA の網羅的解析は Applied Biosystem から提供されている一般的に機能が定義されている主要な 374 種の micro RNA の発現解析をおこなうことが可能な TaqMan[®] Array MicroRNA Card を用いて行なった。

(4) 低酸素誘導性 micro RNA のポリコーム遺伝子発現に対する影響

低酸素で誘導される micro RNA である miR-210 および上記の網羅的解析で確認された micro RNA のうち、miR-628 および miR-629 の過剰発現または機能を調整することにより、ポリコーム遺伝子発現に対する影響を検討した。

micro RNA の過剰発現と機能抑制は、それぞれ *mirVana*[®] miRNA mimic と *mirVana*[®] miRNA inhibitor を Lipofectamine[®] RNAiMAX を用いて MSC に遺伝子導入することでおこなった。

評価方法は リアルタイム PCR による mRNA レベルの検討をおこなった。

(5) 低酸素誘導性 micro RNA による低酸素条件下でのポリコーム遺伝子発現に対する影響

HIF-1 α と低酸素誘導性 micro RNA である miR-210, miR-628 および miR-629 の関連を検討するために、micro RNA の機能抑制をおこなった MSC において低酸素条件下でのポリコーム遺伝子発現に関する影響を検討した。

micro RNA の機能抑制は、*mirVana*[®] miRNA inhibitor を Lipofectamine[®] RNAiMAX を用いて MSC に遺伝子導入することでおこなった。

評価方法は リアルタイム PCR による mRNA レベルの検討をおこなった。

4. 研究成果

(1) ポリコーム遺伝子発現に対する低酸素

の影響

MSC を低酸素条件下および低酸素誘導因子 HIF-1 α 誘導因子存在下で培養し、PRC1 を構成する Bmi1 と PRC2 を構成する Ezh2 の 2 種類のポリコーム遺伝子の発現に対する評価を行なったところ、Bmi1 および Ezh2 ともに発現上昇が 72 ~ 120 時間で認められた。

(2) ポリコーム遺伝子発現に対する HIF-1 α の影響

MSC を siRNA によって HIF-1 α の発現抑制下での低酸素条件下または HIF-1 α 誘導因子 CoCl₂ 存在下で培養し、PRC1 を構成する Bmi1 と PRC2 を構成する Ezh2 の 2 種類のポリコーム遺伝子の発現に対する評価を行なったところ、Bmi1 および Ezh2 とも mRNA 発現が抑制された。

(3) Micro RNA 発現プロファイルに対する低酸素および HIF-1 α の影響

MSC を低酸素条件下および HIF-1 α 誘導因子存在下で 72 時間培養し、miRNA array を用いて micro RNA 発現を網羅的に解析した結果、すべての誘導因子刺激において上昇を示した micro RNA は 32 種の micro RNA であった。

(4) 低酸素誘導性 micro RNA のポリコーム遺伝子発現に対する影響

低酸素条件下および HIF-1 α 誘導因子存在下で上昇を示した 32 種の micro RNA のうち、MSC 未分化関連マーカー転写因子との関連がみられた micro RNA と比較し、miR-628, miR-629 および miR-210 に着目した。

MSC に Micro RNA mimic を遺伝子導入すると、negative control を遺伝子導入した MSC と比較して、3 種類の micro RNA 過剰発現によってポリコーム遺伝子 Bmi1 の mRNA 発現が促進された。一方で、ポリコ

ーム遺伝子 Ezh2 の mRNA 発現は抑制された。

さらに、MSC に micro RNA inhibitor を遺伝子導入すると、negative control を遺伝子導入した MSC と比較して、3 種類の micro RNA inhibitor によってポリコーム遺伝子 Bmi1 の mRNA 発現が抑制され、ポリコーム遺伝子 Ezh2 の mRNA 発現は促進された。

(5) 低酸素誘導性 micro RNA による低酸素条件下でのポリコーム遺伝子発現に対する影響

低酸素による HIF-1 α 誘導条件下において、低酸素誘導性 micro RNA である miR-210 の機能抑制をおこなったところ、ポリコーム遺伝子 Bmi1 の mRNA 発現は抑制された。一方で、ポリコーム遺伝子 Ezh2 の mRNA 発現は上記条件下で促進された。

同様に、低酸素誘導性 micro RNA である miR-628 および miR-629 に関して検討をおこなったところ、ポリコーム遺伝子 Bmi1 の mRNA 発現は、miR-628 の機能抑制により促進され、miR-629 の機能抑制により抑制された。一方で、ポリコーム遺伝子 Ezh2 の mRNA 発現は、miR-628 および miR-629 とも抑制された。

以上の結果より、ポリコーム遺伝子 Ezh2 に対しては、miR-628 および miR-629 は低酸素条件下で誘導されることによって、HIF-1 α よりも優位に働くことで Ezh2 発現を制御していると考えられる。一方で、miR-210 に関しては、低酸素条件下で同様に誘導されるが、HIF-1 α の方が優位に働くことで Ezh2 発現が促進されることが考えられる。この結果に対しては、今回選択した micro RNA 以外の micro RNA が HIF-1 α によって誘導されることで間接的に、もしくは HIF-1 α 自身が直接的に Ezh2 発現を促進していると考えられる。また、ポリコーム遺伝子 Bmi1 に対しては、miR-210

および miR-629 は低酸素条件下で誘導されることによって、HIF-1 α よりも優位に働くことで Bmi1 発現を制御していると考えられる。しかし、単独の micro RNA 過剰発現では発現が促進されたことから、micro RNA 自体の影響というよりも、micro RNA が標的とする遺伝子への影響が強いと考えられる。一方で、miR-628 に関しては、低酸素条件下で同様に誘導されるが、HIF-1 α と協調的に働くことで、Bmi1 の発現が促進されることが考えられる。

本課題の成果により、MSC におけるポリコーム遺伝子発現に対する micro RNA に着目し、酸素濃度調整を中心としたこれらの発現制御による効果的な歯周組織再生をおこなうことにつながることを期待されるが、ポリコーム遺伝子自体の発現調整による MSC の細胞機能および局所炎症制御への影響を解明し、さらには、より詳細な micro RNA および HIF-1 α の相互作用のメカニズムの解明が必要であるので、今後の最重要検討課題であるとする。

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2件)

(1) Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration.

Kittaka M, Kajiya M, Shiba H, Takewaki M, Takeshita K, Khung R, Fujita T, Iwata T, Nguyen TQ, Ouhara K, Takeda K, Fujita T, Kurihara H.

Cytotherapy. 2015 Mar 2.

pii: S1465-3249(15)00048-1.

doi: 10.1016/j.jcyt.2015.01.007.

査読あり

(2) Introduction of a mixture of β -tricalcium phosphate into a complex of bone marrow mesenchymal stem cells and type I collagen

can augment the volume of alveolar bone without impairing cementum regeneration.

Nagahara T, Yoshimatsu S, Shiba H, Kawaguchi H, Takeda K, Iwata T, Mizuno N, Fujita T, Kurihara H.

J Periodontol. 2015 Mar;86(3):456-64.

doi: 10.1902/jop.2014.140384.

査読あり

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 歯周組織構成細胞から産生される液性因子によるヒストン脱アセチル化酵素の発現および活性への影響

高橋慶太、岩田倫幸、兼田英里、永原隆吉、石田 充、柴 秀樹、栗原英見

第 57 回秋季日本歯周病学会学術大会
(2014年10月19日,神戸)

- (2) 骨髄間葉系幹細胞集塊 Clumps of mesenchymal stem cells/extracellular matrix complex を利用した新規組織再生療法開発

加治屋幹人、橘高瑞穂、柴 秀樹、竹脇 学、竹下 慶、岩田倫幸、應原一久、武田克浩、藤田 剛、栗原英見

第 57 回秋季日本歯周病学会学術大会
(2014年10月19日,神戸)

- (3) microRNAは歯肉線維芽細胞由来液性因子による間葉系幹細胞の分化を制御する

兼田英里、岩田倫幸、石田 充、高橋慶太、永原隆吉、藤田 剛、柴 秀樹、栗原英見

第 139 回日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会 (2013年10月17-18日,秋田)

- (4) 骨髄間葉系幹細胞の培養および継代過程における機能的解析

石田 充、岩田倫幸、兼田英里、高橋慶太、柴 秀樹、栗原英見

第 56 回秋季日本歯周病学会学術大会

(2013年9月24日,前橋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 倫幸 (TOMOYUKI IWATA)

広島大学・病院・助教

研究者番号: 30418793

(2) 研究分担者: 該当者なし

(3) 連携研究者: 該当者なし