



Title	歯根膜細胞の分化制御機構の解析
Author(s)	上田, 亜美
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/76298">https://hdl.handle.net/11094/76298</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 上 田 亜 美 )	
論文題名	歯根膜細胞の分化制御機構の解析
論文内容の要旨	
<p><b>【研究目的】</b></p> <p>歯周病は歯周組織が破壊される慢性炎症性疾患であり、原因である細菌バイオフィルムを取り除いただけでは、破壊された組織を元に戻すことはできない。そこで歯周病により失われた歯周組織欠損部に対して、残存歯周組織から細胞増殖・遊走等を誘導する歯周組織再生療法の開発が試みられ、臨床において一定の成果を挙げている。しかしながら、より重篤な症例にも対応可能で、予知性の高い歯周組織再生療法を開発するためには、歯周組織の恒常性維持機構をよりよく理解し、同機構を制御する因子を同定する必要がある。歯周組織の一つである歯根膜には、間葉系幹細胞 (MSC: Mesenchymal stem cell) や硬組織形成細胞の前駆細胞にあたる細胞群が存在し、それらの細胞は必要に応じて歯周組織を構成する細胞へと分化することで、歯周組織の恒常性維持を担っている。しかしながら、歯根膜MSCから硬組織形成細胞もしくは線維芽細胞への細胞分化がどのような分子機構により制御されているかについては不明な点が多く残されている。骨組織においてMSCが硬組織形成細胞へと分化する制御機構については解明が進みつつあり、例えばRunx2やSp7が骨形成に必須の転写因子であることが明らかにされているが、これらの転写因子を調節する補助因子も重要な役割を担っていることが示唆されている。このような因子を同定するための一法として、歯根膜から単離した細胞を<i>in vitro</i>にて石灰化誘導培地中で長期培養することでその硬組織形成能を評価し、硬組織形成能の高い前駆細胞と低い前駆細胞を比較検討する手法が考えられる。本研究では、まず成体マウス歯根膜から人為的な操作を行わずに純度よく歯根膜細胞を単離する初代培養法を確立し、初代培養マウス歯根膜由来の細胞集団から樹立した1細胞クローンのうち、硬組織形成能の異なる細胞の遺伝子発現を網羅的に比較することで、歯根膜細胞から硬組織形成細胞への分化制御機構を検索することを目的とした。</p> <p><b>【材料および方法】</b></p> <p>6週齢野生型マウスから抜去した第一臼歯近心根面より、0.5 mm径のスプーンキュレットを用いて、実体顕微鏡下で歯根膜片を一塊として採取した。同組織を100 ng/ml FGF-2含有培地で静置培養し、遊走増殖した細胞を初代培養マウス歯根膜細胞とした。さらに、この細胞集団からシングルセルソーティング法により1細胞由来のモノクローンを35個樹立した。得られたすべてのクローンを石灰化誘導培地 (10% FCS、10 mM β-glycerophosphate、50 μg/ml ascorbic acid含有α-MEM) にて16日間培養し、アリザリンレッドS染色による石灰化ノジュール形成を指標に石灰化能のスクリーニングを行い、硬組織形成能の低いものを3つ (Lowクローン) と高いものを3クローン (Highクローン) それぞれ選別した。次いで、これら6クローンを用いて、石灰化能の違いにより既知の分化関連メカニズムに差が見られるのかを検討した。具体的には、細胞形態観察、Flow Cytometry法による間葉系幹細胞/前駆細胞マーカーとして報告のある細胞表面抗原 (CD73、CD105、CD140a、CD140b) 解析、Real-time PCR法による石灰化関連遺伝子のmRNA発現解析、Western blot法によるタンパク発現解析、EdU取り込みによる細胞増殖の検討、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性測定を行い、HighクローンとLowクローンの比較検討を行った。その後、これら6クローンからそれぞれtotal RNAを抽出し次世代シーケンサーによるRNA-seq解析を行った。石灰化能の高いクローンで高発現する遺伝子について、RNAscope <i>in situ</i> hybridization法を用いて、歯根膜組織切片における同遺伝子のmRNAを検出した。さらに、CRISPR/Cas9とシングルセルソーティング法を用いてHighクローンより同遺伝子をノックアウトしたクローンを作製し、その硬組織形成能を検討した。またレンチウイルスを用いて、Lowク</p>	

ローンに同遺伝子を強発現させた細胞を作製し、同様にその硬組織形成能を検討した。

#### 【結果】

マウス歯根膜から採取した歯根膜片のmRNA発現を、歯肉由来のmRNAと比較すると、歯根膜マーカーとして報告のある *Plap-1*、*Periostin*、*Sclelaxis* の高い発現を認め、歯根膜が純度よく採取できていると考えられた。また、初代培養マウス歯根膜細胞を石灰化誘導培地にて培養し、8及び16日目でアリザリンレッドS染色を行ったところ、8日目、16日目ともに石灰化誘導群で石灰化ノジュールの形成が認められたことから、初代培養マウス歯根膜細胞に硬組織形成能の高い細胞が含まれていることが示唆された。次いで、35個のモノクローン細胞株から選別した6クローンについて、既知の分化関連メカニズムに差が見られるのかを検討した。細胞形態については、硬組織形成能の差で両者に違いは認めなかった。細胞表面抗原において、6クローンともにCD73、CD105、CD140aの高い発現を認めたが、CD140bは発現を認めなかった。さらにこれら各3クロンのFACS解析結果をMFI (mean fluorescence intensity) にて比較したところ、どの抗原の発現も、硬組織形成能の違いで有意差は認めなかった。細胞上清および細胞溶解液におけるALP活性については、いずれも両クローン間で有意差は認めず、石灰化に必須の酵素であるALPの酵素活性は石灰化誘導前には両クローンで同等であることが示唆された。細胞増殖能については、Lowクローンの方が高い傾向を示したが、統計学的に有意差は認めなかった。石灰化関連遺伝子のmRNA発現については、両クローンに有意差は認めなかった。骨形成に必須の転写因子であるRunx2のタンパク発現は6クローンともに認めたが、その下流のSp7の発現は認めず、いずれも両クローンに差は認めなかった。

硬組織形成能に明らかに差のある両クローンにおいて、既知の分化関連メカニズムに大きな差がなかったため、硬組織形成能に関与する遺伝子を網羅的に探索するために、Low、Highクローンの各3クローンから抽出したRNAを用いてRNA-seq解析を行った。硬組織形成能の明らかな違いにも関わらず、両クローンにおいてはほとんどの遺伝子発現に差はなく、非常に強い相関を示した。また、2倍以上の統計学的に有意な発現差を示す遺伝子を131個同定し、このうち転写因子関連遺伝子に着目したところ、分化能を制御している候補因子として、細胞質内の核酸センサーとして知られている *Z-DNA binding protein 1 (Zbp1)* を見出した。

マウス歯根膜に *Zbp1* 陽性細胞が存在するかどうかを検討するために、RNAscope *in situ* hybridization法を用いて、歯根膜における同遺伝子のmRNAの発現を検出した。*Zbp1* は、歯根膜全体にまばらに点在することが明らかとなった。次に単離した歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程における *Zbp1* タンパクの発現を検討した。Highクローンを石灰化誘導培地で培養し、全細胞画分における *Zbp1* タンパク発現を、Western blot法にて解析したところ、非誘導で培養し続けた場合は、*Zbp1* タンパクの発現の低下がみられたが、誘導群では、常に同程度に *Zbp1* タンパクを発現していることが明らかとなった。次に、Highクローンから *Zbp1* 遺伝子のノックアウトクローンを作製し石灰化誘導を行ったところ、野生型と比較してアリザリン染色陽性の石灰化ノジュール形成が遅延し、ALP活性は有意に低下した。さらにレンチウイルスを用いて、Lowクローンに同遺伝子を強発現させた細胞を作製し石灰化誘導を行ったところ、*Zbp1* 強発現株は対照群と比較して、石灰化ノジュールの形成が促進され、ALP活性は有意に増加した。

#### 【結論および考察】

初代培養マウス歯根膜細胞のクローン細胞株を樹立・解析したところ、その硬組織形成能の違いにも関わらず、解析したクローンは既知の分化関連メカニズムに差を認めなかった。RNA-seq解析による網羅的解析により同定された *Zbp1* 陽性細胞は、歯根膜中に点在する細胞であることが明らかとなった。さらに、同遺伝子を硬組織形成能の高い歯根膜細胞クローンよりノックアウトしたところ、その硬組織形成能が低下した。また同遺伝子を硬組織形成能の低い歯根膜細胞クローンに強発現させたところ、その硬組織形成能が亢進した。*Zbp1* は、硬組織形成細胞への分化を促進する制御因子であり、歯根膜中にはMSCから分化した様々な前駆細胞が存在する中で、*Zbp1* 陽性細胞は、骨芽細胞やセメント芽細胞への分化能の高い細胞であることが示唆された。今後 *Zbp1* のさらなる解析を通じて、歯根膜中のMSCおよび前駆細胞の分化を促進することが可能となり、歯周組織再生過程の活性化につながる基盤情報を得られるものと期待できる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 上 田 亜 美 )		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 村上 伸也
	副 査	教授 脇坂 聡
	副 査	准教授 野崎 剛徳
	副 査	講師 村上 智彦
<b>論文審査の結果の要旨</b>		
<p>本研究は、歯根膜に含まれる間葉系幹細胞や前駆細胞がどのような機構で硬組織形成細胞へと分化しているかを解明するために、成体マウスの歯根膜から初代培養歯根膜細胞およびシングルセル由来のクローンを樹立し、硬組織形成能の異なるクローンを比較することにより、その分化過程を制御する分子を探索したものである。</p> <p>その結果、樹立した硬組織形成能の高いクローンと低いクローンの細胞性状を詳細に解析した上で、遺伝子発現を網羅的に比較することにより、硬組織形成能の高いクローンで高発現する遺伝子 <i>Z-DNA binding protein 1 (Zbp1)</i> を見出した。さらに <i>in vivo</i> において <i>Zbp1</i> 陽性細胞は歯根膜中に点在していること、また <i>in vitro</i> における <i>Zbp1</i> 遺伝子の機能解析により、<i>Zbp1</i> が硬組織形成細胞への分化を促進していることを明らかとした。</p> <p>これらの研究結果は、<i>Zbp1</i> が歯根膜細胞の分化に与える影響を明らかにし、歯根膜細胞についての理解を深めると共に、より効率的な歯周組織再生療法開発のための重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。</p>		