

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09638

研究課題名（和文）歯髄幹細胞分化における転写因子ネットワーク機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of transcriptional regulatory mechanisms in dental pulp stem cell differentiation

研究代表者

藤本 勝巳 (Fujimoto, Katsumi)

広島大学・医系科学研究科（歯）・助教

研究者番号：40294566

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：MSX1, MSX2は歯髄幹細胞において象牙芽細胞/骨芽細胞分化促進、脂肪細胞分化抑制因子として機能していることが示唆された。また、その作用機構を解明するためにMSX1の下流で働く遺伝子群を網羅的に解析した。歯牙損傷刺激によって分泌される炎症性サイトカインTNF- α が歯髄幹細胞におけるMSX1発現を誘導したが、MSX2の発現には影響しなかった。免疫組織化学染色により、象牙質形成が活発な歯根の象牙芽細胞の核にMSX1とMSX2蛋白質が高発現していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、幹細胞を用いた再生医療が注目されている。その中で、歯髄再生の元になる体性幹細胞である歯髄幹細胞は、その優れた分化能のため再生医療の細胞源として様々な組織（歯髄、骨、神経、血管等）での利用が期待されている。歯髄幹細胞は他の体性幹細胞と比べ象牙芽細胞や神経細胞への分化能が高いなどの特徴を持つが、その分子メカニズムは不明である。転写因子による分化制御メカニズムの解明は、歯髄幹細胞の特徴を明らかにするために重要である。本研究の成果は、将来的に歯髄幹細胞を用いた細胞治療の効果的な利用に役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：It was suggested that MSX1 and MSX2 function as odontoblast/osteoblast differentiation-promoting and adipocyte differentiation-inhibitory factors in dental pulp stem cells. In addition, in order to elucidate the mechanism, we comprehensively analyzed a group of genes that act downstream of MSX1. Inflammatory cytokine TNF- α , which is secreted by tooth injury stimulation, induced MSX1 expression, but did not affect MSX expression, in dental pulp stem cells. Immunohistochemical analyses demonstrated that MSX1 and MSX2 proteins were highly expressed in the nuclei of odontoblasts in roots where dentin formation was active.

研究分野：生化学

キーワード：歯髄 幹細胞 転写因子 細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体性幹細胞は組織を修復・再生する能力を持つ細胞で、歯髄内にも存在している。う蝕や物理的損傷により歯が障害を受けると、前駆細胞や歯髄幹細胞が象牙芽細胞に分化し、歯髄内に反応象牙質や修復象牙質が形成され、組織が修復される。歯の修復・再生の仕組みを解明するためには歯髄幹細胞の分化機構を明らかにする必要がある。しかし、歯髄幹細胞は最近その存在が確認されたばかりで、生化学的特徴については不明な点が多い。また、歯髄幹細胞を再生医療の細胞源として利用するためにも、その分化能の特徴を分子レベルで解明することが重要となる。

申請者は歯髄幹細胞の特徴を明らかにするために DNA マイクロアレイ解析を行い、歯髄幹細胞特異的に高発現している遺伝子群を同定した。その中にはホメオボックス型転写因子である MSX1 と MSX2 が含まれており、その後の研究で MSX1 が歯髄幹細胞の象牙芽細胞 / 骨芽細胞分化に必須の因子である事を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯髄幹細胞の分化能の特性を分子レベルで明らかにすることである。MSX1, MSX2 は申請者らの研究で同定された歯髄幹細胞に高発現している遺伝子で、他の組織由来(骨髄、脂肪組織、関節滑膜)の体性幹細胞や皮膚線維芽細胞ではほとんど発現しておらず、歯髄幹細胞特有の細胞機能に関係していると予想される。本研究では、MSX1 に加えて歯髄幹細胞に特徴的に高発現する転写因子 MSX2 の歯髄幹細胞分化における役割を解明する。さらに、象牙質再生におけるこれら転写因子の役割を明らかにするために、歯牙組織における MSX1, MSX2 タンパク質の発現を *in vivo* で解析する。

3. 研究の方法

(1) MSX1 の作用機構を解明するために、MSX1 の下流で働く因子を DNA マイクロアレイによって網羅的に解析した。未分化状態の歯髄幹細胞を MSX1 siRNA で処理し MSX1 の発現をほとんど消失させ、その細胞から RNA を抽出し、コントロールの歯髄幹細胞(コントロール siRNA で処理した細胞)の RNA 発現量と比較した。

(2) siRNA によって MSX1 をノックダウンした歯髄幹細胞とコントロール siRNA で処理した歯髄幹細胞細胞を脂肪細胞分化誘導し、分化の程度を比較した。

(3) 免疫組織化学染色によって 3 週齢のマウスの上顎第 1 大臼歯および切歯における MSX1、MSX2 タンパク質の局在を解析した。

(4) 歯牙損傷刺激によって分泌される炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, TNF- α) や口腔内細菌由来の LPS 存在下で歯髄幹細胞を培養し、MSX1、MSX2 等の遺伝子発現に対する影響を解析した。

4. 研究成果

(1) NF331, ZNF730 などの zinc finger タンパク質や DACT1, WNT2, SHISA3, RPS6KA2 などのシグナルタンパク質をコードする遺伝子の発現が、MSX1 ノックダウンによって増加していた。一方、FOXO1 や FOXA1 などの転写因子、細胞間シグナル伝達に関わるセマフォリンファミリー遺伝子の発現が MSX1 ノックダウン細胞では低下していた。また、骨芽細胞に分化誘導した歯髄幹細胞では Wnt シグナルに関わる遺伝子やコレステロール代謝に関わる遺伝子の発現が MSX1 ノックダウンにより有意に影響された。

(2) 歯髄幹細胞の脂肪細胞への分化能に対する MSX1 の役割について解析した。オイルレッド O 染色で解析した結果、3 週間分化誘導したコントロール細胞はほとんど染色されず脂肪細胞への分化があまり進んでいなかったが、MSX1 ノックダウン細胞では大量の脂肪滴が細胞内に蓄積されていた。また脂肪細胞分化制御のマスター転写因子である SREBP1 や PPAR α 、脂肪細胞分化の後期マーカーである FABP4 (脂肪酸結合タンパク質) とペリリピン (脂肪滴表面タンパク質) の発現が MSX1 ノックダウン細胞と比べコントロール細胞で増加していた。

特に脂肪細胞の初期分化に関係する PPER の発現に対しては分化誘導の初期(1週間)に既に影響が見られ、MSX1 ノックダウン細胞ではコントロール細胞と比べ約2倍に増加した。これらの結果から、MSX1 は歯髄幹細胞において脂肪細胞分化の抑制因子として機能していることが示唆された。

- (3) 免疫組織化学染色によってマウス臼歯および切歯における MSX1、MSX2 タンパク質発現について解析した。

臼歯歯根の象牙芽細胞では核と細胞質の両方で MSX1 陽性なのに対し、冠状象牙芽細胞では細胞質でのみ弱い陽性反応を示した。一方、歯髄組織の中心にある血管を取り囲む歯髄間葉系細胞では核のみ MSX1 陽性を示した。MSX2 の場合、歯根部では象牙芽細胞の核が陽性を示したが、象牙芽細胞下層では弱い陽性反応を示した。また、歯冠部では、成熟象牙芽細胞の細胞質および象牙芽細胞下層の細胞の核が MSX2 陽性を示した。これらの結果は、象牙質形成が活発な根の象牙芽細胞の転写調節においては MSX1、MSX2 が機能しているが、象牙質形成がほぼ完了している冠状象牙芽細胞ではあまり働いていない可能性を示唆している。

切歯幼若象牙芽細胞において MSX1 発現が確認でき、分化と共にその強度が増加した。一部の細胞を除いて核での発現は認められないが、細胞突起基部に強い反応が見られた。MSX2 の場合、幼若象牙芽細胞の核が陽性を示したが、成熟象牙芽細胞では核の陽性が消失した。また、象牙芽細胞下層においては、エナメルに覆われた唇側象牙質では MSX2 陽性を示し、セメント質で覆われた舌側象牙質では発現レベルが低下していた。それぞれ、歯冠と歯根に相当するので、臼歯の所見と一致した。

- (4) TNF- α の刺激によって歯髄幹細胞の MSX1 発現が約5倍増加した。最近の研究で TNF- α 刺激を行なった歯髄細胞が骨芽細胞などへの分化能が高まることが指摘されており、MSX1 との関連が注目される。一方、MSX2 遺伝子に関しては、これらサイトカインや LPS 刺激による発現誘導は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nagata Toshiyuki, Minami Kentaro, Yamamoto Masatatsu, Hiraki Tsubasa, Idogawa Masashi, Fujimoto Katsumi, Kageyama Shun, Tabata Kazuhiro, Kawahara Kohichi, Ueda Kazuhiro, Ikeda Ryuji, Kato Yukio, Komatsu Masaaki, Tanimoto Akihideo, Furukawa Tatsuhiko, Sato Masami	4. 巻 22
2. 論文標題 BHLHE41/DEC2 Expression Induces Autophagic Cell Death in Lung Cancer Cells and Is Associated with Favorable Prognosis for Patients with Lung Adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11509 ~ 11509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222111509	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 -
1. 著者名 Kanawa Masami, Igarashi Akira, Fujimoto Katsumi, Saskianti Tania, Nakashima Ayumu, Higashi Yukihiro, Kurihara Hidemi, Kato Yukio, Kawamoto Takeshi	4. 巻 43
2. 論文標題 The Identification of Marker Genes for Predicting the Osteogenic Differentiation Potential of Mesenchymal Stromal Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Issues in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 2157 ~ 2166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb43030150	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 該当する
1. 著者名 Ono Daisuke, Honma Ken-ichi, Schmal Christoph, Takumi Toru, Kawamoto Takeshi, Fujimoto Katsumi, Kato Yukio, Honma Sato	4. 巻 11
2. 論文標題 CHRONO and DEC1/DEC2 compensate for lack of CRY1/CRY2 in expression of coherent circadian rhythm but not in generation of circadian oscillation in the neonatal mouse SCN	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98532-5	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 -
1. 著者名 Noshiro Mitsuhide, Kawamoto Takeshi, Nakashima Ayumu, Ozaki Noritsugu, Saeki Masayumi, Honda Kiyomasa, Fujimoto Katsumi, Kato Yukio	4. 巻 25
2. 論文標題 DEC1 regulates the rhythmic expression of PPAR target genes involved in lipid metabolism in white adipose tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 232 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanawa Masami, Igarashi Akira, Fujimoto Katsumi, Ronald Veronica Sainik, Higashi Yukihito, Kurihara Hidemi, Kato Yukio, Kawamoto Takeshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Potential Marker Genes for Predicting Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 2942 ~ 2942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app9142942	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 該当する

1. 著者名 Noshiro Mitsuhide, Kawamoto Takeshi, Nakashima Ayumu, Ozaki Noritsugu, Saeki Masayumi, Honda Kiyomasa, Fujimoto Katsumi, Kato Yukio	4. 巻 -
2. 論文標題 DEC1 regulates the rhythmic expression of PPAR target genes involved in lipid metabolism in white adipose tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanawa Masami, Igarashi Akira, Fujimoto Katsumi, Higashi Yukihito, Kurihara Hidemi, Sugiyama Masaru, Saskianti Tania, Kato Yukio, Kawamoto Takeshi	4. 巻 2018
2. 論文標題 Genetic Markers Can Predict Chondrogenic Differentiation Potential in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/9530932	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 該当する

1. 著者名 Noshiro Mitsuhide, Kawamoto Takeshi, Nakashima Ayumu, Ozaki Noritsugu, Ueno Toshinori, Saeki Masayumi, Honda Kiyomasa, Fujimoto Katsumi, Kato Yukio	4. 巻 23
2. 論文標題 Deficiency of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 prevents obesity induced by a high-fat diet in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 658 ~ 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12607	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 -

1. 著者名 Fujii Sakiko, Fujimoto Katsumi, Goto Noriko, Abiko Yoshimitsu, Imaoka Asayo, Shao Jinchang, Kitayama Kazuko, Kanawa Masami, Sosiawan Agung, Suardita Ketut, Nishimura Fusanori, Kato Yukio	4. 巻 8
2. 論文標題 Characterization of human dental pulp cells grown in chemically defined serum-free medium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 350 ~ 358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2018.1066	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 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 金輪真佐美、五十嵐晃、藤本勝巳、東幸仁、栗原英見、加藤幸夫、河本健
2. 発表標題 骨髄由来MSCの脂肪分化予知遺伝子マーカーの同定
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金輪 真佐美、五十嵐 晃、藤本 勝巳、東 幸仁、栗原 英見、杉山 勝、加藤 幸夫、河本 健
2. 発表標題 3D解析による骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨分化予知遺伝子マーカーの研究
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masami Kanawa, Akira Igarashi, Katsumi Fujimoto, Tania Saskianti, Ayumu Nakashima, Yukihiro Higashi, Hidemi Kurihara, Yukio Kato, Takeshi Kawamoto
2. 発表標題 Identification of Marker Genes for Predicting the Osteogenic Differentiation Potential of Mesenchymal Stromal Cells
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金輪真佐美, 五十嵐 晃, 藤本勝巳, Veronica Sainik Ronald, Tania Saskianti, 中島 歩, 東 幸仁, 栗原英見, 加藤幸夫, 河本 健
2. 発表標題 骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の骨、軟骨、脂肪分化予知マーカー遺伝子の同定
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022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	佐藤 冬樹 (Sato Fuyuki) (60400131)	静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員 (83802)	
研究分担者	金輪 真佐美(福永真佐美) (Kanawa Masami) (00284208)	広島大学・自然科学研究支援開発センター・助教 (15401)	

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
---------	---------