

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592903

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化に関与する遺伝子群の情報ネットワークの解明

研究課題名(英文) The gene regulatory network relating to the differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts

研究代表者

筒井 健機 (Takeki, Tsutsui)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：00097065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化に関与する遺伝子群を調査するため、歯髄由来クローンの増殖能や分化能と、網羅的遺伝子発現とを関連付けて解析した。その結果、いくつかの分化関連シグナルネットワークを構成する遺伝子が大きく変動することが判明した。また、歯髄細胞に発現する性ホルモン受容体の機能を解明するため、歯髄細胞に性ホルモンを作用させたところ、発現変動した遺伝子は性ホルモン受容体を介して作用を受けることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using cell clones derived from the human dental pulp tissue, we studied genes involved in the differentiation of dental pulp stem cells by analyzing cell growth, differentiation potentials, and gene expression profiles. Some genes involved in signal networks (such as Wnt and Notch signaling pathways) and some gene clusters (such as carbohydrate metabolism-, cell cycle- and differentiation-relating genes) turned out up- or down-regulated in the differentiation process. To elucidate the function of sex hormone receptors on dental pulp cells, the gene expression profiles of the dental pulp cells treated with sex hormones were analyzed. We found that sex hormones could act directly on human dental pulp cells through sex hormone receptors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、歯科医用工学・再生歯学

キーワード：ヒト歯髄幹細胞 多分化能 DNAマイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

多分化能を持つ歯髄幹細胞の歯髄内での主要な分化方向の一つとして象牙芽細胞への分化がある (Int J Paediatr Dent. 2009;19:61-70)。歯髄幹細胞の石灰化を調節する因子として、*in vitro* では Notch や Wnt 等のシグナルパスウェイの関与が報告されている (Arch Oral Biol. 2009;54:216-22, J Dent Res. 2008;87:126-30)。*In vivo* では、Notch や Wnt は歯髄の発生・発育過程や修復過程で発現している (Exp Cell Res. 2003;282:101-9, Cell Res. 2005;15:301-16)。しかし、これらのパスウェイが歯髄内でどのように関与しているのかは未だ不明な点が多い。

また、象牙芽細胞を含むヒト歯髄組織には、アンドロゲン受容体 (AR) またはエストロゲン受容体 (ER) を持つ細胞が存在することが報告されている (J Dent Res 1998;77:1384-7, J Dent Res 2002;81:360-5)。このことは、象牙芽細胞を含むヒト歯髄組織が性ホルモン感受性を持つことや、ヒト歯髄幹細胞が象牙芽細胞へ分化する際に性ホルモンが関係することを示唆している。しかし象牙芽細胞や歯髄細胞の AR や ER の機能については、未だほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、Notch や Wnt 等を含む遺伝子群、および AR や ER が、歯髄内でどのように分化に関与するのか分子生物学的に解明することを目的とした。歯髄は歯髄幹細胞や象牙芽細胞の他、神経細胞、血管内皮細胞など種々の細胞から構成される複雑な組織であるため、以下の手順で目標を達成することにした。

(1) *In vitro* で培養細胞を用いて、クロー

ナルレベルで歯髄細胞の分化能に関連するシグナルを解析し、歯髄幹細胞の分化に関与する遺伝子群の情報ネットワークを解析する。

(2) 歯髄細胞由来クローンをマウスに移植して形成された歯髄様組織モデルにて、(1)で解析した *in vitro* の情報ネットワークを検証する。

当研究室では、歯髄細胞をクローニングした研究の結果より、クローンによって多分化能が異なることを報告している (J. Oral Biosci., 2010;52(Suppl.):122)。また、骨髄や臍帯由来幹細胞のクローンでは、分化誘導時や娘クローンで個々の性質が変化することが報告されている (Biol Blood Marrow Transplant. 2008;14:546-55, Exp Hematol. 2010;38:46-54)。このため、歯髄幹細胞の分化調節機構を解明するためには、ヘテロな細胞集団ではなく、シングルセルから得たコロニーを増殖させたクローナルレベルにおけるデータを用いることが不可欠であると考えた。そこで、歯髄内で歯髄幹細胞がどのような分子制御を受けて分化するのかを明らかにするために、まず *in vitro* においてクローナルレベルでの分化関連遺伝子群の情報ネットワークを解析し、それを *in vivo* の歯髄モデルに適用するという計画を立てた。

3. 研究の方法

(1) 歯髄細胞のクローニング

ヒト智歯由来初代歯髄細胞をコロニー形成させ、クローンを単離して長期間継続培養した。増殖能は、細胞の培養日数に対する細胞集団倍加数 (doubling levels: DL) の勾配 (増殖率) と累積 DL (分裂寿命) から比較した。

(2) 歯髄細胞の細胞表面マーカーの発現解析

歯髄細胞由来クローンをチャンバースライド上で培養・固定した後、間葉系幹細胞表面マーカーの STRO-1 と CD146 の免疫組織化学染色を行った。

(3) 歯髄細胞の分化誘導

歯髄細胞由来クローンを石灰化誘導培地、軟骨分化誘導培地、脂肪分化誘導培地で培養し、各分化誘導を行った。石灰化能を alizarin red 染色、軟骨分化能を Alcian blue 染色、脂肪分化能を oil red O 染色で評価した。

(4) 歯髄細胞の性ホルモン応答性

男性由来の歯髄細胞を 10^{-6} M 5 α -dihydrotestosterone (DHT) で、女性由来の歯髄細胞を 10^{-9} M 17 β -estradiol (E_2) で 24 時間作用させた後、total RNA を抽出した。

(5) 網羅的遺伝子発現解析

Total RNA より DNA マイクロアレイ (Affymetrix GeneChip[®] Human Gene 1.0 ST Arrays) で網羅的遺伝子発現を測定し、the Ingenuity pathway analysis (IPA) と The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)、The Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>) で解析を行った。

4. 研究成果

(1) 歯髄細胞由来クローンの増殖能と間葉系幹細胞マーカーの発現並びに分化能の解析

各クローンとも単離後140日以上培養を継続したところ、DL 30で分裂寿命のみら

れたものやDL 59でも増殖するものなど、増殖能は様々であった。クローンの単離培養直後(DL 17-18)では、STRO-1とCD146が両者とも陽性のものは50クローン中45クローン、長期継代培養後(DL 40以上)では、STRO-1とCD146が両者とも陽性のものが36クローン中20クローンあった。石灰化能と脂肪分化能が両者とも陽性のクローンで、培養初期からDL 40以上まで両者がともに陽性の性質を保持したものが3クローンあった。

以上の結果から、培養下のヒト歯髄幹細胞は、個々の細胞が独立した細胞系として、それぞれの多分化能を長期にわたって保持したまま増殖することがわかった。

(2) 歯髄細胞由来クローンのマウス移植による歯髄様組織モデルの形成

研究開始当初の目的では、in vivoの実験系として、一部のクローンをヌードマウスに移植して象牙質様組織や歯髄様組織を形成させ、これを歯髄様モデルとして、象牙芽細胞の形成過程における遺伝子の発現調節機構を解析する計画であった。しかし、クローニング過程やその後の細胞増殖過程で、分化能解析や間葉系幹細胞マーカーの発現解析を行ったことにより細胞のDLが増加し、かつ増殖能の低下と細胞の大型化のため、移植に必要な細胞数を確保できなくなり、移植実験は実施できなかった。

(3) 多分化能と遺伝子情報ネットワークとの関連解析

石灰化能 (osteogenic:O)、軟骨分化能 (chondrogenic:C)、脂肪分化能 (adipogenic:A)の3分化能を解析したクローンの中から、石灰化能と軟骨分化能、脂肪分化能を有する細胞(OCA)を3クローン、石灰化能と軟骨分化能を有する細胞(OC)

を1クローン、石灰化能のみを有する細胞(0)を1クローン選出した。これらのクローンの網羅的遺伝子解析を行い、WntやNotchを含む情報ネットワークやその他の遺伝子発現の違いと、分化能との関連を解析した。その結果、OCAとOC、OCと0間の比較では、細胞周期や細胞増殖関連遺伝子が主に変動していた。また、WntシグナルパスウェイやNotchシグナルパスウェイ関連の遺伝子がいくつか大きく変動することが判明した。さらに、OCAとOC、0の順に発現が下降する遺伝子には糖代謝関連遺伝子等が多く、OCA、OC、0の順に発現が上昇する遺伝子では細胞周期や分化関連遺伝子等が変動していた。すなわち、多分化能を有する間葉系幹細胞様クローンでは細胞分裂関連遺伝子が多く発現変動し、エネルギー代謝が活発なこと、分化能がより限定されたクローンでは分化関連遺伝子の発現が変動することが示唆された。

(4) ヒト歯髄幹細胞のERとARの機能解析

ヒト歯髄幹細胞にDHTまたはE₂を作用させ、網羅的遺伝子発現をパスウェイ解析ソフトウェア等で解析したところ、DHTまたはE₂に感受性を示して発現が変動した遺伝子は、性ホルモンの作用を直接受けるのではなく、歯髄細胞に発現する性ホルモン受容体を介して発現変動することが示唆された。このことは、未知であったヒト歯髄幹細胞に発現するARとERの生物学的意義を洞察するうえで重要な知見と思われる。

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4件)

Inaba T, Kobayashi T, Tsutsui TW, Ogawa M, Uchida M, Tsutsui T., Expression

status of mRNA for sex hormone receptors in human dental pulp cells and the response to sex hormones in the cells., Archives of Oral Biology, 査読有, 58, 2013, 943-950, DOI: 10.1016/j.archoralbio.2013.02.001.

Xiao L, Tsutsui T., Three-dimensional epithelial and mesenchymal cell co-cultures form early tooth epithelium invagination-like structures: expression patterns of relevant molecules., Journal of Cellular Biochemistry, 査読有, 113, 2012, 1875-1885,

DOI:10.1002/jcb.24056

Kobayashi M, Tsutsui TW, Kobayashi T, Ohno M, Higo Y, Inaba T, Tsutsui T., Sensitivity of human dental pulp cells to eighteen chemical agents used for endodontic treatments in dentistry., Odontology, 査読有, 101, 2011, 43-51, DOI:10.1007/s10266-011-0047-9.

Anpo M, Shirayama K, Tsutsui T., Cytotoxic effect of eugenol on the expression of molecular markers related to the osteogenic differentiation of human dental pulp cells., Odontology, 査読有, 99, 2011, 188-192,

DOI: 10.1007/s10266-011-0009-2.

[学会発表](計2件)

小林朋子, 鳥居大祐, 筒井健夫, 筒井健機. 歯髄細胞クローンの分化能の違いによる遺伝子発現の変動. 第55回 歯科基礎医学会学術大会. 2013年9月20日~22日. 岡山コンベンションセンター(岡山県).

筒井健機, 小林朋子, 鳥居大祐, 肖

黎，筒井健夫．培養ヒト歯髄細胞の多分化能の維持と細胞増殖 細胞クローン解析 ．第48回 日本口腔組織培養学会学術大会．2011年11月19日，明海大学浦安キャンパス(千葉県)．

6．研究組織

(1)研究代表者

筒井 健機 (TSUTSUI TAKEKI)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：00097065

(2)研究分担者

小林 朋子 (KOBAYASHI TOMOKO)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：10548283