

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10406

研究課題名(和文)細胞増殖から分化への転換に関連するミトコンドリア活性制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mitochondrial activity regulation linked to the conversion from cell proliferation to differentiation

研究代表者

加藤 大樹 (Kato, Hiroki)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：30452709

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)：細胞の分化転換に、ミトコンドリア活性が関与することが明らかにされつつあります。しかし、分化転換時のミトコンドリア活性化機構の全容は解明されていません。私達は、高増殖能と多分化能を有するヒト脱落乳歯由来幹細胞を分化モデルとして、分化転換時のミトコンドリア活性化機構の解析を行いました。ヒト脱落乳歯由来幹細胞の神経細胞へ分化させて、分化前後で遺伝子の発現を比較した結果、いくつかのミトコンドリア活性調節に関わる遺伝子の発現が変動する事がわかりました。これら遺伝子が、ヒト脱落乳歯由来幹細胞の分化転換を制御している可能性が考えられます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、ヒト脱落乳歯由来幹細胞を始めとした幹細胞を用いた組織・器官の再生医学を促進する基盤データになると考えます。近年の研究により、ミトコンドリアの機能低下が様々な難病の病態と関係することが明らかになってきました。しかし、その多くで有効な治療法が開発されていません。本研究成果は、これら難病の新規病態解明や治療法開発に応用可能であると考えます。

研究成果の概要(英文)：It is becoming evident that mitochondrial activity is involved in cellular differentiation. However, the entire mechanism of mitochondrial activation during differentiation is still elusive. We analyzed the mechanism of mitochondrial activation during differentiation using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED), which have high proliferative and multilineage differentiation potential, as a differentiation model. We compared gene expression before and after SHED differentiation into neurons and discovered that the expression of several genes involved in mitochondrial activity regulation was altered. Therefore, these genes may have a role in SHED differentiation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ヒト脱落乳歯由来幹細胞 細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

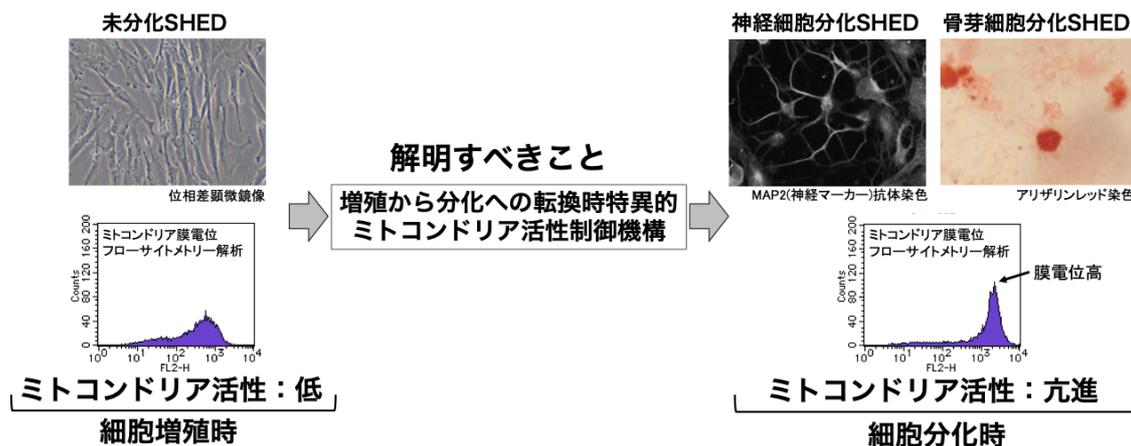
個体の発生過程では、細胞が増殖を繰り返しがたて分化することで組織・器官が形成されます。この細胞の増殖から分化への転換には、ミトコンドリア活性の亢進が関与していることが明らかになってきました。ミトコンドリアから産生される ATP や活性酸素種による、遺伝子の発現変動や細胞の形態変化が、細胞の増殖から分化への転換に必須であると考えられています。

私達は、ヒト脱落乳歯由来幹細胞 (SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth) を用いて、ミトコンドリア活性と細胞分化について研究を行ってきました。SHED は高い増殖能と多分化能を持ち、調製に遺伝子導入を必要としないため、癌化の恐れが低く、安全性の高い細胞移植治療への可能性を秘めた幹細胞です。また iPS 細胞 (Induced pluripotent stem cells) や ES 細胞 (embryonic stem cells) の目的細胞への分化には胚葉分化を経る複雑な過程が必要ですが、SHED は目的の細胞に直接分化誘導が可能のため、分化前後のミトコンドリア活性を比較するような研究に最適な幹細胞です。

私達は、SHED の神経細胞分化誘導後、継時的にミトコンドリア活性が亢進することや、ミトコンドリア呼吸阻害剤が神経細胞分化を阻害することを明らかにしていました (Kato et. al., Cell Struct. Funct. 2017)。さらに、ミトコンドリア活性低下が病因のミトコンドリア病の一種の Leigh 脳症患児由来 SHED は、ミトコンドリア活性が低く、骨芽細胞への分化が低下していることを明らかにしていました (Kato et. al., BBRC 2017)。

分化に伴いミトコンドリア活性は亢進することから、分化への転換時にミトコンドリア活性を亢進する機構の存在が考えられますが、その全容は明らかにされていません。そこで本研究では SHED を細胞モデルとして、分化へと転換する際のミトコンドリア活性制御に関わる機構の解析を行いました。

### 2. 研究の目的



本研究では、細胞増殖から分化への転換時に特異的なミトコンドリア活性制御機構を解明することを研究目的としました。

高増殖能と多分化能を持ち、目的細胞へ直接分化可能な SHED を活用して解析を進めました。細胞増殖から分化への転換時の遺伝子発現を解析し、分化時特異的に発現しミトコンドリア活性に関わる因子群の同定を研究の柱とし、ミトコンドリア活性を視点とした細胞分化機構の解析を行いました。

### 3. 研究の方法

#### (1) SHED の調製と培養

乳歯から歯髄を単離し、SHED を調製しました。SHED は増殖用培地 (5%ウシ胎児血清 [Sigma-Aldrich]、100 μM L-ascorbic acid 2-phosphate [富士フイルム和光純薬]、250 μg/mL ファンギゾン [ThermoFisher Scientific]、100 U/mL ペニシリン [ThermoFisher Scientific]、100 μg/mL ストレプトマイシン [ThermoFisher Scientific] を含む Eagle's Minimal Essential Medium, Alpha Modification [ナカライテスク]) 中で、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で培養しました。

SHED を用いた研究は、九州大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従って行いました (許可番号 678-03)。

#### (2) SHED の神経細胞分化

5x10<sup>5</sup> 個の SHED を 10 cm 培養皿に播種し、増殖用培地で 1 日培養しました。培地を増殖用培地から、分化培地① (1% N2 supplement [ThermoFisher Scientific]、20 ng/ml basic fibroblast growth factor 2 [Peprotech]、20 ng/ml epidermal growth factor [Peprotech] を含む

Dulbecco's Modified Eagle Medium [ナカライテスク])に交換し、2日間培養しました。その後分化培地①を② (2% B27 supplement [ThermoFisher Scientific]、1 mM dibutyryl-cAMP [ナカライテスク]、0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine [富士フイルム和光純薬]、200  $\mu$ M ascorbic acid [ナカライテスク]を含む neurobasal medium [ThermoFisher Scientific])に交換し、5日間培養して神経細胞を調製しました。

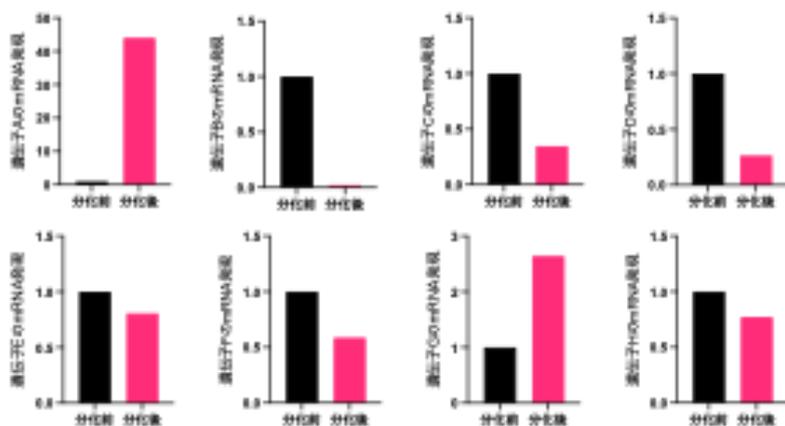
### (3) 遺伝子発現解析

細胞を回収し、全RNAをRNeasy mini kit (Qiagen)で調製しました。mRNA シークエンスおよび定量的PCRを行い、神経分化前後のSHEDの遺伝子発現を比較しました。またウェスタンブロッティングを行い、mRNA シークエンスと定量的PCRで発現が変動した遺伝子のタンパク質レベルでの発現を解析しました。

## 4. 研究成果

mRNA シークエンス法で神経細胞分化前後のSHEDの網羅的な遺伝子発現解析を行いました。その結果、いくつかのミトコンドリア活性調節に関わる遺伝子の発現変動が分化前後で確認されました。

mRNA シークエンス法で同定された遺伝子の発現を、定量的PCRとウェスタンブロッティングで再検証しました。その結果、一部の遺伝子はmRNA シークエンス、定量的PCR、ウェスタンブロッティングの結果が一致しませんが、大部分は再検証することができました。これらのSHEDの神経分化にともない発現が変動する遺伝子群が、分化時のミトコンドリア活性を制御している可能性が考えられます。



SHED神経分化前後のミトコンドリア活性調節に関わる遺伝子の発現解析(定量的PCR)

本研究の成果は、細胞増殖から分化への転換機構に関する基盤データを提供し、組織・器官の再生医学を促進すると考えます。加えて、本研究で同定された因子群は、ミトコンドリア機能低下により引き起こされる疾患の創薬ターゲットとして活用可能であると考えます。

### <引用文献>

Kato, H., Pham, T.M.T., Yamaza, H., Masuda, K., Hirofuji, Y., Han, X., Sato, H., Taguchi, T., Nonaka, K. Mitochondria regulate the differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. (2017) Cell Struct Funct. 42:105-116

Kato, H., Han, X., Yamaza, H., Masuda, K., Hirofuji, Y., Sato, H., Pham, T.M.T., Taguchi, T., Nonaka, K. Direct effects of mitochondrial dysfunction on poor bone health in Leigh syndrome. (2017) Biochem Biophys Res Commun. 493:207-212

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Sun Xiao, Kato Hiroki, Sato Hiroshi, Han Xu, Hirofuji Yuta, Kato Takahiro A., Sakai Yasunari, Ohga Shouichi, Fukumoto Satoshi, Masuda Keiji	4. 巻 -
2. 論文標題 Dopamine related oxidative stress and mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons differentiated from deciduous teeth derived stem cells of children with Down syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	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） 10.1096/fba.2021-00086	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 Sun Xiao, Kato Hiroki, Sato Hiroshi, Torio Michiko, Han Xu, Zhang Yu, Hirofuji Yuta, Kato Takahiro A., Sakai Yasunari, Ohga Shouichi, Fukumoto Satoshi, Masuda Keiji	4. 巻 26
2. 論文標題 Impaired neurite development and mitochondrial dysfunction associated with calcium accumulation in dopaminergic neurons differentiated from the dental pulp stem cells of a patient with metatropic dysplasia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100968 ~ 100968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.100968	査読の有無 無
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 Masuda Keiji, Han Xu, Kato Hiroki, Sato Hiroshi, Zhang Yu, Sun Xiao, Hirofuji Yuta, Yamaza Haruyoshi, Yamada Aya, Fukumoto Satoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells for Modeling Genetic Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2269 ~ 2269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22052269	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 孫 梟, 加藤 大樹, 韓 旭, 張 虞, 佐藤 浩, 加藤 隆弘, 酒井 康成, 大賀 正一, 福本 敏, 増田 啓次
2. 発表標題 Developmental defects of dopaminergic neurons derived from children with Down syndrome
3. 学会等名 日本小児神経学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 孫 梟， 加藤 大樹， 佐藤 浩， 鳥尾 倫子， 韓 旭， 張 虞， 廣藤 雄太， 加藤 隆弘， 酒井 康成， 大賀 正一， 福本 敏， 増田 啓次
2. 発表標題 Impaired neurite development and mitochondrial dysfunction associated with calcium accumulation in dopaminergic neurons differentiated from the dental pulp stem cells of a patient with metatropic dysplasia
3. 学会等名 日本神経精神薬理学会年会・日本生物学的精神医学会年会・日本精神薬学会総会・学術集会合同年会
4. 発表年 2020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 浩  (Sato Hiroshi)  (00421313)	九州大学・歯学研究院・助教   (17102)	
研究分担者	高山 扶美子  (Takayama Fumiko)  (20795950)	九州大学・大学病院・助教   (17102)	
研究分担者	増田 啓次  (Masuda Keiji)  (60392122)	九州大学・大学病院・講師   (17102)	
研究分担者	廣藤 雄太  (Hirofujii Yuta)  (80759746)	九州大学・歯学研究院・助教   (17102)	

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