

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25862060

研究課題名(和文)多色発光ベクターによるヒト歯根膜活性化薬物のハイスループット選別法の開発

研究課題名(英文)Multi-reporter assay system based high-throughput drug screening method for human periodontal ligament cell differentiation

研究代表者

鳥居 大祐(Torii, Daisuke)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：10548259

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)：歯周病で失われた歯周組織の回復には、欠損の程度に応じて組織再生誘導(GTR)法や補填材移植等が行われているが、これらの手法ではセメント質、歯根膜および歯槽骨を含む完全な歯周組織の再生には至らず、また、セメント質形成におけるセメント芽細胞分化機構の詳細については不明な点が多い。本研究では、正常および不死化ヒト歯根膜由来細胞から幹細胞マーカーを発現する細胞群を分取後、その石灰化能またはセメント芽細胞分化能を確認した。さらに、セメント芽細胞分化関連遺伝子の転写活性を多色発光で計測できるレポーターベクターをこれらの細胞へ導入し、セメント芽細胞分化誘導作用を持つ化合物のスクリーニングシステムを作製した。

研究成果の概要(英文)：Guided tissue regeneration techniques and grafting have been conducted according to the degree of tissue deficit caused by periodontal disease. However, these procedures do not lead to complete reconstruction of periodontal tissue containing alveolar bone, periodontal ligament, and cementum. Further, the details of cementoblast differentiation on cementum formation have not been clarified.

In this study, we sorted cells positive for multipotential stem cell markers from primary and immortal human periodontal ligament-derived cells, and confirmed their potency for mineralization or cementoblast differentiation. Furthermore, we developed a screening system for chemicals inducible cementogenesis by applying the cells transfected with multicolor reporter vectors to measure the transcriptional activities of cementoblast-related gene.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：歯根膜 幹細胞 セメント芽細胞 セメント質 BMP レポーターアッセイ 化合物ライブラリー 化合物スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病による歯の喪失の予防や、歯を喪失した際の欠損部補綴は、患者の QOL 改善において重要である。歯周病によって細菌感染や壊死を起こしたセメント質、歯根膜、歯槽骨あるいは歯肉結合組織の除去後にこれらの組織を回復させるには、従来、歯周外科治療のほか、組織欠損の程度に応じて人工補填材を埋入する術式や GTR 法等が選択されているが、これらの術式には人工補填材を定着させるという技術的な困難や、セメント質、歯根膜および歯槽骨を含む完全な歯周組織の回復には至らないという問題がある。

(2) 体性幹細胞を用いた研究では、腎臓間質などに由来する体性幹細胞を用いた *ex vivo* の実験でレシピエント動物の腎機能修復などが確認される段階にまで到達しており (Hishikawa K, *et al.*, 2005)、これらの体性幹細胞を標的とした薬物治療の可能性も示唆されている。

以前より、*in vitro* での多分化能や *ex vivo* での硬組織形成能を持つ歯根膜由来の細胞に関しては、ヒト歯根膜幹細胞 (PDLSCs) (Seo BM, *et al.*, 2004) の存在が示されているが、そのセメント芽細胞分化については数種のマーカー分子 (Saito M, *et al.*, 2001; Alvarez-Pérez MA, *et al.*, 2006) が報告されているほかは不明な点が多い。

このような知見から、まず、セメント芽細胞分化機構に関わる転写因子を明らかにすることが重要であり、その上で、歯周病治療において、歯根膜中に存在する体性幹細胞を活性化し適切に分化させることによりセメント芽細胞の分化と歯根表面へのセメント質再生を誘導し、かつ、細胞毒性のほとんど無い薬物を選定できるスクリーニングシステムを構築することが有用であると考え、本研究を遂行した。

(3) 近年、マウス不死化セメント芽細胞株 OCCM-30 (D'Errico JA, *et al.*, 1999)、ウシ不死化歯小囊細胞株 BCPb (Saito M, *et al.*, 2005) およびマウス不死化歯小囊細胞株 MDF (Yokoi T, *et al.*, 2007) などが相次いで樹立され、*in vivo* ならびに *in vitro* における分化能検証やルシフェラーゼアッセイによる転写活性測定などが行われているが、ヒト歯根膜由来株化細胞による安定した解析系の作製は報告されておらず、本研究結果は前臨床試験としての細胞分化誘導剤評価系の確立に向けた技術的推進に貢献できると予想される。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、セメント芽細胞分化関連遺伝子の転写活性を、各色ルシフェラーゼ発現ベクターを用いた発光の検出で計測することによる、高機能簡易型のマルチレポーターアッセイシステムを構築し、セメント芽細胞

分化誘導因子評価系の作製を目指したもので、このレポーターアッセイシステムにおいて、異なるシス応答性配列をそれぞれ挿入したベクターを併用することで、被験化合物の多角的同時評価が可能である。また、発光による検出のため、色素性試薬などについても試験できる。

(2) 本研究では歯根膜細胞に対する分化誘導能を持つ薬物のスクリーニングシステム構築を目指すため、ヒト歯根膜由来細胞を特定の幹細胞マーカーについて純化してアッセイに用いるよう実験を計画した。また、一定期間に継続して同様のアッセイを行い均質なデータを得られるように不死化細胞での実験を想定した。ヒト不死化歯根膜細胞について分取した幹細胞の多分化能を、同様に歯根膜由来正常細胞から分取した幹細胞と比較し確認後、recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP) -7 添加 (Kémoun P, *et al.*, 2007) によるセメント芽細胞分化誘導下の遺伝子発現変動を解析し、セメント芽細胞分化関連分子として着目すべき遺伝子について検証を行い、これらのデータから特定されたセメント芽細胞分化に関連する転写因子結合配列の下流に各色発光ルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーターコンストラクトを、ヒト不死化歯根膜幹細胞へ導入しスクリーニングに応用できるようなアッセイを試行した。ヒト歯根膜由来幹細胞をソーティングしてレポーターアッセイシステムに用いることで、解析系の不安定性を回避できると考えた。

(3) ヒト歯根膜幹細胞をセメント芽細胞へ分化誘導し、かつ、生体為害性のほとんど無い分化誘導剤を選出できれば、歯根膜幹細胞を標的とした薬物治療の実現に繋がるだけでなく、組織学的にセメント質および歯根膜に近似した構造体を形成誘導させて人工歯根の支持体として応用できる可能性がある。この技術的応用は、臨床的には、生理学的な咬合圧緩衝の要件を備えた新規構造を有する人工歯根作製につながると予想され、歯科補綴治療や歯周外科治療において、歯欠損部やその周囲組織への物理的侵襲や機械的ストレスの低い新たな治療法モデル開発に寄与できると思料される。

3. 研究の方法

(1) 骨髄間質や真皮で存在が報告されている多能性幹細胞に発現している表面抗原 stage-specific embryonic antigen (SSEA) -3 を発現する細胞群を、ヒト歯根膜由来細胞から分取し、それらのセメント芽細胞分化能および石灰化能を検証した。ヒト歯根膜由来正常細胞 (Pel) と、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子を導入し作製した不死化細胞 (PelT) (Tsutsui T, *et al.*, 2002) を fluorescence activated cell

sorting (FACS) 解析し、維持培養用培地で培養した後、分取前後の細胞について BMP-7 刺激による細胞分化を定量 RT-PCR と免疫染色で検証した。分化マーカーとしては、cementum attachment protein (CAP) および cementum protein 1 (CEMP1) を用いた。また、石灰化誘導培地で培養した上記のヒト歯根膜由来幹細胞をアリザリンレッド染色および電子線マイクロアナライザー (EPMA) で解析した。

(2) FACS によって分取した上記ヒト歯根膜由来幹細胞について、BMP-7 刺激後の遺伝子発現解析およびセメント芽細胞分化関連遺伝子のプロモーターアッセイを行い、BMP シグナルの関与について解析した。細胞分化に関連する遺伝子発現変動は DNA マイクロアレイ法と定量 RT-PCR で検討した。また、セメント芽細胞分化マーカーである CAP および CEMP1 のプロモーター領域について、Smad1 の結合配列として既に報告されている GC-SBE (GC-rich Smad binding element) (Morikawa M, *et al.*, 2011) を含むモチーフと GC-SBE を含まない部分欠損モチーフをそれぞれ挿入した各色発光ルシフェラーゼベクターを作製し、BMP-7 刺激下でのヒト歯根膜由来幹細胞におけるレポーター活性を計測した。レポーターアッセイは 96 ウェル白色プレート上で行い、ルシフェラーゼベクターとして pSLR (stable luciferase red) test vector (赤色発光、最大波長 630 nm) と pSLO (orange) test vector (橙色発光、最大波長 580 nm) の各色発光ベクターを使用し、発光値標準化用のコントロールベクター (緑色発光、最大波長 550 nm) を同時にリポフェクション法でトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に 200 ng/ml rhBMP-7 を投与した。レポーター活性変動の測定には色分離機構搭載マルチウェルプレート対応ルミノメーターを用いた。

4. 研究成果

(1) ヒト歯根膜由来細胞について FACS 解析を行った結果、PeI および PeIt では 99.0%以上が間葉系マーカー CD73、90、105 陽性であった。多能性幹細胞マーカーである SSEA-3 の陽性率は 0.8%以下であった。一方、BMP-7 刺激後 2 週目の細胞ではセメント芽細胞マーカーの CAP と CEMP1 の発現が上昇した。また、石灰化誘導後 3 週目ではアリザリンレッド陽性の結節様構造物が観察され、EPMA でカルシウムとリンが検出された。免疫染色の結果から、CD105 および SSEA-3 共陽性細胞の BMP-7 刺激後 2 週目の細胞では、CAP および CEMP1 が陽性であり、ヒト歯根膜由来細胞は少数の SSEA-3 陽性細胞を含みセメント芽細胞や石灰化能を有する細胞に分化し得ることを確認した。これらの特性は不死化後の細胞にも維持されていた。

(2) DNA マイクロアレイ法と定量 RT-PCR の結果、FACS で分取した上記ヒト歯根膜由来幹細胞において、BMP-7 刺激後 CAP および CEMP1 の発現が上昇した。BMP-7 刺激下では、骨芽細胞や象牙芽細胞の分化マーカーである bone sialoprotein (BSP)、dentin sialoprophosphoprotein (DSPP) および dentin matrix protein 1 (DMP1) の発現上昇は認められなかった。また、各色発光ルシフェラーゼベクターによって構築した pCAP-SLR ベクターと pCEMP1-SLO ベクターを併用した CAP と CEMP1 のプロモーターアッセイの結果、BMP-7 依存のレポーター活性上昇が認められたが、一方、GC に富む Smad 結合配列 GC-SBE を含まない部分欠損プロモーターベクターを導入した細胞では、BMP-7 依存のレポーター活性は抑制された (図 1. Torii D, *et al.*, 2016)。上記の結果より、ヒト歯根膜由来幹細胞にはセメント芽細胞分化能があり、このセメント芽細胞分化過程には Smad を介した BMP シグナルが関与することが示唆された。

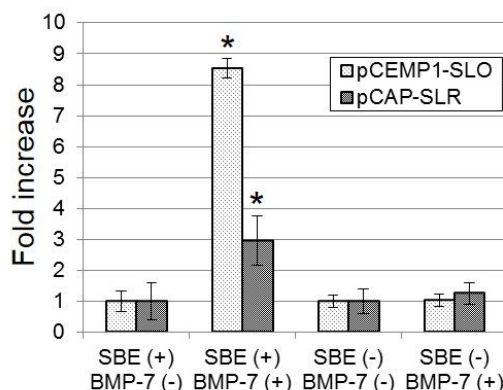


図 1. ヒト不死化歯根膜幹細胞における CAP と CEMP1 のプロモーター活性測定

以上より、本研究で作製・試行したマルチレポーターアッセイシステムは、ヒト歯根膜由来幹細胞に対するセメント芽細胞分化誘導剤の迅速スクリーニング法として応用できると考えられ、従来よりも低侵襲かつセメント質再生を誘導できる新たな歯周病治療法モデル開発に寄与できる可能性が思料される。

今後、利用可能な化合物ライブラリーのスクリーニングについて検討を行う予定としている。

<引用文献>

Musculin/MyoR is expressed in kidney side population cells and can regulate their function. Hishikawa K, *et al.*, J Cell Biol, 2005; 169: 921-8.

Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Seo BM, *et al.*, Lancet, 2004; 364: 149-55.

Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. Saito M, *et al.*, Bone, 2001; 29: 242-8.

Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). Alvarez-Pérez MA, *et al.*, Bone, 2006; 38: 409-19.

Immortalized cementoblasts and periodontal ligament cells in culture. D'Errico JA, *et al.*, Bone, 1999; 25: 39-47.

Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. Saito M, *et al.*, J Bone Miner Res, 2005; 20: 50-7.

Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. Yokoi T, *et al.*, Cell Tissue Res, 2007; 327: 301-11.

Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. Kémoun P, *et al.*, Cell Tissue Res, 2007; 329: 283-94.

Association of p16^{INK4a} and pRb inactivation with immortalization of human cells. Tsutsui T, *et al.*, Carcinogenesis, 2002; 23: 2111-7.

ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. Morikawa M, *et al.*, Nucleic Acids Res, 2011; 39: 8712-27.

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)

Bone morphogenetic protein 7 induces cementogenic differentiation of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells. Torii D, Tsutsui TW, Watanabe N, Konishi K. Odontology, 2016; 104(1): 1-9. doi: 10.1007/s10266-014-0182-1.

Cementogenic potential of multipotential mesenchymal stem cells purified from the human periodontal ligament. Torii D, Konishi K, Watanabe N, Goto S, Tsutsui T. Odontology, 2015; 103(1): 27-35. doi: 10.1007/s10266-013-0145-y.

[学会発表](計5件)

歯髄幹細胞マーカー同定のための網羅的遺伝子発現データ解析法の検討
小林朋子、鳥居大祐、筒井健夫
平成27年度日本歯科大学歯学会 第2回ウインターミーティング
平成27年12月5日
日本歯科大学(東京都千代田区)

培養ヒト歯根膜細胞におけるセメント芽細胞分化機構の解析

鳥居大祐、筒井健夫、古西清司
第56回歯科基礎医学会学術大会・総会
平成26年9月27日

福岡国際会議場(福岡県福岡市)

歯髄幹細胞からのクローンにおける分化能と網羅的遺伝子発現の差異

小林朋子、鳥居大祐、筒井健夫、筒井健夫
第56回歯科基礎医学会学術大会・総会
平成26年9月27日

福岡国際会議場(福岡県福岡市)

培養ヒト歯根膜細胞の特性と硬組織形成能の解析

鳥居大祐、古西清司、後藤真一、筒井健夫
第55回歯科基礎医学会学術大会・総会
平成25年9月22日

岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

歯髄細胞クローンの分化能の違いによる遺伝子発現の変動

小林朋子、鳥居大祐、筒井健夫、筒井健夫
第55回歯科基礎医学会学術大会・総会
平成25年9月22日

岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥居 大祐 (TORII, Daisuke)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号: 10548259