

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592547

研究課題名（和文） 多能性歯髄幹細胞の可塑性における機能性 RNA による分化制御に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Studies on the regulation of differentiation of the pluripotent dental pulp stem cells by non-coding RNA

研究代表者

野崎 中成（NOZAKI TADASHIGE）

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90281683

研究成果の概要（和文）：歯髄細胞を用いて、内胚葉系細胞へ *in vitro* 分化誘導を試みた。誘導後、インスリンを発現する細胞が観察された。アレインを用いて miRNA の発現を網羅的に解析した。分化した細胞では、miRNA に制御される膵β細胞の分化において重要な役割を担う分子の発現上昇と膵β細胞で特異的に発現している分子の発現が認められた。歯髄細胞は、機能性 RNA による制御を介して内分泌細胞系譜へ分化誘導できることを示した。

研究成果の概要（英文）：To further evaluate the multipotency of dental pulp cells, and to investigate miRNA regulation of differentiation of these cells, we examined their *in vitro* differentiation into an endocrine cell lineage. After induction, insulin-producing cells were detected. Based on expression profiles by microRNA arrays, we identified targets, including molecules crucial for the differentiation into pancreatic beta cells. Thus, dental pulp cells have the potential to differentiate into an endocrine cell lineage by the regulation of miRNA following *in vitro* induction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 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・外科系歯学

キーワード：歯髄・幹細胞・多能性・分化転換・再生医学

1. 研究開始当初の背景

分化ポテンシャルの高い幹細胞を利用して、自己の生体組織、臓器を再生修復する新しい治療法が試みられている。これら幹細胞を用いた再生医療は移植に代わる治療法として社会的なニーズがあり、幹細胞のソースは様々な組織の体性幹細胞に求められている。研究代表者はこれまで、歯髄に存在する成体多能性幹細胞に着目し、この幹細胞の特性を

解析してきた。ある体細胞が異なる系譜の細胞になる現象が分化転換である。そして、そのような現象が生じた場合、もとの細胞に分化の可塑性があったという。これら細胞の可塑性は再生医療において重要な概念となっている。口腔領域では、ヒト唾液腺細胞に可塑性があり、内分泌細胞マーカーであるインスリンやグルカゴンを指標にして内分泌細胞へ分化転換させた Okumura らの報告がある。

本研究課題では、歯髄細胞の可塑性や分化転換に焦点を絞る。

2. 研究の目的

歯髄細胞の可塑性や分化転換の機構を分子レベルで解析する。歯髄細胞の可塑性を利用した再生医療への応用を視野に入れ、歯髄細胞が胚葉系の異なる細胞系譜へ分化転換できることを示し、機能性RNAによる分化制御の可能性を解析する。歯髄細胞の有用性を明らかにして、その可塑性を利用した再生医療のための基礎となる研究を展開する。

3. 研究の方法

<分化転換系の構築>

- (1) 分化転換の*in vitro*分化誘導系を構築する。内分泌系細胞への分化制御に関わる転写因子Pdx1, Ptf1a, Ngn3のコード領域のN末端に真核生物のKozac配列を挿入したDNAを合成し、クローン化を行う。クローン化したベクターから制限酵素で切り出し、発現ベクターに組換えを行う。歯髄細胞へ導入する発現ベクターには、脳心筋炎ウイルスのinternal ribosome entry site (IRES) 配列を含み、目的遺伝子とZsGreen1の翻訳領域の双方が一分子のmRNAから翻訳され、緑色蛍光を発する細胞の100%が非融合タンパク質として、目的遺伝子を発現できる系を用いる。2つの分化誘導法を試みる。分化誘導法①Pdx1、次にPtf1aを導入して発現する細胞を選択し、内分泌前駆細胞系譜への分化を試みる。さらに、Ngn3を導入して内分泌細胞への誘導を試みる。分化誘導法②Pdx1, Ngn3を導入し、内分泌細胞系譜への分化を試みる。

<分化転換能に関する解析>

- (2) 分化程度を評価する。
1次抗体に抗インスリン抗体、2次抗体に蛍光抗体を用いて細胞固定標本上でインスリン産生細胞を観察する。同様に、膵島を構成する細胞のマーカであるグルカゴン、ソマトスタチン、膵ポリペプチドについても発現を調べる。
- (3) 内外分泌細胞マーカー発現の変動を解析する。
insulin1(Ins1), insulin2(Ins2), glucagon(Gcg), somatostatin(Sst), pancreatic polypeptide(Ppy), amylase2(Amy2)プライマーを設計し、リアルタイムPCRによる定量的発現解析を行う。分化した細胞が、内分泌系または外分泌系を区別し、どの細胞系譜にあるかを調べることで、分化転換能を評価する。

<microRNAによる分化制御に関する解析>

- (4) アレイを用いてmiRNAの網羅的発現解析を行う。

分化過程におけるtotal RNAを調製し、アジレント 2100 バイオアナライザーシステムを用いて、total RNAの精製度および収量を確認する。正確性、定量性に優れているLocked Nucleic Acid (LNA) probe (Nature Methods, 2007)を用いて、miRCURY LNA™ microRNA Array (EXIQON)によるmiRNAの網羅的発現解析を行い、発現プロファイルを作成する。

- (5) miRNA発現プロファイルを解析する。発現プロファイルから、この分化の制御に関わるmiRNAの候補を抽出する。Sanger miRase Database検索により、ターゲット遺伝子の予測を行う。

<miRNAターゲット遺伝子の解析>

- (6) 歯髄細胞が内分泌細胞へ分化するときに関与する遺伝子を探索する。ターゲット遺伝子の発現変動を、リアルタイムPCRを用いて調べる。また、その細胞内局在を調べる。

4. 研究成果

- (1) 内胚葉組織への*in vitro*分化誘導系を構築するための実験を行った。

- ① ラット歯髄細胞へpdx1をトランスフェクションした。導入3日後、pdx1の顕著な発現を認めた。導入8日後、その発現は、約10%以下に低下した(図1)。

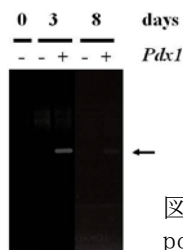


図1
pdx1の発現誘導

- ② Pdx1を3日間隔で導入した。Ptf1aを追加導入し、内分泌前駆細胞系譜への分化誘導を試みた。次に、Ngn3を同時に導入し、内分泌細胞への分化誘導を試みた。細胞内におけるインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ポリペプチドの発現を調べた。誘導10日後に、インスリン、グルカゴンを発現する細胞が認められた(図2a, b)。一方、ソマトスタチン、膵ポリペプチドを発現する細胞は、観察されなかった(図2c, d)。インスリンおよびグルカゴンを発現する細胞は、内分泌前駆細胞の可能性があり、歯髄細胞が内分泌細胞系譜への分化過程にあることが示唆された。

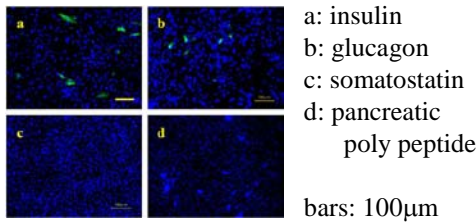


図2 膵島細胞マーカーの発現
緑色蛍光が発現している細胞である。

- ③ 誘導10日後に Ins1, Ins2 の発現は、各々、約7倍上昇した (図3)。

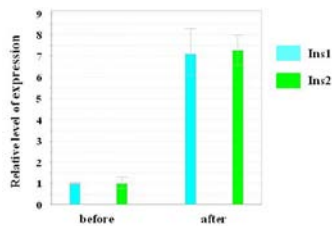


図3 インスリンの発現
before: 誘導前, after: 誘導後

- ④ 誘導10日後に Gcg, Sst の発現は上昇していた。一方、Ppy, Amy2 の発現の上昇は認められなかった (図4)。

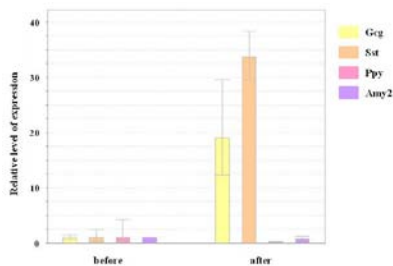


図4 内外分泌細胞マーカーの発現
before: 誘導前, after: 誘導後

- (2) 歯髄細胞の内分泌細胞系譜への分化誘導を試み、分化過程における miRNA による分化制御を調べた。

- ① 誘導前と誘導後から調製した total RNA を等量ブレンドして Reference とした。miRCURY LNA™ microRNA Array (EXIQON) を用いて、miRNA 発現の網羅的解析を行い、miRNA 発現プロファイルを作成した。Scatter plot 図による解析から、サンプル群のシグナル強度の分布に大きなバラつきはなく、サンプル間のプローブのシグナル強度に顕著な差が認められなかった。

- ② 348 個のプローブから、分化誘導法①で有意な発現変動を認めた、発現比が2倍以上または 1/2 倍以下のものを絞込み、28 個の miRNA を抽出した。さらに miRBase に登録されているデータベース検索による絞込みで8 個の miRNA を抽出した。そのうち、7 個は約2 倍以上の発現上昇が認められた。miR-183 の発現は、誘導後に約 0.4 倍の低下が認められた (図5)。

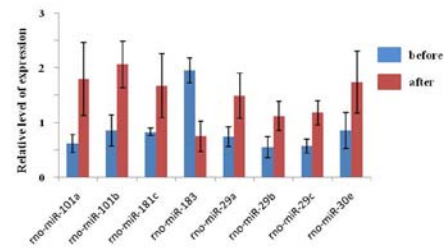


図5 miRNA の発現変動
before: 誘導前, after: 誘導後

一方、インスリン分泌腺組織の発生において分化制御に関わることで知られている miR-375 および miR-9 の発現は、各々、約 95%と約 64%の発現低下であった。

- ③ 分化誘導法②で有意な発現変動を認めた、発現比が2倍以上または 1/2 倍以下のものを絞込み、miRBase に登録されている miR-140 を含む 5 個の miRNA を抽出した。膵β細胞株で高発現する miR-140 の発現は、誘導後、約 2.4 倍の上昇が認められた。
- ④ 分化誘導法①で抽出された miR-183 のターゲット遺伝子の候補として 242 個の遺伝子を抽出した。膵β細胞の分化に重要な役割を担う Forkhead box 01 (Foxo1) に焦点を絞り、解析を行った。Ins1, Ins2 の発現が、各々約7 倍の上昇した分化誘導条件下で、Foxo1 の発現は、約2 倍の上昇が認められた (図6)。

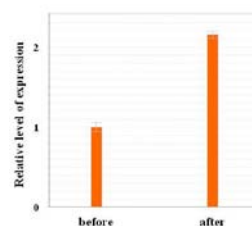


図6 Foxo1 の発現
before: 誘導前, after: 誘導後

- ⑤ インスリンの発現は、細胞質に局在していた。Foxo1 の発現は、核と細胞質に局在していた (図7)。

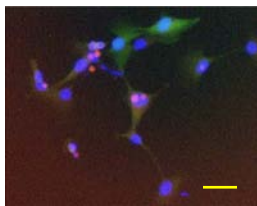


図7 Insulin, Foxo1 の細胞内局在
 緑色 : Insulin, 赤色 : Foxo1
 Bar: 100µm

- (3) Foxo1 は胎生早期に全腭細胞に発現し、分化すると内分泌細胞に局限する。出生後は最終分化した膵β細胞にのみ発現する。インスリンとFoxo1が発現している細胞では、歯髄細胞が膵β細胞様の細胞へ分化転換したと考えられた。この分化した細胞では、miRNAによって制御される膵β細胞の分化に重要な役割を担う分子の発現上昇と膵β細胞で特異的に発現している分子の発現が認められた。歯髄細胞が、機能的RNAであるmicroRNAによる制御を介して、内分泌細胞系譜へ分化誘導できることを示した。

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 2 件)

- ① Nozaki T., Ohura K., Gene expression profile of dental pulp cells during differentiation into an adipocyte lineage, *Journal of Pharmacological Sciences*, 査読有, 115, 2011, 354-363, DOI: 10.1254/jphs.10163FP
- ② Nakatsuka R., Nozaki T. (他6名, 2番目), 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment induces skeletal myogenic differentiation of mouse dental pulp stem cells, *Archives of Oral Biology*, 査読有, 55, 2010, 350-357, DOI:10.1016/j.archoralbio.2010.03.003

[学会発表] (計 6 件)

- ① Nozaki T., Ohura K., Gene expression profile of dental pulp cells during differentiation into an adipocyte lineage, 第85回日本薬理学会年会, 2012年3月16日, 京都
- ② Nozaki T., Ohura K., Analysis of gene expression levels of dental pulp cells during adipogenic differentiation, 第34回日本分

子生物学会年会, 2011年12月13日, 横浜

- ③ Nozaki T., Ohura K., Assessment of stem cell markers in multipotent dental pulp cells, 45th Meeting of CED-IADR, 2011年9月1日, Budapest
- ④ 野崎中成, 大浦清, 歯髄細胞の内分泌細胞系譜への分化における miRNA 発現の解析, 第65回NPO法人日本口腔科学会学術集会, 2011年4月21日・22日, 東京
- ⑤ Nozaki T., Ohura K., miRNA expression profiles during differentiation of rat dental pulp cells into an endocrine cell lineage, BMB2010 (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8日, 神戸
- ⑥ Nozaki T., Ohura K., miRNA expression profiles during differentiation of pluripotent dental pulp cells, 88th IADR General Session & Exhibition, 2010年7月15日, Barcelona

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野崎 中成 (NOZAKI TADASHIGE)
 大阪歯科大学・歯学部・講師
 研究者番号 : 90281683

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし