

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11346

研究課題名(和文) RNA検出プローブを用いた新しい歯根膜幹細胞の単離方法の確立に関する研究

研究課題名(英文) Study on establishment of new periodontal ligament stem cell isolation method using RNA detection probe

研究代表者

川邊 紀章 (Kawanabe, Noriaki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00397879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ヒト歯根膜幹細胞に特異的に発現しているRNAを探索し、RNA検出プローブを用いて効率的にヒト歯根膜幹細胞を生細胞のまま同定・単離する方法を確立することである。本研究の結果、ヒト歯根膜幹細胞に特異的に発現しているRNAの一つとしてLRIG1を同定した。LRIG1のRNA検出プローブを用いてLRIG1陽性ヒト歯根膜細胞とLRIG1陰性ヒト歯根膜細胞を比較した結果、LRIG1陽性ヒト歯根膜細胞のほうが細胞増殖能が高く、in vitroにおける脂肪細胞および骨芽細胞分化能も高かった。このことから、LRIG1はヒト歯根膜幹細胞の同定に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to investigate RNAs specifically expressed in human periodontal stem cells, and to establish a method to efficiently isolate human periodontal stem cells as living cells using RNA detection probes. As a result, LRIG1 was identified as one of the RNAs specifically expressed in human periodontal stem cells. In addition, as a result of comparison between LRIG1 positive and LRIG1 negative human periodontal ligament cells using LRIG1 RNA detection probes, LRIG1 positive human periodontal ligament cells have higher cell proliferative capacity, and adipogenic and osteogenic differentiation capacity in vitro was also high. Therefore, it was suggested that LRIG1 is useful for identification of human periodontal stem cells.

研究分野：矯正歯科

キーワード：ヒト歯根膜幹細胞 RNA検出プローブ

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な病気に対する新しい医療として、再生医療への期待が高まってきている。再生医療とは、胎生期にしか形成されることのない臓器を、人工的に形成した組織あるいは臓器を用いて機能回復を図る医療である。最近では、骨髄をはじめとする様々な組織に幹細胞が存在することが分ってきている。この組織幹細胞は、胚性幹細胞と比較すると多分化能という点では劣るものの、自己由来の幹細胞を用いることができるため、倫理的問題や組織適合性などの問題を克服できるという利点がある。従って、この組織幹細胞を用いた臓器再生の研究が活発に行われている。

歯科領域においては、歯の細胞の中にも組織幹細胞が存在することが知られている。特に、矯正歯科治療において得られる健全抜去歯の細胞は、治療で得られた歯を利用するので、必要以上に侵襲的な処置を行うことなく利用できるという利点があり、組織幹細胞の供給源として魅力的である。

組織幹細胞を扱うためには、雑多な細胞集団の中にある幹細胞を同定・単離するための特異的マーカーを利用する必要がある。しかし、これまでに行われてきた歯根膜幹細胞の特異的マーカーに関する研究は限られている。これまでの国内・国外の研究では、歯の幹細胞を同定・単離するためにSTRO-1が有用であることが示されている。しかし、STRO-1抗原の発現は不安定であり、歯の細胞において発現が認められないという報告もある。申請者の実験でも、歯根膜細胞におけるSTRO-1の発現は1%前後しか認められなかった。このため、歯の幹細胞の同定・単離をより効率的に行うためには、STRO-1に替わる別の抗原を探す必要がある。

上記の状況を踏まえて、申請者らは、これまでに歯根膜幹細胞を同定・単離する方法を探索してきた。その結果、side population (SP) 法と、stage-specific embryonic

antigen(SSEA)-4を用いる方法を発見した。SP法を用いると歯根膜幹細胞をほぼ100%に純化できるが、細胞毒性のあるHoechst 33342を使用しなければならないという欠点がある。また、SSEA-4を用いる方法は、細胞表面抗原を用いる方法の中では優れているが、この方法による歯根膜幹細胞の純化効率は約60%であり、SP法に比べると劣る。しかし、利用できる細胞表面抗原の数は限られており、これ以上に条件のよい歯根膜幹細胞の特異的マーカーを探す事は困難であった。

しかし、近年、生細胞内でRNA発現の検出が可能でRNA検出プローブが開発され、細胞表面抗原に限らず細胞内に発現しているあらゆるRNAをマーカーとして利用できるようになった。このことから、ヒト歯根膜幹細胞に特異的に発現しているRNAを探索し、そのRNAに対する検出プローブを用いることによって、効率的にヒト歯根膜幹細胞を生細胞のまま同定・単離する方法が確立できるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、研究期間内に以下の内容について明らかにする。

- (1) ヒト歯根膜幹細胞に特異的に発現するRNAを明らかにする。
- (2) 目的のRNAに対する検出プローブを作成し、そのプローブを用いて単離した細胞が、多分化能を有するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ヒト歯根膜幹細胞に特異的に発現するRNAの網羅的解析を行う。

本研究では、岡山大学病院矯正歯科を受診した患者に対して説明と同意を行った後、治療上抜歯が必要であると診断された抜去歯の歯根膜細胞を実験に使用する。申請者らは、これまでの研究において、ヒト歯根膜幹細胞の同定・単離に関する研究を行ってきた。この研究結果を基に、以下の5通りの幹細胞と成

熟細胞の組み合わせをつくり、それぞれの組み合わせでマイクロアレイを行い、RNA 発現の違いを調べる。

SP 細胞 (幹細胞) と Non-SP 細胞 (成熟細胞)

SSEA-4 陽性細胞 (幹細胞) と SSEA-4 陰性細胞 (成熟細胞)

脂肪細胞分化誘導前の細胞 (幹細胞) と脂肪細胞分化誘導後の細胞 (成熟細胞)

骨芽細胞分化誘導前の細胞 (幹細胞) と骨芽細胞分化誘導後の細胞 (成熟細胞)

軟骨細胞分化誘導前の細胞 (幹細胞) と軟骨細胞分化誘導後の細胞 (成熟細胞)

これらの組み合わせで、5 つ全ての幹細胞集団に共通して高く発現している RNA をスクリーニングする。このスクリーニングの過程で出てきたもののうち、発現量の高い上位約 30 種類の RNA を候補とする。このマイクロアレイの結果を確認するために、これらの RNA の発現を RT-PCR でも確認する。

(2) RNA 検出プローブを作成する。

スクリーニングされた RNA に対する RNA 検出プローブを作成する。RNA 検出プローブ作成に際しては、メルクミリポア社の SmartFlare RNA 検出プローブを用いる。

(3) 目的 RNA を発現するヒト歯根膜細胞の幹細胞特性を調べる。

作成した RNA 検出プローブを用いて、目的の RNA を発現しているヒト歯根膜細胞が幹細胞特性を有しているかどうかを確認する。

フローサイトメトリーを用いて、目的の RNA を発現しているヒト歯根膜細胞が SP 領域に局在しているのか、また SSEA-4 陽性領域に局在しているのかを確認する。

目的の RNA を発現しているヒト歯根膜細胞を単離し、テロメア長および細胞増殖能が高いかどうかを調べる。

(4) 目的 RNA を発現するヒト歯根膜細胞の多分化能を調べる。

上記の過程の条件を全て満たした RNA に対する RNA 検出プローブを用いてヒト歯根膜細胞を単離し、単離した細胞が幹細胞としての多分化能を有しているかを確認する。

In vitro において、脂肪細胞・骨芽細胞・軟骨細胞への分化能を有しているかどうかを調べる。

In vivo において、異所性骨形成能を有するかどうかを調べる。

4. 研究成果

ヒト歯根膜幹細胞に特異的に発現する RNA を同定するために「SP 細胞 (幹細胞) と Non-SP 細胞 (成熟細胞)」「SSEA-4 陽性細胞 (幹細胞) と SSEA-4 陰性細胞 (成熟細胞)」「脂肪細胞分化誘導前の細胞 (幹細胞) と脂肪細胞分化誘導後の細胞 (成熟細胞)」「骨芽細胞分化誘導前の細胞 (幹細胞) と骨芽細胞分化誘導後の細胞 (成熟細胞)」「軟骨細胞分化誘導前の細胞 (幹細胞) と軟骨細胞分化誘導後の細胞 (成熟細胞)」の組み合わせの細胞を作成したので、それぞれから RNA を回収してマイクロアレイおよび RT-PCR による RNA 発現解析を行った。その結果、マイクロアレイおよび RT-PCR の何れにおいてもそれぞれの実験群で共通して未分化細胞集団に強く発現し、成熟細胞集団に発現していない RNA を検出することができた。これらの RNA の中から特に LRIG1 をヒト歯根膜幹細胞に特異的に発現している RNA の候補とした。LRIG1 の RNA 検出プローブを用いて LRIG1 陽性ヒト歯根膜細胞と LRIG1 陰性ヒト歯根膜細胞を比較した結果、LRIG1 陽性ヒト歯根膜細胞のほうが細胞増殖能が高く、in vitro における脂肪細胞および骨芽細胞分化能も高かった。このことから、LRIG1 はヒト歯根膜幹細胞に特

異的に発現する RNA であることが示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
特記事項なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

川邊 紀章 (KAWANABE, Noriaki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00397879

(2)研究分担者

片岡 伴記 (KATAOKA, Tomoki)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50580180

住吉 久美 (SUMIYOSHI, Kumi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80625161

削除平成27年9月24日

中村 政裕 (NAKAMURA, Masahiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20708036

(3)連携研究者

該当なし。

(4)研究協力者

該当なし。