

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862057

研究課題名(和文) 歯周組織構成細胞分化誘導に関連する特異的転写因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of involved specific transcription factor to differentiation Induction at periodontal tissue component cells

研究代表者

高井 英樹 (Hideki, Takai)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：30453898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯周組織再生療法の確立は歯周組織構成細胞の生物学的特性を理解する事が重要である。ヒト歯根膜細胞(HPDL)を用いて、歯周組織で特異的に発現している転写因子をノックダウンする事で、HPDLがどのような表現型の細胞に分化誘導されるか検索した。歯周組織で特異的に発現している転写因子(KLF12, Twist2およびPax9)をノックダウンした結果、Sox5 mRNA 発現量が増加し、Sp7 mRNA発現量は減少した。以上の結果からHPDLは軟骨細胞に分化誘導される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Establishment of periodontal tissue regeneration therapy is important to understand the biological properties of the periodontal tissue component cells. We searched what kinds of phenotype cells is HPDL induced to differentiation by knocking down the specifically expressed transcription factors at periodontal tissue. Result of knock down specifically expressed Transcription factor at periodontal tissue (KLF12, Twist2 and Pax9), Sox5 mRNA expression level is increased, Sp7 mRNA expression level was decreased. we suggested that HPDL could be induced to differentiate into chondrocytes.

研究分野：歯周治療学

キーワード：転写因子

1. 研究開始当初の背景

骨形成前駆細胞は、組織構成に必要な細胞数を生成するために有糸分裂細胞周期をけている間、骨表現型を維持しなければならない。しかしながら、転写は細胞分裂期で停止し、ほとんどの調節因子が不活性化され、骨芽細胞における細胞分裂期の娘細胞において骨特異的遺伝子発現が抑制されている。細胞周期は M 期、G1 期、S 期および G2 期から構成され、Runx2 タンパク質量は G1 初期から中期にかけて増加し、その後、減少する事が報告されている。近年、骨芽細胞を用いた研究にて、細胞分裂時に Runx2 mRNA の発現が増加し、Runx2 タンパク質量は減少している事がわかってきている。これは骨芽細胞が骨表現型を維持するのに Runx2 が重要な因子である事を示している。このことから、転写因子の発現をコントロールする事により、ターゲットとした細胞を異なる細胞に誘導する可能性が示されている。

2. 研究の目的

今回、研究期間内に患者から採取したヒト歯周組織構成細胞（未分化間葉系細胞、骨芽細胞、歯根膜細胞および歯肉線維芽細胞）を用い、各々の細胞分裂期に優位に発現している転写因子を検索することにより、各々の細胞が表現型を維持するために重要な転写因子を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト未分化間葉系細胞 (HBMSC)、ヒト骨芽様細胞 (HOB)、ヒト歯根膜細胞 (HPDL) およびヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) は 37 °C、5%CO₂ インキュベーター内で培養する。HBMSC および HOB は 10% ウシ胎児血清および抗生物質 (100unit/ml ペニシリンおよび 100μg/ml ストレプトマイシン) を含む Minimum essential medium alpha medium (αMEM)、HPDL および HGF は 10% ウシ胎児血清および抗生物質 (100unit/ml

ペニシリンおよび 100μg/ml ストレプトマイシン) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培養液を用いる。100mm デイッシュに 300,000 cell になるように播種し、3 日後に 100ng/ml ノコタゾールにて 18 時間培養後、細胞を回収し、全 RNA、タンパク質を抽出し、Real-time PCR にて各種転写因子の RNA の発現量、Western Blot 法にてタンパク質量を検索する。さらに歯周組織構成細胞特異的な転写因子をノックダウンするために、siRNA および nsRNA を導入する 1 日前に細胞を 35 mm (6-well plate) に播種した。細胞が 40~60% コンフルエントの状態に達した時点で 100μM siRNA および nsRNA をオリゴフェクタミンを用いて細胞内に導入した。その後 10%FBS を含む α-MEM または DMEM 培養中で 68 時間細胞培養し、細胞を回収し、全 RNA を抽出する。Real-time PCR にて各種転写因子の RNA の発現量を検索し、各々の細胞がどのような細胞に分化誘導されるか検索する。

4. 研究成果

HOB、HPDL、HGF およびヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 (Saos2) を 100mm デイッシュに播種し、コンフルエント後、細胞回収し、全 RNA を抽出し、Real-time PCR にて各種転写因子の RNA の発現量を検索した結果、Saos2 に比較して HOB、HPDL および HGF では KLF12、Twist2 および Pax9 mRNA 発現量が多く (図 1~3)、Sox5 mRNA 発現量は少なかった (図 4)。

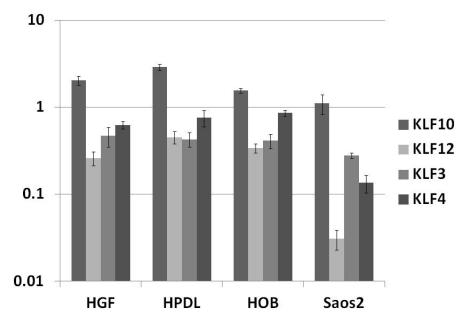


図 1 KLF ファミリー遺伝子の発現

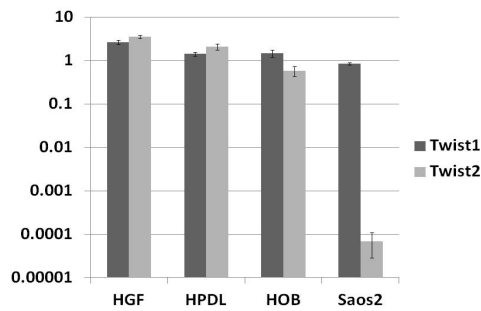


図2 bHLH 遺伝子の発現

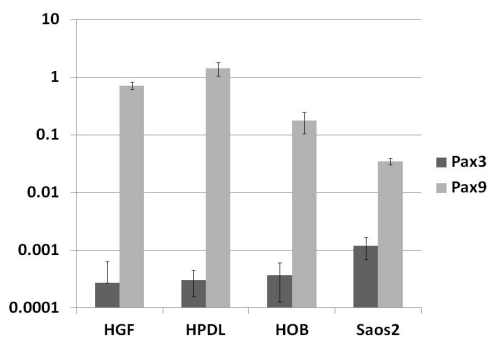


図3 Pax 遺伝子の発現

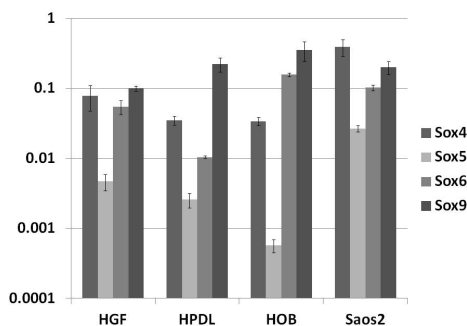


図4 Sox ファミリー遺伝子の発現

このことから、歯周組織構成細胞で3つの転写因子が重要であると考えられた。そこで3つの転写因子（KLF12、Twist2 および Pax9）の siRNA を歯周組織構成細胞にトランスフェクションし、細胞の分化誘導について検索した。siRNA をトランスフェクションした結果、HPDL にて KLF12、Twist2 および Pax9 mRNA 発現量は減少した（図5）。さらに、Sox5、Sox4 および Sox9 など

の Sox ファミリー遺伝子の発現量が増加し、Dlx3 および Sp7 などの骨芽細胞の分化に関わる転写因子の発現量が減少した（図6）。以上の結果から HPDL は歯周組織構成細胞特異的転写因子（KLF12、Twist2 および Pax9）を抑制する事で軟骨細胞に分化誘導されることが示唆された。

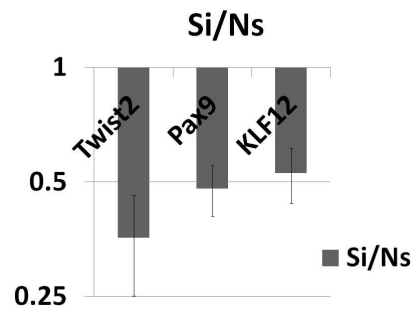


図5 HPDL に対する siRNA の効果

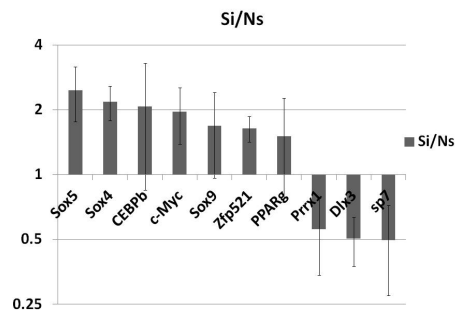


図6 siRNA による転写因子の発現

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 英樹 (TAKAI HIDEKI)
日本大学・松戸歯学部・助教
研究者番号：30453898

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：