

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659866

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞及び iPS 細胞の多分化能維持における ALP の機能解明とその応用

研究課題名(英文) Function elucidation of the ALP in the pluripotent maintenance of pulpal stem cells and iPS cells and its application

研究代表者

鈴木 邦明 (SUZUKI, KUNIAKI)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40133748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文)：ES細胞やiPS細胞の研究において多分化能の指標として使われているアルカリ性ホスファターゼ(ALP)の性質を調べた。歯髄組織幹細胞(DPSC)はALP活性を示さないが、DPSCから誘導されたiPS細胞は臓器非特異型のALP活性を示した。本研究に使用した腫瘍系細胞は、臓器の起源は異なるのに、いずれも臓器非特異型ALPの特徴を示した。腫瘍化することによりオリジナルの細胞のALPの型を喪失して臓器非特異型の性質を示すようになる可能性が示唆された。以上の結果は、細胞の初期化及び腫瘍化とALPの関連に興味深く研究を継続中である。

研究成果の概要(英文)：We examined a property of the alkaline phosphatase (ALP) used for a pluripotent index in the study of embryonic stem cells and iPS cells. The dental pulp stem cells (DPSC) did not show ALP activity, but the induced iPS cells from DPSC showed the ALP activity of the tissue nonspecific type. As for the origin of the organ, the tumor cells which we used for this study showed all a characteristic of the tissue nonspecific type ALP. This suggests that the cells lost original type of the ALP by becoming a tumor, and came to show the nature of the tissue nonspecific type. As the above-mentioned results are interesting in an association between initialization of cells and malignant transformation and ALP, we continue the study.

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：ES細胞 iPS細胞 多分化能 アルカリ性ホスファターゼ 臓器非特異型ALP 細胞の初期化 腫瘍化

## 1. 研究開始当初の背景

再生医学において組織幹細胞の応用が期待されている。研究分担者の柴田らは抜歯後の智歯より約 200 ラインのヒト智歯由来幹細胞(DPSC)を樹立し、DPSC の幹細胞性に関する検討を行い、未熟な形成期の智歯ほど分化能が高いこと、分化能は継代 4 代目を超えると低下し再生医療の資源としての価値を著しく損ねてしまうことを明らかにした (Takeda et al. J Dent Res. 2008)。また、歯冠形成期の未熟な DPSC から c-Myc を除く 3 因子の遺伝子導入による iPS 細胞の誘導に成功し、その樹立効率はヒト成人皮膚繊維芽細胞の約 100 倍と非常に高率であることを見だし (Tamaoki et al. J Dent Res. 2009)、DPSC 由来智歯の成熟度と iPS 細胞の誘導効率に関して解明を行っていた。

一方、ES 細胞や iPS 細胞の研究においてアルカリ性ホスファターゼ (ALP) は多分化能の指標として使われているが、細胞・組織染色による単なるマーカーとして使用されるのみで、未分化状態の維持におけるその機能に関しては研究が見られない。ALP は動物の進化の過程で保存され、ヒトにおいても全身の組織・細胞に存在する酵素である。酵素化学的な性質および遺伝子レベルでの膨大な研究の蓄積があるが、肝心な ALP の機能と生体内での基質およびアルカリ性至適 pH の意義などが解明されていない酵素である。そこで、柴田らの開発した 200 ライン以上の幹細胞性の異なる DPSC と iPS 細胞のストックと技術の提供を受け、これらの細胞の ALP の機能と基質の解明を行うことを計画した。また、iPS 細胞は pre 前がん状態との見方もあることから、癌細胞と正常細胞の ALP の性質の相違に関して検討することとした。

## 2. 研究の目的

未分化で自己複製能を維持した状態の ES 細胞や iPS 細胞は ALP が高レベルで発現しており、分化に伴って発現は低下する。他の未分化マーカーは動物種や組織の由来により発現パターンが異なるが、ALP は幹細胞に共通した未分化状態のマーカーとして広く用いられている。しかし、未分化状態を保つ上での ALP の機能に関しては不明である。そこで、ヒト智歯より樹立された高い増殖・分化能 (幹細胞性) を持つ歯髄組織幹細胞 (DPSC) と DPSC から誘導された iPS 細胞を使用して、幹細胞性の維持と iPS 細胞の樹立効率における ALP の機能を解析して細胞初期化における基本的な知見を得ることを目的とする。また、癌細胞と正常細胞の ALP の性質の相違についても検討する。

## 3. 研究の方法

(1) iPS 細胞作成に使用した lining cell、

original の歯髄組織幹細胞 (DPSC) と DPSC から誘導された iPS 細胞を培養して、それぞれの細胞破砕物を作成した。また、各種の株化された癌細胞を培養してから回収して、その細胞破砕物を作成した。また、コントロールとなる正常細胞の ALP 活性測定のために市販のヒト由来小腸型、胎盤型、骨型及び肝臓型の ALP を購入して使用した。

(2) パラニトロフェニルリン酸 (pNPP) を基質として ALP 活性を測定し、ALP 阻害剤である levamisole、tetrazisole、homoarginine、vanadate さらには bisphosphonate による阻害のパターンからそれぞれの細胞破砕物の保持する ALP の型を検出した。

(3) ヒトの臓器特異的な ALP 及び腫瘍細胞の ALP の機能の相違を検討するために、生体内に存在する ATP、ピロリン酸、ピリドキサルリン酸を基質として活性測定を行い、その pH 依存性や阻害剤の作用などを検討することにより ALP の生体内基質の探索を行った。

## 4. 研究成果

(1) iPS 細胞作成に使用した lining cell、original の DPSC 及び DPSC から作成された iPS 細胞の破砕物を作成して ALP 活性を測定した。lining cell 及び DPSC の破砕物からは ALP 活性は検出されなかったが iPS 化すると ALP 活性が検出され、定性的な細胞初期化のマーカーとして使用されていた ALP 活性を測定することができ定量的な取り扱いが可能となった。また、iPS 細胞の ALP 活性は tetrazisole によって濃度依存的に阻害されることから、臓器非特異型の特徴を示した。細胞の初期化によって ALP 活性が発現することと、その ALP のタイプを阻害剤に対する応答性から判定するという、本研究計画の骨子となる研究成果を得ることができた。

(2) HSC3、HSC4、Hella、Ca9-22、P19 及び Li-7 などの腫瘍系の細胞を培養して破砕物を作成して、それぞれの細胞の ALP 活性の阻害剤に対する応答性及び ALP 活性測定時の基質に対する親和性などを、ヒトの骨型、小腸型、胎盤型、肝臓型の ALP 活性と比較した。その結果、それぞれの腫瘍系細胞の臓器の起源は異なるのに、いずれも臓器非特異型 ALP の特徴を示した。さらなる解析は必要であるが、腫瘍化することによりオリジナルの細胞の ALP の型を喪失して臓器非特異型の性質を示すようになる可能性が示唆された。

(3) P19 細胞は神経芽腫細胞であるが、レチノイン酸で処理することにより神経系の細胞に分化すると報告されている。我々もレチノイン酸処理したところ P19 細胞の形態が変化し、細胞が分化したものと推測した。オリジナルの P19 細胞と分化した細胞の ALP 活

性の相違を調べたところ、levamisole、tetramisole、homoarginine、vanadate に対する応答性には変化が見られなかったが、bisphosphonate に属する etidronate、clodronate 及び incadronate に対する応答性が変化した。ALP の機能にも変化が生じているのか、現在、検討を進めている。

(4) ALP の臓器によるサブタイプの変化が ALP の基質の相違あるいは機能の相違に関連するのかを明らかにすることを目的として、ヒト由来の小腸型、胎盤型、骨型及び肝臓型の ALP を用いて、その基質特異性と阻害剤に対する感受性を広く検討した。その結果、ALP のタイプは異なっても基質に対する親和性と活性の pH 依存性など ALP の基質特異性はほとんど変わらないこと、また、各種の阻害剤に対する応答性は ALP のタイプによって異なることを明らかにした。さらに、ALP 活性の至適 pH は測定時の基質によって異なりピロリン酸、リン酸化されたペプチド及び ATP では中性側にシフトすることから、生体内での基質に対してはより生理的な pH で機能することが示唆された。ALP 活性が非生理的なアルカリ性 pH で高値を示すことが ALP 研究における大きな謎であったが、生体内に存在する生理的な基質に対しては、生理的な pH で十分な活性を示す可能性が示唆されたが、さらなる検討が必要である。

(5) 一連の研究から、iPS 化した細胞及び腫瘍化した細胞の ALP はいずれも臓器非特異型 ALP の性質を示すことから、細胞の初期化及び腫瘍化と ALP の関連で興味深いのが、例数を増加させた検討が必要であり、研究を継続中である。

(6) 本研究期間に、岐阜大学の柴田研究室では、新たに約 50 ラインのヒト歯髄由来幹細胞を樹立して幹細胞性と分化能に関する検討を行った。また、最初の研究計画においては、岐阜大学の DPSC とその DPSC から作成された iPS 細胞の提供を受けて北海道大学で ALP の解析を行う予定であったが、実際に進めると材料の輸送を行うことは実験においてマイナス面が大きかった。そこで、北海道大学の出山が岐阜大学の柴田研究室に行き、lining cell, original cell 及び作成された iPS 細胞の培養及び解析法を修得し、北海道大学においても細胞培養を行える準備を整えて、研究を継続中である。

#### 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 13 件)

1. 更田恵理子、出山義昭、吉村善隆、鈴木邦明、山崎裕：ヒトアルカリ性ホスファター

ゼの基質選択性と阻害剤に対する感受性の相違、北海道歯誌, in press, 2014 (査読有)

2. 山田淳一、出山義昭、吉村善隆、鈴木邦明、八若保孝：骨芽細胞の増殖、分化と石灰化における Na,K-ATPase の役割、北海道歯誌, in press, 2014 (査読有)

3. K. Iida, T. Shibata (10 人中 9 番目), K. Tezuka: Hypoxia-enhanced Derivation of iPSCs from Human Dental Pulp Cells. J Dent Res, 92:905-910, 2013 (査読有)

4. 飯岡拓馬、出山義昭、吉村善隆、鈴木邦明：ヒトアルカリ性ホスファターゼ・アイソザイムの阻害剤に対する感受性の相違。北海道歯誌, 202-209, 2012 (査読有)

5. Y. Kudo, S. Iizuka, T. Shibata (18 人中 13 番目) : Periostin Directly and Indirectly Promotes Tumor Lymphangiogenesis of Head and Neck Cancer. : PLoS ONE 7:e44488, 2012 (査読有り)

[学会発表](計 15 件)

1. 山田淳一、出山義昭、吉村善隆、鈴木邦明、八若保孝：骨芽細胞における Na,K-ATPase の機能、第 55 回歯科基礎医学会学術大会、2013 年 9 月 21 日、岡山コンベンションセンター (岡山)

2. 鈴木邦明、出山義昭、吉村善隆：各種阻害剤のヒトアルカリ性ホスファターゼ・アイソザイムに対する作用の相違、第 33 回日本歯科薬物療法学会、2013 年 6 月 15 日、東京医科歯科大学 (東京)

3. 鈴木邦明、菊池 均、吉村善隆、出山義昭：エチドロネートによる骨型アルカリ性ホスファターゼ活性の可逆的な非拮抗阻害、第 54 回歯科基礎医学会学術大会、2012 年 9 月 16 日、奥羽大学 (郡山)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者：

鈴木 邦明 (SUZUKI, Kuniaki)  
北海道大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：40133748

(2) 研究分担者

柴田 敏之 (SHIBATA, Toshiyuki)  
岐阜大学・大学院医学 (系) 研究科・教授  
研究者番号：50226172

出山 義昭 (DEYAMA, Yoshiaki)  
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：80271667

飯田 一規 (IIDA, Kazuki)  
岐阜大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：30585237

玉置 也剛 (TAMAOKI, Naritaka)  
岐阜大学・大学院医学(系)研究科・助教  
研究者番号：40585303