

令和元年5月25日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20511

研究課題名(和文)高齢者のヒト歯髄細胞の分化能とiPS細胞樹立効率を向上させるための基礎的検討

研究課題名(英文)The recovery of differentiation capacity and iPS induction efficiency of elder patient's dental pulp cells.

研究代表者

飯田 一規 (IIDA, KAZUKI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30585237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：成熟した高齢者などの歯から得られたDPCs(歯髄細胞)は、他の細胞へ変化する分化能力やiPS細胞への誘導効率が低く、再生医療に応用するためには、改善が必要である。そこで我々はkey geneとしてSox11に注目し、DPCsに遺伝子導入して、分化能やiPS誘導効率が向上するか解析した。Sox11の導入で骨分化能が向上されることはなかったが、神経分化誘導では一部の神経分化マーカーに有意な上昇を認め、Sox11が歯髄細胞の神経分化に有用であることがわかった。また、iPS細胞誘導実験ではSox11導入により効率化することはなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DPCs(歯髄細胞)は、他の細胞へ変化する分化能力や万能細胞であるiPS細胞への高効率に変換する能力をもっているが、これは20代までの若年者のみであり、有病率の高い高齢者ではこれらの能力は低く、改善策が必要である。今回の研究ではkey geneとしてSox11に注目し、DPCsに遺伝子導入して、分化能やiPS誘導効率が向上するか解析した。結果として、Sox11はDPCsを神経細胞分化させるのに有用であることがわかり、神経再生などの研究や治療に役立つ可能性があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：DPCs (dental pulp cells) derived from elder patients were difficult to be used in a regenerative medicine, because of their low capacities of differentiation and induction to iPS cells. We thought gene introduction of Sox11, a key gene, to DPCs enhanced their capacities of differentiation and induction to iPS cells. Sox11 did not enhance differentiation capacity to osteoblast lineages, but nerve lineages. This suggests Sox11 may help DPCs to be nerve cells. And, Sox11 did not enhance induction efficiency to iPS cells.

研究分野：口腔外科学

キーワード：歯髄細胞 Sox11 骨分化 iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高い増殖能と分化能を有する「組織幹細胞」は歯髄にも存在することが報告されており(文献1)我々も再生医療への貢献を目的に、医療廃棄物として処理されていた抜歯後の智歯より歯髄細胞(Dental Pulp Cells : DPCs)を樹立し、基礎研究を行ってきた。若年者の、とりわけ未成熟歯牙から得られた DPCs は高い増殖能と分化能を有していたが、歯牙の成熟や加齢、継代培養により樹立効率や歯質形成などのステムネス性が低下したため、低酸素培養(3%O<sub>2</sub>)を用いてこれらを改善した(文献2・3)。また、2008年より京都大学山中研究室からの iPS 細胞誘導の技術提供を受け、若年者の DPCs から iPS 細胞を高効率に誘導したが(文献4)、高齢者 DPCs では誘導効率がかかなり低く、その改善策として誘導初期にのみ低酸素培養(3%O<sub>2</sub>)を行うことで、誘導効率を向上させることに成功した(文献5)。しかし、これらの改善方法は、その程度がかかなり小さく、高齢者の DPCs を再生医療へ応用させるのは依然として困難と考えられた。そこで我々は、DPCs のステムネス性に関する遺伝子を同定し、それを遺伝子導入することで、これを解決できないかと考えた。我々はすでに未成熟歯牙と成熟歯牙から得られた DPCs を遺伝子解析し、SoxC family の一つで転写因子である Sox11 に注目をした。Sox11 はマウスにおいて神経幹細胞や間葉系幹細胞に発現し、マウス骨芽細胞では Tead2 や Runx2、Osterix を介し、その生存や分化に影響を与えているが(文献6)、ヒト細胞での役割はあまり知られていない。我々は、ヒト DPCs において、Sox11 の発現量と歯質形成能および初期骨分化マーカーの発現量との間に相関性があることを把握しており、DPCs に Sox11 を遺伝子導入することにより、ステムネス性や iPS 細胞への誘導効率を向上できるのではないかと考えた。また、近年では、direct reprogramming として、key gene に Sox2、Klf4、Oct4 などの初期化遺伝子を組み合わせる方法が注目をされており(文献7)、DPCs のステムネス性向上にもこの手法を取り入れ、検討を行う。

### 2. 研究の目的

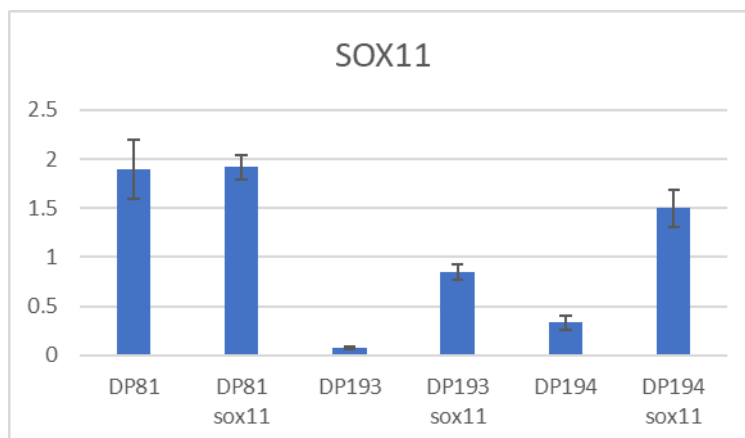
本研究では、DPCs に Sox11 を遺伝子導入し、増殖能や分化能、iPS 細胞への誘導効率の向上についての評価を行う。さらに、Sox2、Klf4、Oct4 の初期化遺伝子を組み合わせることにより、ステムネス性の更なる向上が得られるのかを検証する。

### 3. 研究の方法

- (1) DPCs に Sox11 を遺伝子導入し、増殖能や歯質形成能などの分化能が向上するか評価する。
- (2) Sox11 と、初期化遺伝子(Sox2、Klf4、Oct4)を組み合わせることで、増殖能や歯質形成能などの分化能が向上するか評価する。
- (3) Sox11 遺伝子導入 DPCs を iPS 細胞誘導させ、誘導効率が向上するかを評価する。

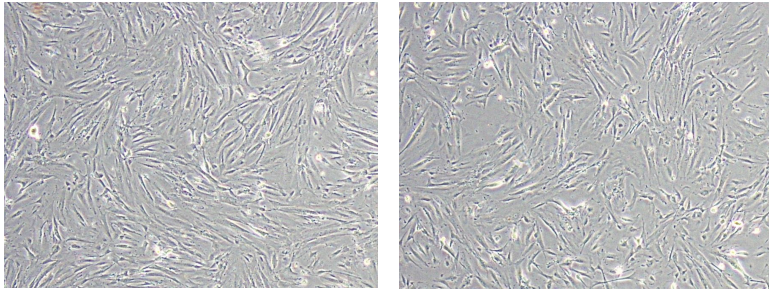
### 4. 研究成果

本研究では、ヒト Sox11 の二本鎖 DNA の合成と、レンチウイルスベクタープラスミド(pLVSI-NEO EF1 Neo Vector)への Sox11 の挿入を、(株)タカラバイオへ作成受託した。DPCs への Sox11 遺伝子導入はレンチウイルスにて行い、遺伝子挿入していないレンチウイルスベクタープラスミド(pLVSI-NEO EF1 Neo Vector)はコントロールとして用いた。遺伝子導入後の Sox11 発現量について、若年者の DPCs は有意な上昇を見せなかったが、高齢者の DPCs では約5倍から10倍に発現量が上昇した。若年者の DPCs は、そもそも内因性の Sox11 発現量がかかなり高く、外因性の影響が受けにくいのではないかと考えた。



左図：Sox11 の発現量  
DP81 : 16 歳  
DP193 : 60 歳  
DP194 : 52 歳

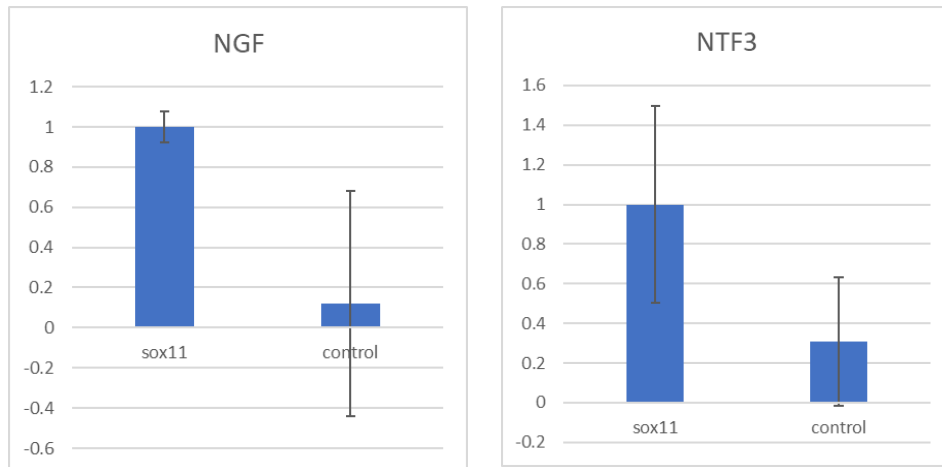
Sox11 を遺伝子導入した DPCs は、次頁に示すように、形態的にコントロール群と同じ紡錘形を呈し、増殖能も有意差はなかった。



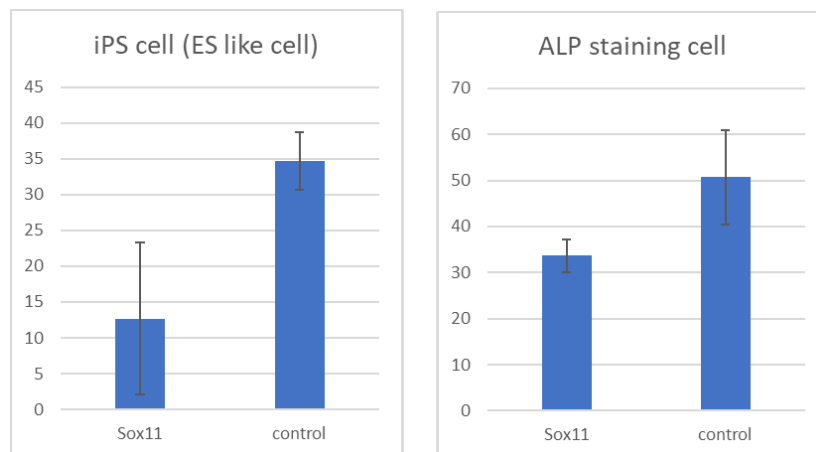
左図：遺伝子導入後の DPC s  
左：Sox11  
右：control

歯質・骨形成能を評価するため、骨分化誘導を行ったが、Sox11 導入群とコントロール群で骨分化マーカーである Osterix の発現量に有意差はなかった。次に、初期化遺伝子である Sox2 (S)、Oct4 (O)、Klf4 (K) をセンダイウイルスにて導入し、歯質・骨形成能が高まるかを調べた。Sox11+S、Sox11+OK、Sox11+KS の組み合わせで遺伝子導入したが、歯質・骨形成能が上昇することはなかった。このため、Sox11 遺伝子は DPC s において歯質・骨形成能との関係性が低いと考えられた。

Sox11 はマウスの神経幹細胞に発現することが知られており、DPC s 自身も神経分化能をもつことが報告されている。そこで、DPC s に Sox11 を遺伝子導入し、神経分化誘導を行ったところ、分化マーカーの BDNF (brain derived neurotrophic factor) や GDNF (Glial cell derived neurotrophic factor) には有意差がなかったが、下図に示すように NGF (nerve growth factor) と NTF3 (neurotrophin3) では有意な上昇を認め、Sox11 による神経分化能の向上が示唆された。



Sox11 遺伝子を導入することで iPS 細胞への誘導効率が向上するかを評価したが、下図に示すように Sox11 の遺伝子導入により、逆に誘導効率が低下する結果となった。これは上記のように Sox11 に神経分化傾向を高める働きがあり、iPS 細胞化における reprogramming の障害となったのではないかと考えられた。



これらの結果により Sox11 は DPC s において増殖能や骨分化能 (象牙質形成能) を高める作用がなく、また iPS 細胞への誘導効率を高める作用も認めなかった。しかしながら、神経分化能を高める作用が示唆され、今後は Sox11 の神経細胞誘導や神経再生治療への応用が期待されると考えられた。

< 引用文献 >

- 1) Gronthos S, Mankani M, et al. "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." PNAS 97(25), 13625-13630, 2000.
- 2) Takeda K, Tezuka K, et al. "Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs." J Dent Res 87(7), 676-681, 2008.
- 3) Iida K, Tezuka K, et al. "Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells." Arch Oral Bio 55, 648-654, 2010.
- 4) Tamaoki N, Tezuka K, et al. "Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking." J Dent Res 89(8), 773-778, 2010.
- 5) Iida K, Tezuka K, et al. "Hypoxia-enhanced derivation of iPSCs from human dental pulp cells." J Dent Res 92(10), 905-910, 2013.
- 6) Jogeswar G, Sung-Kil L, et al. "The transcription factor protein Sox11 enhances early osteoblast differentiation by facilitating proliferation and the survival of mesenchymal and osteoblast progenitors." J Biol Chem 288(35), 25400-25413, 2013.
- 7) Hiramastu K, Tsumaki N, et al. "Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors." J Clin Invest 121(2), 640-657, 2011.

5 . 主な発表論文等

〔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〕

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：川口 知子

ローマ字氏名：(KAWAGUCHI, tomoko)

研究協力者氏名：杉山 健

ローマ字氏名：(SUGIYAMA, ken)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。