

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792149

研究課題名(和文) 歯根膜由来幹細胞を利用した造血を伴う血管新生誘導技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of neovascularization-inducing technology accompanied with hematopoiesis by utilizing Periodontal ligament derived stem cells

研究代表者

大久保 直登 (Okubo, Naoto)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00553207

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)：我々は以前に歯根膜組織由来の血管構築能を有する幹細胞を樹立し報告した。この幹細胞が複数の造血幹細胞マーカーを発現し三次元培養によって構築した血管管腔内においてエオジン好染の血球様細胞を誘導することを見出した。そこで、このヘマンジオプラスト様の幹細胞の誘導に関わるキー遺伝子を特定するためにマイクロアレイ解析を行い、一つの転写因子を選定した。その転写因子のアデノウイルスベクターを作成し歯根膜細胞に投与した所、血管新生能および血球細胞誘導能の顕著な増加を認めた。さらに造血幹細胞マーカー遺伝子の発現上昇も確認した。これにより、ヘマンジオプラスト様幹細胞誘導に関わるキー遺伝子の特定に成功した。

研究成果の概要(英文)：We reported to establish the periodontal ligament (PDL) derived stem cells, which had the capacity to construct blood vessel structures. Thereafter, we observed these PDL cells expressed multiple hematopoietic stem cell markers and possessed the capacity to induce eosinophilic blood cells inside the constructed vessel lumen in our three-dimensional culture. To identify the vital genes associated with regulation of hemangioblastic capacity, we performed cDNA microarray analysis and then selected one transcription factor.

Subsequently, we constructed adenoviral vector including the sequence of selected gene and transfected the vector with the PDL cells. According to this treatment, both angiogenic and hematopoietic capacity were significantly enhanced. Furthermore, the gene expression of hematopoietic marker gene; c-kit(CD117) was upregulated in viral titer-dependent manner. In consequence of these data, we identified one vital gene to regulate hemangioblastic capacity of the PDL cells.

研究分野：医歯薬学

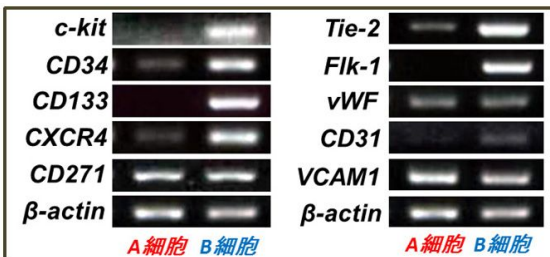
キーワード：再生医療 造血幹細胞 血管新生 歯根膜幹細胞 三次元培養

1. 研究開始当初の背景

最近、歯根膜中には間葉系幹細胞が存在し、この細胞が線維芽細胞・骨芽細胞ならびにセメント芽細胞に分化し、硬組織および線維性軟組織を形成することが報告されたが (Seo et al., Lancet, 2004)、この細胞が歯根膜中の血管構成細胞や血球細胞に分化しうるかどうかは全く明らかにされていなかった。

この点に着目しこれまでに我々は、この歯根膜由来幹細胞が血管構成細胞へと分化し、三次元培養下に血管内皮細胞マーカー陽性かつ連続した管腔構造を有した血管構造を構築する能力を有することを見出し報告した。(Okubo et al., J. Vasc. Res., 2010) 以上の結果から、歯根膜細胞には、以前より報告のある硬組織形成能力に加え、血管形成能力を有する血管前駆細胞が存在することが明らかとなった。

一方、一般的に造血幹細胞と血管前駆細胞はヘマンジオブラスト (hemangioblast) と呼ばれる共通前駆細胞から分化すると考えられている。このことは、血管内皮細胞に分化できる細胞は造血幹細胞にも分化しうる可能性があることを示唆している。実際に我々が作成した血管構築能力を有する PDL 細胞集団は、同時に複数の造血幹細胞マーカーの発現も認めることを確認している。



造血幹細胞(左)および血管内皮細胞(右)マーカーの発現 (A細胞:歯根膜由来コントロール細胞 B細胞:血管構築細胞)

さらに、3次元培養下で形成される PDL 細胞塊から伸長する血管構造物の基部および形成された管腔構造の内部に A 細胞においては観察されない周囲の組織と結合しない血球様細胞が多数出現することを確かめている。

2. 研究の目的

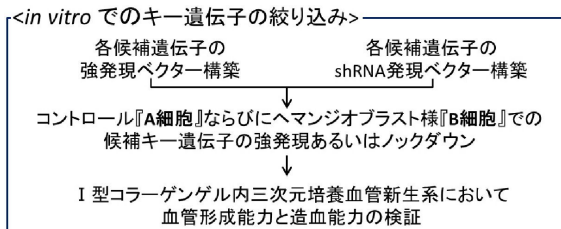
1.の背景で述べたように歯根膜組織中には血管前駆細胞、さらには造血幹細胞への分化能力を有したヘマンジオブラスト様細胞が存在する可能性は高い。そこで、この歯根膜由来ヘマンジオブラスト様細胞において、その造血能力と血管新生能力を制御するキー遺伝子を調査・特定し、この細胞の造血・血管構築能力による損傷虚血組織に対する革新的な組織再生技術の確立のための基盤を築きたい。これまでに、我々は歯根膜細胞初代培養系から限界希釈法を用いて単一細胞より増殖させ確立した複数の Single Cell-derived Culture のうち、いずれも複数の間葉系幹細胞マーカーを発現しながら、血

管構築能の低い細胞(以下『A細胞』:コントロール細胞)と血管構築能の高い細胞(以下『B細胞』:血管構築細胞)の樹立に成功している。そして、同一初代培養系由来のこれらの2つの細胞を利用した各細胞間における遺伝子発現頻度差について Micro-Array による網羅的な発現解析、さらにはエピジェネティクス解析としての網羅的 DNA メチル化解析を完了した。これらの結果をもとに血管形成・造血幹細胞形成に関わると考えられる遺伝子をすでに複数ピックアップしており、ここで候補となった遺伝子を中心に解析を行い歯根膜由来ヘマンジオブラスト様細胞の造血・血管新生能発現誘導に必須なキー遺伝子を特定したい。そして、これらの遺伝子操作により歯根膜細胞からの血管内皮細胞あるいは造血性幹細胞への分化を自在に操作する技術を確立する。さらに、『B細胞』のような造血能と血管新生能を併せ持つ細胞の表面に特異的に発現する表面抗原を特定し、この表面抗原を指標として歯根膜中のヘテロな細胞集団から効率よく造血・血管新生能を有するヘマンジオブラスト様細胞の選別技術を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 歯根膜由来ヘマンジオブラスト様細胞において、その多分化能力の誘導に関わるキー遺伝子を特定する

これまでに網羅的遺伝子発現頻度差解析 (microarray) と網羅的遺伝子メチル化解析 (methylation array) により、歯根膜由来ヘマンジオブラスト様細胞における血管形成・造血幹細胞形成に関わると予想される候補キー遺伝子を複数選定することを完了している。まずはこの候補遺伝子の過剰発現ベクターの構築を行う。そして、それぞれの候補遺伝子を過剰発現させた歯根膜細胞に対して、三次元培養による血管新生や各種幹細胞マーカーの発現の変化などを解析する。さらには、shRNA 導入によるノックダウン法も併用して解析を行うことで、歯根膜由来ヘマンジオブラスト様細胞が有する多分可能力の誘導に関わっているキー遺伝子を特定する。

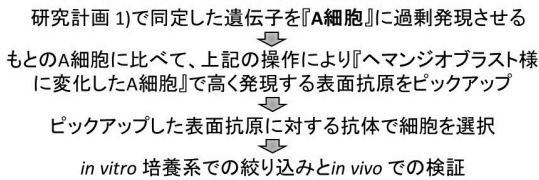


(2) 歯根膜由来ヘマンジオブラスト様細胞の表面に特異的に発現する表面抗原を特定し、歯根膜細胞集団からこの細胞を効率的に選択する技術を確立する

方法(1)で特定したヘマンジオブラスト様能力発現を誘導する遺伝子を、ヘマンジオブラ

スト様能力のない『コントロール A 細胞』に対して過剰発現(あるいは能力発現抑制性キ-遺伝子のノックダウン)させ、ヘマンジオプラスト様細胞に変化させる。この『能力増強 A 細胞』と『コントロール A 細胞』との表面抗原の発現頻度差を網羅的遺伝子発現解析にて解析する。この際、『コントロール A 細胞』と比較して『能力増強 A 細胞』に高く発現する表面抗原を複数ピックアップしてこれらを、歯根膜由来ヘマンジオプラスト選別のための候補遺伝子とする。ついで、この候補表面抗原に対する抗体を利用して、歯根膜組織から抽出した細胞集団から候補表面抗原発現細胞を選別する。選別した細胞がヘマンジオプラスト様能力を有しているかどうかを、造血幹細胞・血管内皮細胞マーカーを標的とした RT-PCR ならびに 型コラーゲン内三次元培養血管新生系により評価し、候補抗原の中から歯根膜由来ヘマンジオプラストに特異的な表面抗原を絞り込み、ついで *in vivo* における造血・血管構築能を確認することで特定する。この研究成果により、歯根膜組織中からヘマンジオプラストを選別して組織再生医療に応用する技術の基盤が形成される。

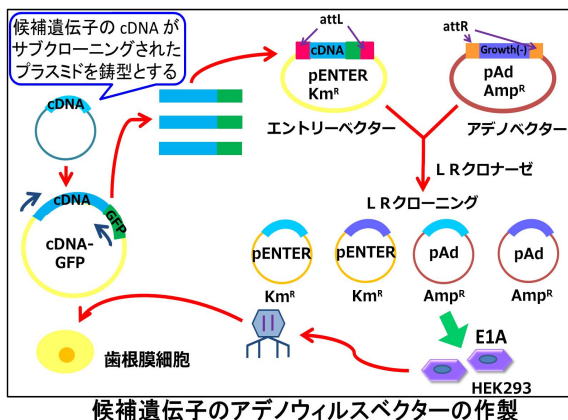
<ヘマンジオプラスト特異的細胞表面抗原の特定>



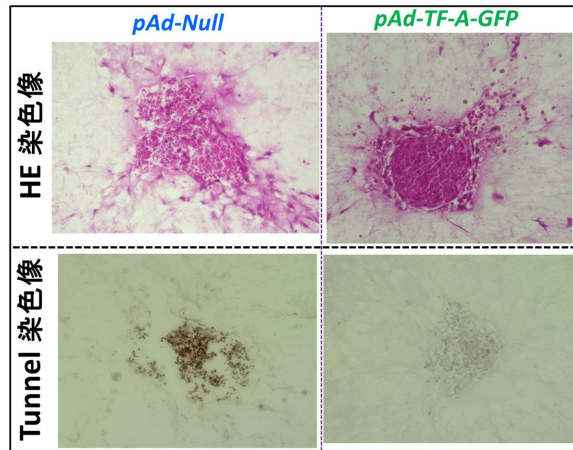
#### 4. 研究成果

##### (1) 歯根膜由来ヘマンジオプラスト様細胞において、その多分化能力の誘導に関わるキ-遺伝子を特定する

網羅的遺伝子発現頻度差解析と網羅的遺伝子メチル化解析により得られた複数の候補遺伝子について、その過剰発現プラスミドベクターを構築した。しかし、予想に反し構築したプラスミドベクターによる遺伝子導入効率が非常に低く解析できるレベルに満たなかった。そこでまず、これらの候補遺伝子をより効率よく発現させるためにアデノウイルスベクターの作成を試みた。

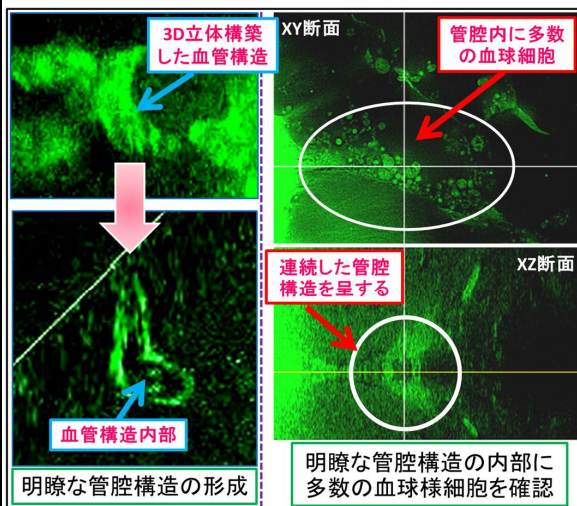


その結果、網羅的遺伝子発現解析において最も優位な発現頻度差を示したある**転写因子 A** (Transfection Factor-A:TF-A と略)を導入した場合に、コントロール細胞と比較し、新生した血管構造に対する優位な抗アポトーシス作用(Tunnel assay により確認)と顕著な新生血管基部における血球様細胞の湧出(組織切片とタイムラプス解析により確認)が観察された。



転写因子A(TF-A)導入による効果  
(上段:血球様細胞の誘導 下段:抗アポトーシス作用)

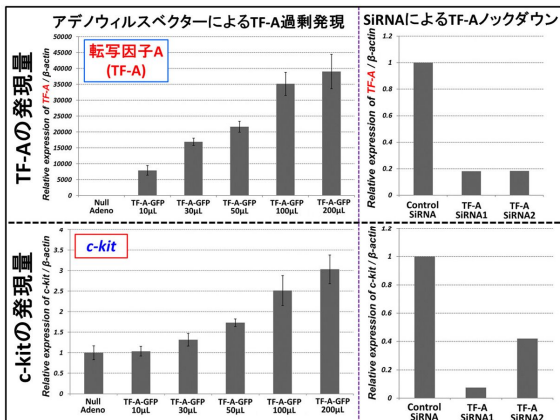
さらに三次元立体画像構築解析によって TF-A の過剰発現群では血管・血球新生においてコントロール群と比較し、優位に血管径の太さが向上し、新生血管内部の血球様細胞の数においても優位に増加していることが判明した。



転写因子A(TF-A)導入による効果2  
(三次元立体画像構築解析)

この結果を元に、造血幹細胞の維持に必須と言われる転写因子 c-kit とこの TF-A の発現に相関があるか検索したところアデノウイルスベクターの投与量依存的な正の相関関係が成立すること、また siRNA による TF-A のノックダウンによって c-kit の発現も低下することを見出した。血管新生誘導能の乏しい A 細胞と比べて血管新生誘導能の高い B 細胞において優位な発現を示した TF-A が血球

様細胞の誘導にも関与していたことから、我々が特定した TF-A は血管血球前駆細胞であるヘマンジオブラストの誘導に関わっている可能性が示唆された。

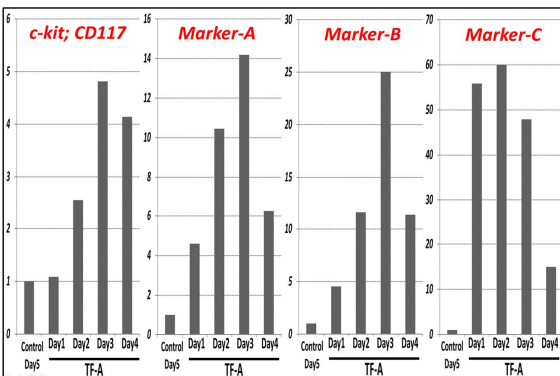


造血幹細胞マーカー;c-kit発現誘導に与えるTF-Aの影響

## (2) 歯根膜由来ヘマンジオブラスト様細胞の表面に特異的に発現する表面抗原を特定し、歯根膜細胞集団からこの細胞を効率的に選択する技術を確認する

将来的に歯根膜組織中に存在する多分能力を有するこのヘマンジオブラスト様幹細胞を再現性よく効率的に抽出するために、網羅的遺伝子発現解析の結果より、血管新生能の高いB細胞において優位に発現が向上していた遺伝子群などを参考に癌幹細胞や組織幹細胞の維持にとって重要であると報告されている表面抗原マーカーや転写因子などを抽出し、TF-A 導入によってその発現が優位に上昇する複数の遺伝子を見出した。

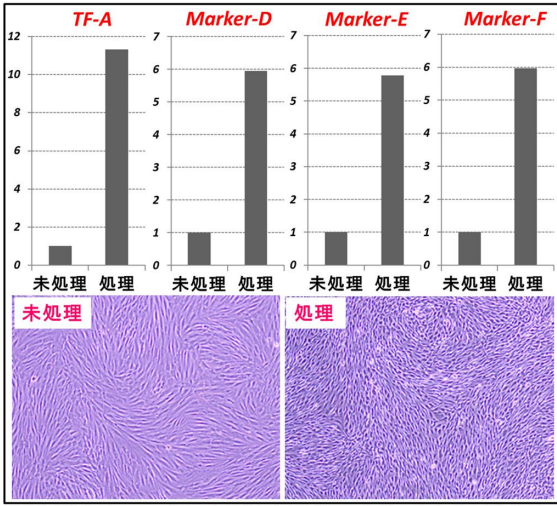
これにより、これらのマーカー群はヘテロな歯根膜組織中よりヘマンジオブラスト様幹細胞を効率よく濃縮するのに有用なマーカーである可能性が示唆された。



TF-A導入により継続的に発現が上昇する癌・組織幹細胞マーカー

樹立済みのRat由来歯根膜幹細胞を用いた上記の実験と平行してヒト由来の歯根膜幹細胞の採取方法についても preliminary な検討を行った。歯根膜組織採取直後からの様々な刺激を検討した結果、過去の論文で一般的に用いられている従来通りの方法(未処理群)

と比較してある条件で組織抽出・培養すること(処理群)で複数の幹細胞マーカーおよびTF-A においてその遺伝子発現が優位に上昇した画分が抽出できさらに、その細胞の形態も未処理群と比較してより立体的で、増殖能力も高くなることを確認した。



細胞採取法の工夫による抽出画分の変化(未処理:従来法) (上段:幹細胞マーカー発現 下段:細胞形態の変化)

これにより、今回我々が選定した転写因子A(TF-A)がヘマンジオブラスト様幹細胞を含む歯根膜幹細胞においてその多分可能を誘導するキー転写因子となりうる可能性が示唆された。今後は、今回選定した TF-A の誘導によって発現が上昇することを指標に表面抗原マーカーを選択し、歯根膜細胞集団から幹細胞画分を効率よく選択する技術の開発につなげたい。

### 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 12 件)

- Onishi R, Okubo N(6th) et.al(査読あり) "Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Severe Colitis in Rats." Cell Transplantation, 2015;25 in press
- Yamada C, Okubo N(6th) et.al(査読あり) "Serotonin 2C receptor contributes to gender differences in stress-induced hypophagia in aged mice." Psychoneuroendocrinology, 2015;55:81-93 doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.02.006.
- Aomatsu E, Okubo N(4th) et.al(査読あり) "Novel SCRG1/BST1 axis regulates self-renewal, migration, and osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells." Scientific Report, 2014;4:3652 doi: 10.1038/srep03652.

4. Yokota J, **Okubo N(4th)** et.al(査読あり)  
“ PDGF-induced PI3K-mediated signaling enhances the TGF- $\beta$ -induced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a TGF- $\beta$ -activated MEK-dependent manner.”

International Journal of Molecular Medicine, 2014;33:534-542  
doi: 10.3892/ijmm.2013.1606.

5. Kimura H, **Okubo N(Co-1st Author)** et al (査読あり)

“EGF positively regulates the proliferation and migration, and negatively regulates the myofibroblast differentiation of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through MEK/ERK- and JNK-dependent signals.”

Cellular Physiology and Biochemistry, 2013;32(4):899-914  
doi: 10.1159/000354493.

6. Takeda H, **Okubo N(3rd)** et.al(査読なし)

“Pathophysiological basis of anorexia: focus on the interaction between ghrelin dynamics and the serotonergic system.”

Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2013;36(9):1401-1405

Doi: 無し

7. Saito D, **Okubo N(6th)** et.al(査読あり)

“Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces epithelial-mesenchymal transition and integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-mediated cell migration of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells through Slug.”

The Journal of biochemistry, 2013;153(3):303-15.

doi: 10.1093/jb/mvs144.

8. Yoshida M, **Okubo N(Co-1st Author)** et al (査読あり)

“TGF- $\beta$ -Operated Growth Inhibition and Translineage Commitment into Smooth Muscle Cells of Periodontal Ligament-Derived Endothelial Progenitor Cells through Smad- and p38 MAPK-Dependent Signals”

International journal of Biological Sciences, 2012; 8(7):1062-1074.

doi: 10.7150/ijbs.4488.

9.Takahashi M, **Okubo N(2nd)** et.al(査読あり)

“Fibroblast growth factor-1-induced ERK1/2 signaling reciprocally regulates proliferation and smooth muscle cell differentiation of ligament-derived endothelial progenitor cell-like cells.”

International journal of molecular medicine, 2012 ;29(3):357-64.

doi: 10.3892/ijmm.2011.847.

10.Takahashi N, **Okubo N(5th)** et.al(査読あり)

“Dental pulp cells derived from permanent teeth express higher levels of R-cadherin than do deciduous teeth: Implications of the correlation between R-cadherin expression and restriction of multipotency in mesenchymal stem cells”

Archives of Oral Biology, 2012 Jan;57(1):44-51.

doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.07.013.

11.Nishihira S, **Okubo N(2nd)** et.al(査読あり)

“High-cell density-induced VCAM1 expression inhibits the migratory ability of mesenchymal stem cells.”

Cell Biology International, 2011;35(5):475-481

doi: 10.1042/CBI20100372.

12.**Okubo N(1st Author)** et al(査読あり)

“Vascular cell-like potential of undifferentiated ligament fibroblasts to construct vascular cell-specific marker-positive blood vessel structures in a PI3K-activation-dependent manner”

Journal of Vascular Research, 2010;47:369-383

doi: 10.1159/000277724.

[学会発表](計6件)

1.Naoki Takizawa, **Naoto Okubo**

“Establishment of a co-culture system for simultaneous proliferation of td-Tomato-expressing mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells and undifferentiated blood cells.”

第37回日本分子生物学会・総会  
2014.11.25 横浜・パシフィコ横浜

2.木村 仁迪, **大久保 直登**

“EGFによるPDL由来EPCの増殖、分化制御”

第55回歯科基礎医学会学術大会・総会  
2013.9.20 岡山・岡山コンベンションセンター

3.木村 仁迪, **大久保 直登**

“EGFが歯周靭帯由来血管内皮前駆細胞の増殖と筋線維芽細胞分化に与える影響について”

第86回日本生化学会大会  
2013.9.11 横浜 パシフィコ横浜

4.吉田茉莉子 **大久保直登**

“歯根膜由来内皮前駆細胞様筋線維芽細胞におけるTGF- $\beta$ 誘導性増殖抑制、平滑筋初期分化へのSmadならびにp38 MAPK経路の関与”

第35回日本分子生物学会年会  
2012.12.11 福岡・福岡国際会議場

5.木村仁迪 **大久保直登**

“EGFが歯周靭帯由来血管内皮前駆細胞様細胞の増殖と筋線維芽細胞分化に与える影響について”

第35回日本分子生物学会年会  
2012.12.11 福岡・福岡国際会議場

## 6. 客本斉子 **大久保直登**

“ TGF- $\beta$  による歯周靭帯由来血管内皮前駆細胞様細胞の増殖抑制と平滑筋細胞様分化のシグナル解析 ”

第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2012.9.14 福島 奥羽大学

〔図書〕(計 2 件)

1. **Naoto Okubo**, Akira Ishisaki

Chapter Title : “ Angiogenic capacity of Periodontal Ligament Derived Stem Cells ”

著書 : “ Advances in Oral Tissue Engineering ”

監修 : Masaru Murata, In-Woong Um

Quintessence Publisher, 2014: p.9-p.14

2. **大久保直登**, 武田 宏司

雑誌名 : G.I. Research (Journal of Gastrointestinal Research)

項目 : 医学用語解説 “ 咀嚼(mastication) と歯根膜幹細胞(Periodontal ligament stem cell) ”

先端医学舎, 『G.I. Research』2013 年 8 月号  
p.66-p.68(p.370-p.372)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/byoutai/>

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大久保 直登 ( NAOTO OKUBO )

北海道大学・薬学研究科・研究員

研究者番号 : 00553207