

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592169

研究課題名（和文）転写因子による歯根膜由来間葉系幹細胞の増殖・分化調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms underlying regulation of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells derived from periodontal ligament

研究代表者

石崎 明（ISHISAKI AKIRA）

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：20356439

研究成果の概要（和文）： 間葉系幹細胞様の性質を持つ歯根膜由来細胞とその性質を持たない同細胞を比較したところ、複数の転写因子の発現が、間葉系幹細胞様の性質を持つ歯根膜由来細胞で亢進していることが判明した。これらの転写因子の中には、各種幹細胞の増殖・分化を制御するという報告のあるものが複数存在しており、現在、その役割について確認中である。加えて、この細胞の分化能力制御には、FGF、TGF- β 誘導性細胞内シグナル伝達経路が重要な役割を担うことが判明した。今回の研究により、歯根膜中の間葉系幹細胞の増殖・分化を制御する分子メカニズムの主要な部分が解明された。

研究成果の概要（英文）： To elucidate molecular mechanisms underlying the regulation of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from periodontal ligament (PDL), we established two types of single cell-derived cultures (SCDCs) of rat ligament cells, one of which named as SCDC2 retained the ability of self-renewal and multipotency and another of which named as SCDC1 did not. Then, we comprehensively compared the genes expression status and phosphorylation status of intracellular molecules between SCDC1 and SCDC2. We found that among 54,000 target genes, around 600 genes were identified as differentially expressed genes between the two types of cells. In particular, we found that some transcription factors, which were previously reported as proliferation and differentiation regulators of several kinds of stem cells, were highly expressed in the SCDC2 cells. Moreover, we found that the FGF-induced- and TGF- β -induced-intracellular signaling played important roles on the regulation of proliferation and differentiation of the MSCs. Thus, we successfully elucidated the molecular mechanisms underlying the regulation of proliferation and differentiation of MSCs derived from PDL.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：幹細胞、歯根膜、再生医療

1. 研究開始当初の背景

最近、歯根膜中には骨様組織、あるいはセメント質様組織を形成しうる間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC) 様細胞が存在していることが判明した (Seo et al., 2004)。また、我々は歯小嚢由来間葉系細胞を起源とする歯根膜由来線維芽細胞様細胞が血管内皮細胞マーカーを発現することを初めて明らかにした (Ibi et al., 2007)。また、さらに我々は、この細胞が管腔様構造物を形成することや、別の特殊な環境下では細胞間基質を石灰化することを明らかとした (Shirai et al., 2009)。これらの結果は、歯根膜由来線維芽細胞様細胞が血管内皮細胞と骨芽細胞の両者に分化できる幹細胞様能力を有することを示すものである。

一方、最近になって、通常は分化能力の無い (最終分化を終えた) 成体皮下由来線維芽細胞を幹細胞様に変化させられる技術が報告された。すなわち、成体マウス皮下由来線維芽細胞に 4 種類の転写因子 (Oct-3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) を外来的に強発現させることにより、人工全能性幹細胞 (iPS 細胞) に変化させる実験系を発表した (Takahashi et al., 2006; Okita et al., 2007)。しかしながら、これらの転写因子による全能性幹細胞様能力獲得メカニズムの全容が明らかにされたわけではなく、また、成体幹細胞 (臓器幹細胞) でも同様なメカニズムで幹細胞様能力を示すのかも明らかではない。特に、歯根膜由来線維芽細胞様細胞の多分化能力にこれらの転写因子群がどのように関与しているかについては明らかではない。すなわち、それら 4 つのうちの一部が発現すれば歯根膜細胞の多分化能力が賦活化されるのか、あるいはその他の転写因子群がこの細胞の増殖・分化能力を制御するのか、全く明らかではない。

2. 研究の目的

iPS 細胞が全能性を獲得するには、Oct-3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 の 4 つの転写因子の発現が必要と考えられている。今回我々は、歯根膜由来線維芽細胞様細胞集団の中から、MSC と線維芽細胞の両方をクローン性に増殖させ、これらの細胞の転写因子発現について網羅的に比較検討する。この結果から、歯根膜由来幹細胞の増殖・分化能力を制御するキー転写因子を明らかにしたい。また、同時に、この細胞の増殖・分化能力を制御する細胞内シグナル伝達経路についても明らかにしたい。その結果、歯根膜由来 MSC における転写因子の発現を人為的に調節することにより、歯根膜再生に必要な各細胞を自在に分化させ動員することが可能になることから、これまで全く不可能とされてきた歯根膜再生療法を可能にする技術が確立されるものと期

待される。

3. 研究の方法

(1) 歯根膜由来 Single cell-derived culture (SCDC) の確立: ラット臼歯部歯牙を抜歯後、コラゲナーゼにより歯根表面より、歯根膜細胞を遊離させ、FGF-1 およびヘパリンを添加した 20%FBS 含有 F-12 (MSC 増殖培地) にて I 型コラーゲンプレート上で増殖させた。このようにして得られたプライマリーカルチャーを、限界希釈法により 1 cell/well で播種し直した。この方法により、歯根膜由来線維芽細胞様細胞の Single cell-derived culture を作成した。

(2) 歯根膜由来細胞による血管構造形成度評価法: 各 SCDC 細胞を、細胞付着性の無い 96-well 丸底プレート (スミロンセルタイトスフェロイドマルチウェルプレート) に 10^4 個/well の細胞密度で播種した。その後、48 時間の浮遊培養によりスフェロイド体を形成させ、それを I 型コラーゲンゲル内に包埋した後、48-72 時間 3 次元培養を継続して血管様構造物を構築させた。血管形成の様子は、位相差顕微鏡にて観察した。また、血管様構造物の立体的な構造解析を可能にするため、培養ゲルを 10%ホルマリン固定した後、通法に従い、 $5 \cdot \mu\text{m}$ のパラフィン切片を作成し、核を DAPI 染色 (青)、アクチンを phalloidin 染色 (赤)、血管内皮細胞 endothelial cell (EC) 特異的マーカーを抗 Tie-2 抗体染色 (緑) した。また、血管様構造物の管腔構造を 3 次元的に評価するため、緑色蛍光タンパク質を用いてラベルされた SCDC 細胞により血管様構造物を構築させ、ゲル内固定後、セロイジン包埋し、厚さ $50 \cdot \mu\text{m}$ の厚切り切片を作成した。この緑色蛍光発現血管構造物の連続的断面像を、キーエンス社オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000) を用いて観察した。

(3) SCDC 細胞における特異的分化マーカーの発現検索: 各 SCDC 細胞の MSC マーカー、骨芽細胞マーカー、血管内皮細胞マーカー、平滑筋細胞マーカー、神経細胞マーカーに特異的なプライマーを用いて、各マーカーの mRNA レベルの発現量を RT-PCR 法により調査した。また、免疫蛍光学的検索により、これらのマーカーのタンパク質レベルでの発現の様子を観察した。

(4) SCDC 細胞における網羅的遺伝子発現解析: 幹細胞様多分化能力を示す SCDC2 細胞とその能力の無い SCDC1 細胞のそれぞれから mRNA を抽出した後、アジレント社製 cDNA アレイを用いて各細胞の遺伝子発現の状態を網羅的に比較検討した。

(5) SCDC 細胞におけるシグナル伝達経路の調査: 各 SCDC 細胞それぞれから、タンパク質を抽出後、2 次元電気泳動にて各タンパク

分子を展開後、CBB 染色と ProQ Diamond 染色により、各分子のリン酸化の状態を評価する。

4. 研究成果

(1) 歯根膜由来幹細胞様細胞の樹立：

4 週齢雄ラット臼歯を抜歯後、歯根部表面をコラゲナーゼにより歯根膜組織を分解処理後、トリプシン処理にて細胞を 1 細胞レベルまで分離した。その後、これらの処理にて得られた歯根膜由来細胞を 20% FBS、10 ng/ml、 $15 \cdot g/ml$ ヘパリン含有 F-12 培地にて播種し増殖させた。その後増殖した不均一な細胞集団から、限界希釈法により 1 細胞から増殖させた細胞集団 Single cell-derived culture (SCDC) を複数種得ることに成功した (図 1)。この SCDC のうち、SCDC1 と SCDC2 細胞は、共に MSC 特異的マーカーを発現している (図 2) が、その細胞分化能力が異なることを確認した。すなわち、SCDC2 は血管内皮細胞あるいは平滑筋細胞に分化し (図 3)、I 型コラーゲン内の 3 次元培養により血管内皮特異的マーカー Tie-2 陽性の血管様構造物を構築する (図 4 および 図 5) が、SCDC1 にはこの能力が無い。以上の結果から、SCDC2 細胞は、FGF の刺激下で自己複製能力を有し、血管内皮細胞および平滑筋細胞への多分化能力を持つ MSC 様能力を持つ MSC 様細胞であることが判明した。

初代培養細胞から Single Cell-derived Culture (SCDC) の作製

限界希釈法
Out Growthした個々の細胞をトリプシン処理により、培養プレートから離脱させる。
96well培養プレートに、1細胞/1wellとなるように播種し個々の細胞を別々に増殖させ、個々の細胞集団を作製。

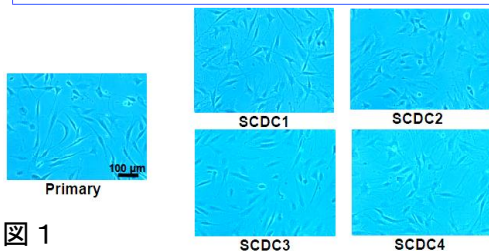


図 1

間葉系幹細胞マーカー遺伝子発現の調査

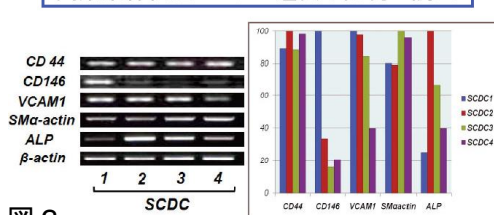


図 2

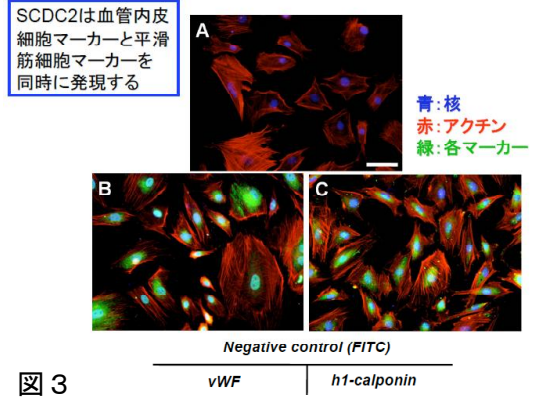


図 3

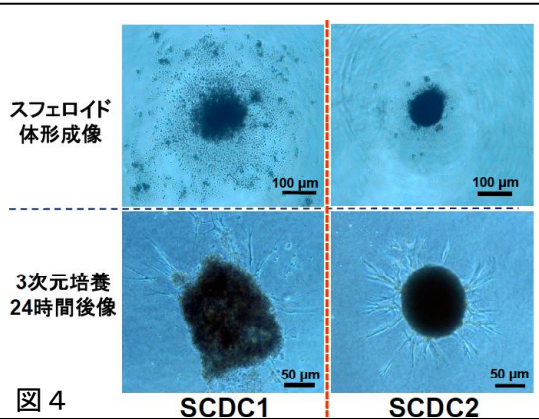


図 4

血管内皮細胞マーカー Tie-2 は SCDC2 によるスフェロイド体辺縁部とそこから発生する血管様構造物に局限して発現する

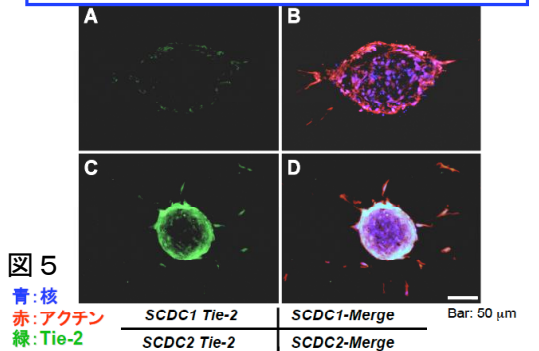
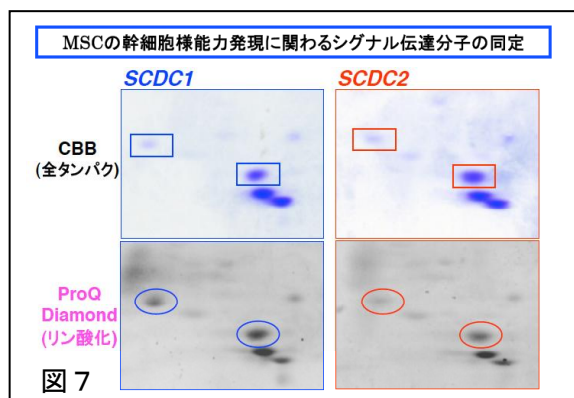
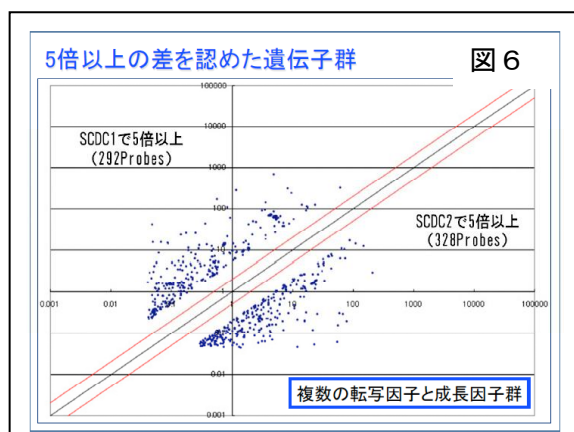


図 5

(2) 転写因子による歯根膜由来 MSC 様細胞の幹細胞様能力発現機構の検索：

(1) で得られた SCDC1 および SCDC2 細胞の幹細胞能力発現機構が、いかなる転写因子により発現されるかについて検索するため、cDNA アレイを用いてそれぞれの細胞における遺伝子発現の量を網羅的に比較検討した (図 6)。その結果、興味深いことに、複数の転写因子の発現が、SCDC1 に比べて SCDC2 において亢進していることが判明した。これらの転写因子の中には、ES 細胞や成体幹細胞の分化能力に影響を与えるという報告のあるものが複数存在しており、現在、その分化に与える影響力について強発現ベクターや siRNA を用いて確認をしているところである (投稿準備中)。また、SCDC2 が有する幹細胞様能力発現に関わる細胞内シグ

ナル伝達機構について明らかにするため、それぞれの細胞のタンパク質のリン酸化の程度を2次元電気泳動とProQ Diamond染色を組み合わせた方法により、網羅的に比較検討した。その結果、そのリン酸化の程度に差のあるタンパク質が複数明らかとされた(図7)。現在、この両細胞間でのリン酸化パターンの違いから予想されるSCDC2細胞の幹細胞様能力発現に関わるシグナル伝達機構について明らかにすべく調査を続けている。これまでに明らかとなったシグナル伝達経路として、この幹細胞様能力発現にはTGF- β ファミリーによるSmadシグナル、FGFファミリーによるErkやPI3Kを介したシグナルが重要な役割を担うことが判明した(投稿準備中)。



以上のように、本研究プロジェクトにより、歯根膜中のMSCの増殖・分化を制御する転写因子ならびに細胞内シグナルの主要な一面が明らかとされた。

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11件)

(1) Nakajima K, Kanno Y, Nakamura M, Gao X-D, Kawamura A, Itoh F, Ishisaki A, Bovine milk lactoferrin induces synthesis of the angiogenic factors VEGF and FGF2 in

osteoblasts via the p44/p42 MAP kinase pathway. *Biomaterials*, *in press*. (査読有)

(2) Kanno Y, Ishisaki A, Kawashita E, Chosa N, Nakajima K, Nishihara T, Toyoshima K, Okada K, Ueshima S, Matsushita K, Matsuo O, Matsuno H. Plasminogen/plasmin modulates bone metabolism by regulating the osteoblast and osteoclast function. *J Biol Chem*, 286:8952-8960, 2011. (査読有)

(3) Nishihira S, Okubo N, Takahashi N, Ishisaki A, Sugiyama Y, Chosa N. High-cell density-induced VCAM1 expression inhibits the migratory ability of mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*, 35: 475-481, 2011. (査読有)

(4) Hasegawa T, Chosa N, Asakawa T, Yoshimura Y, Ishisaki A, Tanaka M. Establishment of immortalized human periodontal ligament cells derived from deciduous teeth. *Int J Mol Med*, 26:701-705, 2010. (査読有)

(5) Hasegawa T, Chosa N, Asakawa T, Yoshimura Y, Asakawa A, Ishisaki A, Tanaka M. Effect of fibroblast growth factor-2 on periodontal ligament cells derived from human deciduous teeth in vitro. *Exp Ther Med*, 3:337-341, 2010. (査読有)

(6) Hasegawa T, Chosa N, Asakawa T, Yoshimura Y, Asakawa A, Ishisaki A, Tanaka M. Effect of fibroblast growth factor-2 on dental pulp cells derived from human deciduous teeth in vitro. *Exp Ther Med*, 1:477-480, 2010. (査読有)

(7) Okubo N, Ishisaki A, Iizuka T, Tamura M, Kitagawa Y. Vascular cell-like potential of undifferentiated ligament fibroblasts to construct vascular cell-specific marker-positive blood vessel structures in a PI3K-activation-dependent manner. *J Vasc Res*, 47:369-383, 2010. (査読有)

(8) 高橋美香子, 大久保直登, 帖佐直幸, 高橋典子, 加茂政晴, 水城春美, 石崎明, 客本齊子: 線維芽細胞増殖因子 (FGF-1) によるラット歯周靭帯由来未分化間葉系細胞様細胞の増殖促進効果発現メカニズム. *口腔組織培養学会誌*, 20:23-24, 2010. (査読有)

(9) Nakajima K, Nakamura M, Ishisaki A, Kozakai T. Synergistic effect of dexamethasone and prolactin on VEGF expression bovine mammary epithelial cells via p44/p42 MAP kinase. *Asian-Austral. J. Animal Sci.*, 22: 788-795, 2009. (査読有)

(10) Shirai K, Ishisaki A, Kaku T, Tamura M, Furuichi Y. Multipotency of clonal cells derived from swine periodontal

ligament and differential regulation by fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein. J Periodontal Res, 44: 238-247, 2009. (査読有)

(11) 帖佐直幸、石崎 明:骨における血管新生と線溶系. 血栓止血学会誌, 20: 12-17, 2009. (査読有)

〔学会発表〕(計20件)

(1) 石崎明:未分化間葉系細胞の増殖・分化制御メカニズムの解明—歯周靭帯再生医療の実現を目指して—, 口腔先端応用医学研究会第3回学術会議, 2011年1月22日, 東京医科歯科大学(東京)

(2) 高橋美香子:線維芽細胞増殖因子(FGF-1)によるラット歯周靭帯由来未分化間葉系細胞様細胞の増殖促進効果発現メカニズム, 第47回日本口腔組織培養学会学術大会, 2010年11月13日, 高知県教育会館(高知)

(3) 菅野陽介:Plasminogen/Plasminの骨芽細胞及び破骨細胞機能調節による骨代謝制御, 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月10日, 神戸ポートアイランド(神戸)

(4) 長谷川智一:ヒト乳歯歯根膜由来細胞におけるSDF-1の発現調節機構, 第52回歯科基礎医学会学術大会, 2010年9月22日, タワーホール船堀(東京)

(5) 帖佐直幸:システインリッチペプチドSCRG1は間葉系幹細胞の移動能を促進する, 2010年9月22日, タワーホール船堀(東京)

(6) 西平宗功:PDGF受容体を介したVCAM1の発現は間葉系幹細胞の遊走を制御する, 2010年9月21日, タワーホール船堀(東京)

(7) 大久保直登:ラット歯根膜由来未分化間葉系細胞による血管様構造物の形成, 岩手医科大学歯学会第70回大会, 2010年7月3日, 岩手医科大学(盛岡)

(8) 加茂政晴:ヒト扁平上皮癌細胞におけるガレクチン-1とEGFRの相互作用によるアノキス抑制作用, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月10日, パシフィコ横浜(横浜)

(9) 大久保直登:歯根膜由来幹細胞様細胞による3次元培養下における血管内皮細胞マーカー陽性血管様構造の形成, 2009年12月5日, 昭和大学(東京)

(10) 大久保直登:ラット歯根膜由来間葉系幹細胞によるPI3K/Akt依存的なTie-2陽性血管構造の形成, 再生補綴医学研究会第2回学術会議, 2009年11月27日, ルブラ王山(名古屋)

(11) 西平宗功:間葉系幹細胞におけるPDGFレセプターを介したVCAM1の発現解析, 第82回日本生化学会大会, 2009年10月23日, 神戸ポートアイランド(神戸)

(12) 大久保直登:歯根膜由来幹細胞による血管内皮細胞マーカー陽性血管構造の形成, 第51回歯科基礎医学会学術大会, 2009年9月10日, 朱鷺メッセ(新潟)

(13) 大久保直登:歯根膜由来幹細胞による血管内皮細胞マーカー陽性血管構造の形成, 第18回硬組織再生生物学会, 2009年9月5日, 札幌コンベンションセンター(札幌)

(14) 石崎明:FGFとTGF- β スーパーファミリーの相互作用による未分化間葉系幹細胞の細胞増殖・分化制御機構の解明, 第7回口腔医学フロンティア学術集会, 2009年3月7日, 徳島大学(徳島)

(15) 高橋典子:間葉系幹細胞が分泌するシステインリッチペプチドSCRG1の機能解析, 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月11日, 神戸ポートアイランド(神戸)

(16) 加茂政晴:ヒト口腔扁平上皮癌細胞におけるガレクチン-1のアノキス抑制機構の解析, 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月9日, 神戸ポートアイランド(神戸)

(17) 客本斉子:Fas誘導アポトーシス経路におけるHSP90とFLIPの役割, 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月9日, 神戸ポートアイランド(神戸)

(18) 石崎明:パネルディスカッション—そして未来へ—その2 予研から大学へ 歯科研究の現状とこれから, 予研歯科衛生部設立50周年記念講演, 2008年11月22日, 目黒雅叙園(東京)

(19) 小川恵子: *Mycoplasma salivarium* におけるヌクレアーゼの存在とその特性, 第45回日本口腔組織培養学会, 2008年11月15日, 松本歯科大学(塩尻)

(20) 日高竜宏:ヒト歯根膜細胞群の多様性に関する解析, 第51回秋季日本歯周病学会学術大会, 2008年10月19日, 四日市市分工会館(四日市市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石崎 明 (ISHISAKI AKIRA)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20356439

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: