

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：82729

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670891

研究課題名(和文)ダウン症歯髄幹細胞からの骨芽細胞分化を用いた顎顔面頭蓋成長異常診断への応用

研究課題名(英文)Diagnosis of craniofacial disorders with dental pulp stem cells in Down syndrome

研究代表者

佐々木 康成 (SASAKI, YASUNORI)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：70332848

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文):上顎の劣成長に伴う反対咬合を有するダウン症2名と同年齢の健常人2名の交換期乳歯から歯髄組織を採取、歯髄細胞を培養した。通常の維持培地と骨分化培地を用いて10日間歯髄細胞を培養後、細胞回収、RNAを抽出、定量PCRを行った。21番染色体上のUSP16、DYRK1Aの発現が健常人と比較してダウン症患者において約1.5倍上昇、骨関連遺伝子の型コラーゲン(COL1A1、COL1A2)、Osteonectinの発現が有意に上昇した。これらの発現上昇は、ダウン症の上顎劣成長のメカニズムを説明するには、逆の現象であり、ダウン症の上顎劣成長に対しては、舌の突出など環境要因の働きが重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文):We investigated the signaling molecules regarding osteoblast growth and differentiation using dental pulp cells of Down syndrome patients with maxillary retrogression. The dental pulp cells were derived from primary tooth of two patients with Down syndrome and control individuals, respectively. The RNA samples were isolated from cultured cells. The mRNA expression levels of genes on chromosome21 and the developmental stages of osteoblast were quantified by real-time RT-PCR.As the results, in Down syndrome samples, expression levels of USP16 and DYRK1A on chromosome21 were upregulated at 1.5 fold. In addition, Collagen type1 genes and Osteonectin were significantly upregulated in Down syndrome.

The upregulation of Collagen type1 genes and Osteonectin in Down syndrome was a reverse phenomenon to explain the defection of maxillary growth of Down syndrome. The environmental factors such protrusion of tongue might work as the important ones in the defect of maxillary growth in the syndrome.

研究分野：小児歯科学

キーワード：ダウン症 上顎骨劣成長 歯髄幹細胞 骨芽細胞分化 mRNA

## 1. 研究開始当初の背景

ダウン症は、1000 名に 1 名の割合で出生し、日本では毎年 1200 名程度出生する頻度の高い染色体異常である。様々な全身合併症を背景として、摂食機能が未熟のまま成長することも多く、乳幼児期からの積極的な摂食機能育成の対象となっている。本症候群における不正咬合は顎顔面頭蓋の成長発育異常と深く関わっており、早期からの治療と訓練が摂食機能に良好な効果を及ぼすことが分かっている(Sasaki et al., 2010)。当院受診中のダウン症患者の摂食機能と歯列咬合についての調査を行ったところ、ダウン症の摂食機能促進のためには、機能に対する訓練とともに、健全な歯列咬合の評価と育成も重要であることが明らかになった。しかしながら、ダウン症においては、顎顔面頭蓋の骨格異常に関与する分子関与は不明である。

## 2. 研究の目的

ダウン症候群は、体細胞の 21 番染色体が 1 本余分に存在し、合計 3 本持つことにより発症する。ダウン症は様々な症状を呈し、心疾患、消化器系疾患、白血病等の血液疾患、てんかんが知られている。歯科領域では上顎の低形成に伴う反対咬合は知られているが、遺伝子発現レベルでダウン症患者の骨分化異常については、解明されていない。

21 番染色体が健常人の 1.5 倍になるため、過剰な遺伝子発現が起こる。21 番染色体の *DYRK1A*(dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A) は脳の発達に不可欠なセリン/スレオニンキナーゼで、この酵素の過剰活性化がダウン症病因となり、酵素阻害剤が治療に応用できる (Ogawa Y et al. Nat commun.:86:2010)。ダウン症候群のマウスモデルでは、21 番染色体上の *Usp16* (ubiquitin

specific peptidase 16) が造血幹細胞の増殖に重要な遺伝子であることがわかり、*Usp16* の発現を下げる薬剤が病態軽減につながる (Adorno M et al. Nature 501:2013)。また、21 番染色体の *DYRK1A* と *DSCR1* (regulator of calcineurin 1) の過剰発現が *NFATC1* (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1) という転写因子の働きを抑制し (Arron J. R. et al. Nature 441: 2006)、神経細胞の減少、脳の発生異常をきたす (Kurabayashi N et al. Genes Dev. 27:2013)。

今回我々は、骨系統の細胞に分化可能な歯髓細胞を用いて、ダウン症患者の骨芽細胞分化の関連遺伝子の解析を行った。

ダウン症 (21 番染色体トリソミー) 2 名および同年齢の健常人 2 名の脱落歯 (交換期乳歯) から歯髓組織を採取し、歯髓細胞培養を行った。通常の維持培地と骨分化培地を用いて 10 日間歯髓細胞を培養後、細胞回収、RNA を抽出、定量 PCR を行った。21 番染色体上の *USP16*, *DYRK1A* の発現が健常人と比較してダウン症患者において約 1.5 倍上昇、骨関連遺伝子の型コラーゲン (*COL1A1*, *COL1A2*)、Osteonectin の発現については有意な上昇が認められた。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯髓組織処理

インフォームドコンセントを行って得られた歯髓組織は抗生剤 / 抗真菌剤 (1% Penicillin-Streptomycin-Fungizone) 入りの Phosphate Buffered Saline  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  Free (PBS (-)) を用いてよく洗浄後、組織片をフラスコに接着させ、血清入り培地で 37 °C、5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub> の条件下で培養を開始した。

## (2) 培養と継代

維持培地 D-MEM(low glucose) +10%FBS+1%Penicillin-Streptomycin-Fungizone を用いた。3~4日に1回、全培地を交換した。1つのフラスコに出現した細胞を継代し、セミコンフルエント(70~80%)になるまで培養した。継代方法は、PBS(-)で洗浄後、0.25% Trypsin-1mmol/L EDTA・4Na 最少量添加(1フラスコ(25cm<sup>2</sup>)あたり 0.3mL)した。室温、1~2分で細胞が剥離した。血清入り培地で Trypsin 活性を止め、細胞を回収し、15mL 遠心管に移し、1000rpmで2分間遠心した。上清を吸引除去後、細胞沈渣をタッピングまたはピペティングでほぐし、細胞数を計測した。継代時の Split Ratioは1:3~4で行った。

## (3) 骨芽細胞分化誘導

ダウン症(21番染色体トリソミー)2名および同年齢の健常人2名の歯髓細胞を用いた。D-MEM(low glucose)+10%FBS に 1%Ascorbic acid(Takara MK430) 1%Ascorbic acid(Takara MK430) +2% Glycerphosphate(Takara MK430) を添加した。6 well plate の 1 well(9.2cm<sup>2</sup>) に 1×10<sup>5</sup>の歯髓細胞(passage-5)播種、2日間 D-MEM(low glucose)+10%FBS で培養後、とに培地を交換する。3日後に培地を交換し、合計10日間培養した。

## (4) RNA 抽出、cDNA 合成、定量的 PCR

との培地条件で培養した細胞から、NucleoSpin RNA II(Takara)で RNA を抽出、PrimeScript RT reagent Kit(Takara)を用いて cDNA を合成した。定量的 PCR により 21 番染色体上の *USP16*, *DYRK1A* の mRNA 発現、骨関連遺伝子(*ALP*, *COL1A1*, *COL1A2*, *BMP2*, *RUNX2*, *RUNX1*, *RANKL*, *M-CSF* Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin,

Osteoprotegerin) を調べた。標準遺伝子に TBP を用いた。Ct 法により、発現差を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 研究結果

ダウン症(21番染色体トリソミー)2名と同年齢の健常人2名について21番染色体上の *USP16* と *DYRK1A* の mRNA 発現を図1に示す。骨関連遺伝子の型コラーゲンの *COL1A1*, *COL1A2* と Osteonectin の mRNA 発現を図2に示す。

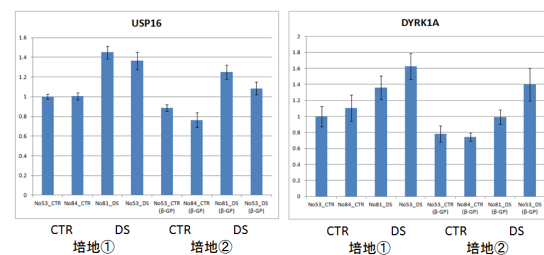


図1. *USP16* と *DYRK1A* の mRNA 発現

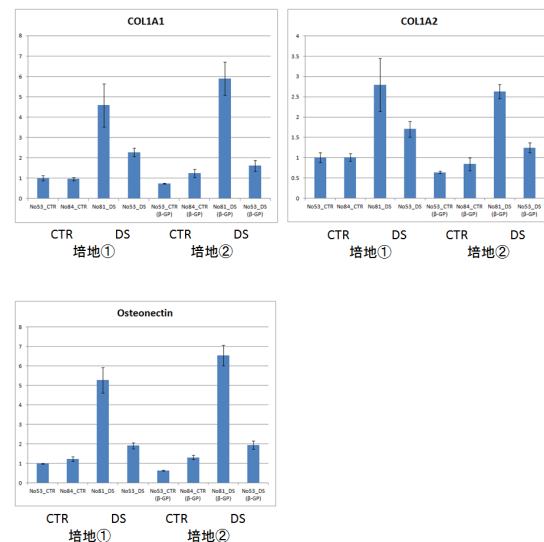


図2. *COL1A1*, *COL1A2* と Osteonectin の mRNA 発現

### (2) 考察

ダウン症患者(21番染色体トリソミー)2名および同年齢の健常人2名の乳歯由来の歯髓細胞を用いた。骨芽分化因子 -Glycerphosphate 添加あり、なしの両方の培

養条件で解析した結果、ダウン症患者において、21番染色体上の *USP16* と *DYRK1A* の mRNA の発現が約 1.5 倍上昇、骨関連遺伝子の型コラーゲン (*COL1A1*, *COL1A2*)、Osteonectin の発現については有意な上昇が認められた。*NFATC1* はダウン症で発現が低く、*ALP*, *M-CSF* については発現が高い傾向にあるが、解析した検体数が少ないため、検体数を増やして有意な差があるか確認する必要がある。*RUNX2*, *BMP2* については差が認められなかった。

ダウン症患者において発現が高かった Osteonectin は象牙芽細胞の分化初期における形態変化や増殖、象牙質の基質形成、石灰化に参与し、骨の石灰化の際、アパタイト形成の iniciator として働き、アパタイトとコラーゲンを結合させる役割を持つ (Termin J.D. et al. Cell;26:1981)。

ダウン症患者で発現上昇を認めた型コラーゲンは、前骨芽細胞、骨芽細胞、骨細胞に存在する。型コラーゲンの *COL1A1*, *COL1A2* は miR-29b によって制御されることが知られており、両遺伝子の 3' UTR に miR-29b が結合することで *COL1A1*, *COL1A2* 発現を負に制御する (Cheng J. et al. Am J Med Sci;324:2013)。

ダウン症における *COL1A1*, *COL1A2* 発現上昇は miR-29b の減少の可能性も考えられる。miR-29 は免疫系疾患にも関連することが知られている (Liston A. et al. Cell. Mol. Life Sci;13:2012)。

今後、検体数を増やし microRNA を含む RNA の発現解析を行い、発現変動遺伝子の算出、機能解析、さらにパスウェイ解析から原因遺伝子を探索する。

### (3) 結論

歯髄細胞を用いた骨系統疾患の解析はダウ

ン症患者の病態解明の有効性が示された。mRNA の発現上昇は、ダウン症の上顎劣成長のメカニズムを説明するには、逆の現象であり、ダウン症の上顎劣成長に対しては、舌の突出など環境要因の働きが重要であると考えられた。

### < 参考論文 >

Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. Ogawa Y, Nonaka Y, Goto T, Ohnishi E, Hiramatsu T, Kii I, Yoshida M, Ikura T, Onogi H, Shibuya H, Hosoya T, Ito N, Hagiwara M. Nat Commun. 2010 Oct 5;1:86.

Usp16 contributes to somatic stem-cell defects in Down's syndrome. Adorno M, Sikandar S, Mitra SS, Kuo A, Nicolis Di Robilant B, Haro-Acosta V, Ouadah Y, Quarta M, Rodriguez J, Qian D, Reddy VM, Cheshier S, Garner CC, Clarke MF. Nature. 2013 Sep 19;501(7467):380-4.

NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang CP, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef IA, Crabtree GR. Nature. 2006 Jun 1;441(7093):595-600

Increased dosage of DYRK1A and DSCR1 delays neuronal differentiation in neocortical progenitor cells. Kurabayashi N, Sanada K. Genes Dev. 2013 Dec 15;27(24):2708-21.

Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR.

Cell. 1981 Oct;26(1 Pt 1):99-105.

Identification of collagen 1 as a post-transcriptional target of miR-29b in skin fibroblasts: therapeutic implication for scar reduction.

Cheng J, Wang Y, Wang D, Wu Y.

Am J Med Sci. 2013 Aug;346(2):98-103.

MicroRNA-29 in the adaptive immune system: setting the threshold.

Liston A, Papadopoulou AS, Danso-Abeam D, Dooley J.

Cell Mol Life

Sci. 2012 Nov;69(21):3533-41

#### 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9件)

佐々木康成、佐久間秀二 ダウン症における歯列咬合治療と口腔機能の発達に関する研究、子ども医療センター医学誌、査読有(2015):vol.44、pp:123

高橋摩理、弘中祥司、久保寺友子、佐々木康成

Noonan 症候群に伴う摂食嚥下障害の1症例、障歯誌、査読有、Vol. 36、2015、No. 2、pp:118-123

doi.org/10.14958/jjsdh.36.118

Kouga T, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Yamakawa K, Osaka H.

Effect of CYP2C19 polymorphisms on stiripentol administration in Japanese cases of Dravet syndrome、Brain Dev、査読有、Volume 37、Issue 2、2015、pp:243-249

doi: 10.1016/j.braindev.2014.04.003.

Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H.

A three-year-old boy with glucose transporter type 1 deficiency syndrome presenting with episodic ataxia、

Pediatr Neurol、査読有、Volume 50、Issue 1、2014、pp:99-100.

doi:10.1016/j.pediatrneurol.2013.09.002

Tamura M, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Osaka H.

Seizure recurrence following pyridoxine withdrawal in a patient with pyridoxine-dependent epilepsy、Brain Dev、査読有、Volume 37、Issue 4、2015、pp:442-445.  
doi: 10.1016/j.braindev.2014.07.008.

Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H.

A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome、Mol Genet Metab Rep、査読有、Volume 1、2014、pp:133-138  
doi:10.1016/j.ymgmr.2014.02.006

Shimbo H, Ninomiya S, Kurosawa K, Wada T.

A case report of two brothers with ATRX syndrome due to low maternal frequency of somatic mosaicism for an intragenic deletion in the ATRX. J Hum Genet、査読有、Vol. 59 Issue 7 (2014) pp:408-410.

Ishibashi N, Sasaki Y, Asakura Y.  
Myhre Syndrome: A Rare Craniofacial  
Disorder. Journal of Craniomandibular  
Practice、査読有、Volume 32, Issue 4, 2014  
pp:300-306.

DOI:10.1179/0886963413Z.00000000024

Sasaki Y., Taya Y., Saito K., Fujita K.,  
Aoba T. and Fujiwara T.  
Molecular contribution to cleft palate  
production in cleft lip mice. Congenital  
Anomalies、査読有、Volume 54、 Issue 2、  
2014 pp:94-99.

doi: 10.1111/cga.12038.

〔学会発表〕(計3件)

Sasaki Y, Shimbo H, Taya Y,  
Diagnosis of osteoblast differentiation  
with dental pulp stem cells in Down  
syndrome、10<sup>th</sup> Biennial Conference of the  
Pediatric Dentistry Association of Asia、  
2016.5.26-28、Tokyo Dome Hotel  
(Bunkyo-ku,Tokyo)

Shimbo H, Kurosawa K, Okamoto N,  
Ninomiya S, Wada T. Molecular genetic  
study of 75 patients with ATR-X syndrome  
in Japan. 64th American Society of Human  
Genetics、2014.10.18-22、San Diego,USA

Sasaki Y, Shimbo H, Osaka H. Regulation  
of osteoblast derived from dental pulp  
cells of cleidocranial dysphasia. 9th  
Biennial Conference of PDAA、2014.8.22-24  
Singapore

〔図書〕(計1件)

佐々木康成 他、デンタルダイヤモンド社、  
これからの小児歯科医療における医科歯科  
連携、子どもの歯科医療の未来予想図、歯界  
展望、2015、43-47

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木康成 (SASAKI, Yasunori)  
神奈川県立こども医療センター・歯科・部長  
研究者番号: 70332848

(2)研究分担者

新保裕子 (SHIMBO, Hiroko)  
神奈川県立こども医療センター・臨床研究  
所・研究員  
研究者番号: 50724663

田谷雄二 (TAYA, Yuji)  
日本歯科大学・病理学教室・准教授  
研究者番号: 30197587

(3) 連携研究者

佐久間 秀二 (SAKUMA, Syuji)  
神奈川県立歯科大学横浜クリニック・矯正歯科・  
医員  
研究者番号: 00535429