

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11812

研究課題名(和文)新規マーカー解析による前駆細胞の機能に着目した歯髄再生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of dental pulp regeneration focusing on the function of progenitor cells by novel marker analysis

研究代表者

小林 朋子 (Kobayashi, Tomoko)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：10548283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、これまで明確に歯髄幹細胞と分別して解析されていなかった前駆細胞の機能に着目し、前駆細胞と幹細胞との相互作用による象牙質/歯髄複合体の再生メカニズムを解明することを目的として開始された。本研究課題では単一歯髄から分離したヘテロな細胞集団をもとに、シングルセル由来のクローンを用いてその細胞特性と網羅的遺伝子発現解析を組み合わせた独自の解析を行い、多分化能を指標とする幹細胞マーカー候補遺伝子9種類と、前駆細胞マーカー候補遺伝子5種類を新規に同定した。また、歯髄細胞集団における各マーカー候補遺伝子の発現を検証し、有用な候補遺伝子を絞り込んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、歯髄細胞集団の中で多分化能を持つ幹細胞様細胞と限定された分化能を持つ前駆細胞様細胞のマーカー候補遺伝子を絞り込むことに成功した。本研究で同定した新規マーカー候補遺伝子は、歯髄細胞集団中の幹細胞と前駆細胞を区別して両者の相互作用を解析することを可能にする。幹細胞と前駆細胞の相互作用による歯髄再生メカニズムを解明することで、歯髄の再生にかかる治療期間を短縮する方法の研究開発を進展させることができ、患者の負担軽減につなげることができる。

研究成果の概要(英文)：This study was initiated to focus on the functions of progenitor cells, which have not been analyzed separately from dental pulp stem cells, and to elucidate the mechanism of dentin/pulp complex regeneration through the interaction between progenitor cells and stem cells. In this study, based on a heterogeneous cell population isolated from a single dental pulp, we performed an original analysis combining cell characteristics and comprehensive gene expression analysis using single cell-derived clones and newly identified 9 candidate genes for stem cell markers and 5 candidate genes for progenitor cell markers. We also validated the expression of each candidate marker gene in the dental pulp cell population and narrowed down the list of useful candidate genes.

研究分野：再生歯学

キーワード：ヒト歯髄幹細胞 多分化能 マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト歯髄細胞をヌードマウスに移植すると象牙質/歯髄複合体を再生することが知られており、国内外では歯髄細胞を用いた臨床研究も始められている。しかし、正常な組織が再生されない場合や、再生効率のばらつき等の問題があり、象牙質/歯髄複合体の再生メカニズムの解明が待たれている。歯髄細胞の組織再生メカニズムが未だ不明な理由の一つとして、再生能を有する細胞群は種々の細胞が混在しているヘテロな細胞集団であることが挙げられる。我々は、再生能を有する歯髄細胞の中にも、多分化能を示す幹細胞様細胞や、分化能の限られた前駆細胞様細胞が混在し、それぞれ異なる細胞特性を有することをこれまで明らかにしてきた。ヘテロな細胞集団による象牙質/歯髄複合体の再生メカニズムを解明するためには、幹細胞と前駆細胞を分別して解析する必要があるが、両者が明確に分別されている報告は非常に少ない。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト歯髄細胞の象牙質/歯髄複合体の再生過程における前駆細胞の機能に着目し、幹細胞と前駆細胞との相互作用による象牙質/歯髄複合体の再生メカニズムを解明することを研究ゴールとして開始された。本研究課題では幹細胞と前駆細胞を分別して解析するためのマーカー遺伝子の候補を絞り込み、歯髄由来細胞の特性とマーカー候補遺伝子の発現との関係を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯髄細胞集団の特性解析と網羅的遺伝子発現解析

11歳女子由来単一埋伏智歯から分離したヘテロな歯髄細胞集団を用いて、限界希釈法によってシングルセル由来のMSCクローン集団を50株樹立し、それらの石灰化能、脂肪分化能、軟骨分化能を解析した。各クローンの多分化能の解析結果(ウェット実験)とDNAマイクロアレイ(Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST Arrays)による網羅的遺伝子発現解析(ドライ解析)を併用した独自の手法『ウェット&ドライ融合解析』により、新規の歯髄MSCマーカー候補遺伝子を探索・同定した。

(2) 歯髄細胞集団におけるマーカー候補遺伝子の発現検証

ヘテロな歯髄細胞集団中のマーカー候補遺伝子発現を検証するため、複数のドナー由来の歯髄細胞を用い、フローサイトメトリー、qRT-PCRによりマーカー候補遺伝子の発現を検証した。ドナー別に歯髄細胞集団の石灰化誘導の有無、あるいは継代数の違いによるマーカー候補遺伝子の発現の差異を解析した。

4. 研究成果

(1) 歯髄細胞集団の特性解析と網羅的遺伝子発現解析

単一歯髄由来の細胞集団から得た50クローンの多分化能を解析した結果より、石灰化能、脂肪分化能、軟骨分化能の3分化能を有する3クローン、石灰化能と軟骨分化能の2分化能を有する1クローン、石灰化能のみの1分化能を有する1クローンを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。解析の結果、3分化能を有するクローンで発現が高く、2分化能、1分化能の順に発現が低くなる遺伝子が754遺伝子あった。逆に3分化能を有するクローンで発現が低く、2分化能、1分化能の順に発現が高くなる遺伝子は473個であった。合計1227遺伝子の中から幹細胞関連遺伝子や分化関連遺伝子等を検索したところ、多分化能を指標とする幹細胞マーカー候補遺伝子群として90遺伝子が該当した。この中から細胞表面あるいは細胞外に発現し、発現量の高い遺伝子を選別することによりマーカー候補遺伝子を絞り込んだところ、幹細胞マーカー9種類、前駆細胞マーカー5種類がマーカー候補遺伝子として同定された(表1)。

表1 歯髄細胞の多分化能を指標とする新規マーカー遺伝子

幹細胞マーカー候補遺伝子	前駆細胞マーカー候補遺伝子
<i>ATP8B1, DSP, ICAM1, INHBA, NNAT, OXTR, SERPINE1, SORT1, SRGN</i>	<i>ADGRA2, ANTXR1, COL1A2, COL3A1, ITGA8</i>

(2) 歯髄細胞集団におけるマーカー候補遺伝子の発現検証

歯髄細胞集団中に含まれる歯髄幹細胞と歯髄前駆細胞の割合を知るため、フローサイトメトリーにより以下のマーカー分子の発現を解析した (ICAM1 (CD54)、ITGA8、CD105、CD90、CD73、CD14、CD79、CD34、CD45、HLA-DR、STRO-1、CD146)。フローサイトメトリーの解析には5継代目の歯髄細胞を用いた。その結果、5継代目の歯髄細胞集団では、本研究で新規幹細胞マーカー候補として同定した ICAM1 は約 30%の細胞で陽性であった。一方、新規前駆細胞マーカー候補の ITGA8 に陽性の細胞は 1%以下であった。また、歯髄細胞集団中の CD105、CD90、CD73 はそれぞれ 99%以上の細胞が発現していた。一方、CD14、CD79、CD34、CD45、HLA-DR を発現している細胞はそれぞれ 1%以下であった。なお、間葉系幹細胞マーカー分子として報告されている STRO-1 を発現している細胞は、5継代目の歯髄細胞集団中では 3.5%程度であり、CD146 を発現している細胞は 85%以上であった。上記の結果より、歯髄細胞集団は、通常培養条件下では間葉系幹細胞の表現型を示す細胞が大半を占め、前駆細胞様の表現型を示す細胞はわずかであることが明らかとなった。

歯髄細胞集団で、新規前駆細胞マーカー候補の ITGA8 陽性細胞の割合がフローサイトメトリーでは低く解析されることが判明したため、その他の新規マーカー候補遺伝子の発現の検証は qRT-PCR を用いて行った。歯髄細胞集団を石灰化誘導し、誘導前と誘導後の各マーカー候補遺伝子の発現を比較した。分化誘導前の細胞集団では幹細胞が多く、分化誘導後は前駆細胞が多くなると予測して解析を行った結果、幹細胞マーカー候補遺伝子のうち 4 種類 (*ATP8B1*、*NNAT*、*OXTR*、*SRGN*) が、石灰化誘導後と比較して石灰化誘導前の歯髄細胞集団で発現が高かった。また、前駆細胞マーカー候補遺伝子のうち 1 種類 (*ANTXR1*) が、石灰化誘導後と比較して石灰化誘導前の歯髄細胞集団で発現が低かった。さらに、継代を重ねた細胞集団では幹細胞性が低くなることが報告されているため、継代数の少ない細胞と多い細胞でマーカー候補遺伝子の発現を比較した。その結果、複数のドナー由来の歯髄細胞集団で、3 種類の前駆細胞マーカー候補遺伝子 (*ANTXR1*、*COL1A2*、*ITGA8*) の発現が、継代数の多い細胞では高く、継代数の少ない細胞では低いことが判明した。

以上の結果より、本研究では歯髄幹細胞の多分化能を指標として幹細胞と前駆細胞のマーカー候補遺伝子を探索・同定することに成功した。本研究で同定した新規マーカー候補遺伝子は、歯髄細胞集団中の幹細胞と前駆細胞との区別を可能にする。また、幹細胞と前駆細胞を区別して両者の相互作用を解析し、象牙質/歯髄再生メカニズムを解明することにより、歯髄の再生にかかる治療期間を短縮できる方法の研究開発を進展させることができ、患者の負担軽減につなげることができる。

なお、これまでの成果の一部は 2020 年 3 月に論文発表された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Tomoko, Torii Daisuke, Iwata Takanori, Izumi Yuichi, Nasu Masanori, Tsutsui Takeo W.	4. 巻 33
2. 論文標題 Characterization of proliferation, differentiation potential, and gene expression among clonal cultures of human dental pulp cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 490 ~ 501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-020-00327-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林朋子, 鳥居大祐, 岩田隆紀, 和泉雄一, 那須優則, 筒井健夫
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞由来クローン間における多分化能の差異を指標とする網羅的遺伝子発現解析.
3. 学会等名 日本組織培養学会 第92回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	那須 優則 (Nasu Masanori) (50130688)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	
研究分担者	筒井 健夫 (Tsutsui Takeo) (70366764)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------