

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 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791935

研究課題名（和文） 歯根膜由来幹細胞の血管形成誘導遺伝子および細胞内シグナル伝達様式の解明

研究課題名（英文） Identification of the key genes promoting angiogenesis and the signaling pathways regulating angiogenesis of the periodontal ligament derived stem cells

研究代表者

大久保 直登 (OKUBO NAOTO)

岩手医科大学・歯学部・ポストドクター

研究者番号：00553207

研究成果の概要（和文）：我々は歯根膜組織中に存在する歯根膜幹細胞が血管を構築する能力を有することを初めて明らかとした。その際、同一組織由来の血管構築能力の高い細胞と低い細胞の2種類の細胞を樹立した。今回我々はこの2種類の細胞の網羅的遺伝子発現を解析・比較することで、血管新生を制御する可能性のある複数の遺伝子を選定することに成功した。さらに、血管構築能力の高い細胞による詳細な血管新生解析の結果、この細胞が血管を構築する際に同時に血液細胞も誘導している可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：We previously demonstrated that periodontal ligament derived stem cells have the potential to construct blood vessel structures. At that time, we have established two types of cells in a same origin, one has high angiogenic capacity and the other has low. And this time, we compared the comprehensive genomic expression profiles between the two types of cells. As a results, we have been able to select several candidate genes that have the possibility to regulate angiogenic activity. In addition, by further investigation about angiogenic phenotype using the cell type of possessing high angiogenic ability, we found the possibility that these cells have the ability to differentiate not only into blood vessel composed cells but also into eosinophilic blood cell-like cells simultaneously.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：再生歯学、再生・幹細胞・血管新生

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は、歯根と歯槽骨の2つの硬組織の間に介在する、解剖学上靭帯に分類される線維性結合組織であり、通常は歯の歯槽骨内へ

の保持力として働いている。一方で、矯正治療による歯牙の歯槽骨中の移動の際には、歯根圧迫方向の骨組織を吸収しながらも牽引方向の骨組織を添加するといったダイナミ

ックな硬組織のリモデリングを行う。さらに、根尖歯髄を含む歯根膜組織中に存在する毛細血管網や知覚神経網を含む軟組織が完全に再編成される様子が観察される。これらの現象から察するに、歯根膜中には異なる複数の組織を形成する能力を有する幹細胞様細胞が存在し、周囲の硬組織および歯根膜組織の維持と再編成に働いている可能性が非常に高いと考えられる。

近年、歯根膜組織中には線維芽細胞、血管構成細胞、神経細胞などの他に、骨芽細胞様あるいはセメント芽細胞様に分化する能力を有する間葉系幹細胞様の細胞が存在すると報告されたのを発端に (Seo et al., Lancet, 2004)、幹細胞様細胞が存在し硬組織・脂肪組織などへの多分化能力を有するという報告が多数見受けられるようになった。しかし、この間葉系幹細胞様細胞が血管構成細胞や神経細胞に分化する可能性については明らかとされていなかった。

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てきた (Okubo et al., J. Vasc. Res. 2010)。

再生医療の新たな可能性として最近、細胞の iPS 化技術が話題になっている。この技術は、通常分化能力の無い(最終分化を終えた)皮下由来の線維芽細胞を遺伝子導入により万能幹細胞様に変化させる技術である (Takahashi et al., Cell, 2006)。この報告は、線維芽細胞の可塑性の高さを示しているが、特に歯根膜細胞は分化能力の非常に高い特殊な線維芽細胞であり、この観点からも歯根膜細胞中に三胚様性の制約を超える超越分化能力を有した幹細胞が存在する可能性が示唆されている。

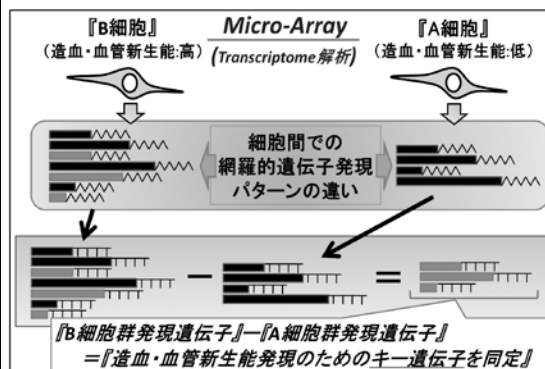
2. 研究の目的

1. の背景で述べたように、歯根膜由来幹細胞は様々な種類の組織へ分化する能力を有する可能性を有しており、口腔組織のみならず全身の組織再生のための非常に有力なソースとなる可能性を秘めている。実際に、歯根膜細胞シートを用いた再生医療など臨床応用へ導くための実用化研究も開始されている。しかし、歯根膜由来幹細胞の増殖・分化能力やそのメカニズムについてはいまだ不明な点が多い。そこでそのメカニズム解明の一端として、まず前述した独自の開発による歯根膜由来幹細胞による血管形成誘導モデルの系を用いて血管形成の制御に関わるメカニズムを分子レベルで明らかにする。と共に、さらなる多分可能性の可能性を模索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯根膜由来幹細胞の血管形成誘導能力の発現を制御すると思われるモデル遺伝子を複数ピックアップする

①我々が樹立した歯根膜由来の間葉系幹細胞マーカー陽性細胞のうち、血管形成能力が低い細胞(A細胞)と高い細胞(B細胞)の間での遺伝子発現様式について cDNA アレイを用いて網羅的に調査し、双方ともに発現する遺伝子、または片方にしか発現しない遺伝子を選定・解析することにより比較・検討する(下図参照)。

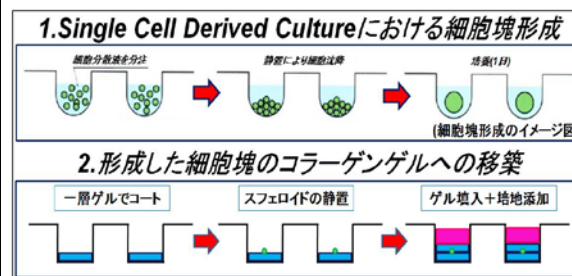


これらの解析から、この細胞の血管形成能力を制御すると思われるモデル遺伝子を複数ピックアップする。

②mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR 装置を用いた定量的 PCR 法により、cDNA アレイによって認められた遺伝子の発現頻度差について定量的に厳密な調査を行う。

(2) (1) でピックアップしたモデル(候補)遺伝子の中から真の血管形成誘導遺伝子を in vitro において絞り込む

①ピックアップした歯根膜由来幹細胞の血管形成能力誘導モデル遺伝子のプラスミドベクターを構築し、(1) で用いた間葉系幹細胞マーカー陽性細胞のうち、血管形成能力が低い A 細胞にトランスフェクション後、血管構築能力が向上するかどうかについて、独自に開発した in vitro 三次元培養系血管新生モデルを用いて評価することにより(下に概略図を示す)、血管形成誘導遺伝子の絞り込みおよび同定を行う。



一方で、siRNA を用いて血管形成型細胞における該当候補遺伝子のノックアウトする

ことにより血管形成が起こらなくなりうるかも調査し、裏付け評価を行う。

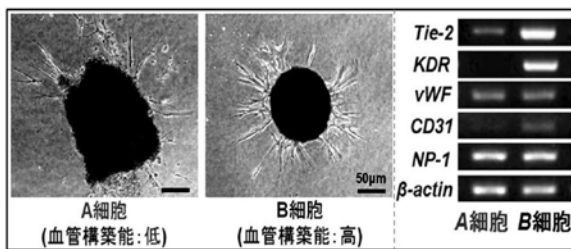
②同定された血管形成誘導遺伝子が他組織由来間葉系幹細胞でも同様の働きを示すかどうか、骨髄由来間葉系幹細胞に強発現して血管内皮細胞様分化や血管様構造物形成能力が誘導されるかどうかを調査する。

③同定した血管形成誘導遺伝子を血管形成能力が低い細胞集団に強発現させ、ヌードマウス背部皮下に埋入し、この細胞の *in vivo* における血管形成能力について、この遺伝子を強発現させない細胞を用いた場合との比較を組織学的な手法を用いて行う。これらの研究により、血管形成誘導遺伝子が *in vivo* での血管形成誘導能力発現に関わるかどうかについて明らかにする。

4. 研究成果

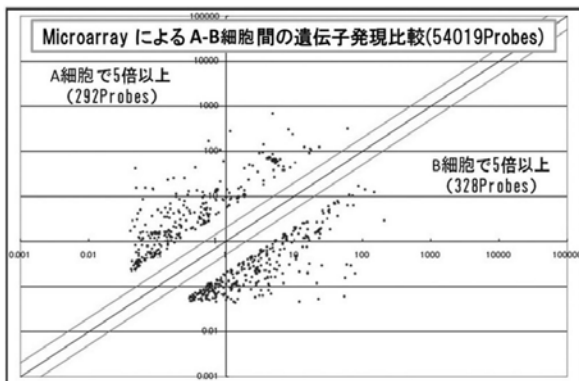
(1) 歯根膜由来幹細胞の血管形成誘導能力の発現を制御すると思われるモデル遺伝子を複数ピックアップする

①研究実施計画に示していたように、自身で樹立した単一の歯根膜細胞初代培養系から派生した2種類の細胞、1)血管形成能の高い細胞群と2)低い細胞群の血管形成能力の違いに着目し、(下図)この2種類の細胞間での遺伝子発現様式について cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に調査を行った。



各細胞群による三次元培養時の血管構築能力の差
右:形態像 左:血管特異的のマーカの発現差

その結果、血管形成能力の高いものだけに優位に発現する遺伝子を''血管形成誘導能力の発現を制御すると思われる候補遺伝子''として選定を行うことに成功した。



網羅的遺伝子発現解析の結果

②マイクロアレイの結果より見出した複数の遺伝子を指標に、1)の血管形成能力の高い細胞群に対して、血管形成に促進的に作用するさまざまな刺激を行った際の遺伝子の発現を調べた結果、特徴的な発現パターンを示す候補遺伝子群を見出した。

③さらに、同一サンプル間のエピジェネティクス解析としての網羅的 DNA メチル化解析も行なった。その結果を Micro-Array 解析と照合した結果、''血管形成誘導能力の発現を制御すると思われる候補遺伝子''として選定していた遺伝子のうちの複数のエピジェネティックなレベルでも同様の修飾を受けていることが判明した。

④A 細胞群に対してこの候補遺伝子の遺伝子発現レベルを指標にその発現を効率的に向上させるような環境下で血管新生を行うことにより *in vitro* 三次元培養下において血管新生がより効率的に起こせることを見出した。興味深いことに、この遺伝子群の中には上記の刺激に呼応してその遺伝子発現に正または負の相関関係を示すものがあり、それらの遺伝子群が関わる血管新生誘導刺激に対するシグナル伝達機構についても現在調査を行なっている。

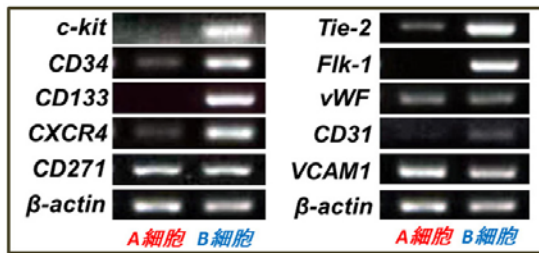
(2) (1) でピックアップしたモデル(候補)遺伝子の中から真の血管形成誘導遺伝子を *in vitro* において絞り込む

①マイクロアレイ解析およびメチレーション解析によって、血管新生に関わる複数の遺伝子のピックアップおよび、それらの遺伝子の間に正または負の相関関係が維持されているという裏付けを得たところで、その中で最も重要であろうと考えられる転写因子等について、プラスミドベクターを作成した。しかし、作成したベクターによる遺伝子導入効率が非常に低いことが判明し、さらに siRNA を用いたノックアウト実験においてもその導入効率同様に著しく低かった。

それに対し現在これらの候補遺伝子をより効率的に発現させるためのアデノウイルスベクターを作成中でありこれにより更なる解析が進むものと期待される。

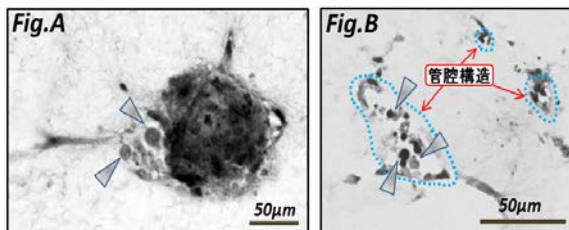
② *in vitro* 三次元培養下での血管新生促進実験を続ける中で、ある非常に興味深い組織像が確かな再現性を有して観察された。

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する我々が用いてい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するものである。すでに、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同時に認めることを見出していた(次頁の B 細胞)。



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)

今回血管新生促進実験を進める中で、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(下図 Fig.A)および形成された管腔構造の内部(下図 Fig.B)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非接着性血球様細胞が多数出現することを見出した。現在免疫組織学的解析を含む詳細な解析を行なっている。



細胞塊基部(A)および管腔内(B:点線は管腔構造を示す)に多数出現する非接着性細胞(矢印)

③その後の解析により、先に示した複数の造血幹細胞マーカーの中にも前述のピックアップした候補遺伝子の発現と複数の発現に関しても相関性を示すものがあり、血管新生を制御する遺伝子であると思われる候補遺伝子が造血幹細胞と血管全九細胞の共通前駆細胞であるヘマンジオブラストの制御にも関わっている可能性が示唆された。

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 4 件)

①Takahashi M, Okubo N (2nd) et. al
“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、査読有、29 巻、2012、pp. 357-364、DOI: 10.3892/ijmm.2011.847

②Takahashi N, Okubo N (5th) et. al
“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、査読有、57 巻、2012、pp. 44-51、DOI: 10.1016/j.archoralbio.2011.07.013

③Nishihira S, Okubo N (2nd) et. al
“High-cell density-induced VCAM1 expression inhibits the migratory ability of mesenchymal stem cells.”

Cell Biology International、査読有、35 巻、2011、pp. 475-481、DOI:10.1042/CBI20100372

④Okubo N (1st) et. al
“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、査読有、47 巻、2010、pp. 369-383、DOI: 10.1159/000277724.

[学会発表] (計 5 件)

①Naoto Okubo
“TGF-β-induced smooth muscle cell differentiation of ligament-derived endothelial progenitor-like cells”
第 34 回日本分子生物学会年会
2011.12.13 横浜

②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構築”
北海道歯学会
2011.5.13 札幌 (北海道歯学会賞受賞)

③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”

第 2 回『歯のバイオリサイクル医療の革新と海外ビジネス戦略』に係る中間報告検討会
2010.12.15 札幌

④大久保 直登
“歯根膜由来間葉系幹細胞による血管構造形成メカニズムの解明とキー遺伝子の同定”
岩手医科大学オープン・リサーチ・プロジェクト
発表会 2010.8.7 盛岡

⑤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
2010.7.3 盛岡 (岩手歯学会賞受賞)

[図書] (計 1 件)

Masaru Murata et. al (One Chapter 担当)

Quintessence Publisher, USA
” Tooth Materials Science and Clinical
Applications”
In press

[その他]
ホームページ等
<http://cellbiosignal.jp/publications.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大久保 直登 (NAOTO OKUBO)
岩手医科大学・歯学部・ポストドクター
研究者番号：00553207