

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670818

研究課題名(和文) 新たなリプログラミング法による組織幹細胞作製技術の開発

研究課題名(英文) Development of production technique of tissue derived stem cell using novel reprogramming system.

研究代表者

窪木 拓男 (Kuboki, Takuo)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00225195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、microRNA (miRNA)が細胞の性質決定に重要な役割を果たしている事が知られている。我々は、組織幹細胞未分化維持に関わるmiRNAを同定することを目的に、ヒト歯髄細胞および歯根膜細胞から高い幹細胞性を持つSide population (SP)細胞をセルソーターにて分離し、miRNA アレイおよびin silico解析を行った。その結果、幹細胞関連遺伝子の一つであるNANOG をターゲットとするmiR-720が同定された。実際、miR-720の強制発現、発現抑制実験の結果、miR-720がNANOGの発現を制御し、幹細胞性を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Small non-coding microRNAs (miRNAs) have been reported to play important roles in stem cell biology, related to cell reprogramming, maintenance of stemness and regulation of cell differentiation. We herein sorted stem-cell-enriched side population (SP) cells from human DPCs and PDLCs, and performed a miRNA array. As a result, miR-720 was highly expressed in the differentiated main population (MP) cells compared to that in SP cells. In silico analysis and a reporter assay showed that miR-720 targets the stem cell marker NANOG, indicating that miR-720 could promote differentiation of dental pulp stem/progenitor cells by repressing NANOG. Indeed, gain-and loss-of-function analyses showed that miR-720 controls NANOG transcript and protein levels. Moreover, transfection of miR-720 significantly decreased the number of cells positive for the early stem cell marker SSEA-4. Our findings identify miR-720 as a novel miRNA regulating the differentiation of DPCs.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：microRNA リプログラミング side population 間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、組織幹細胞の代表である、骨髄由来間葉系幹細胞を用いた数多くの歯周組織再生療法が試みられており、一定の効果が報告されてはいるものの、その効果は限局的で安定性にも乏しいケースが存在するのが現状である。その一因として、歯根膜・セメント質・歯槽骨などの複雑な歯周組織構成細胞の全てを、骨髄由来間葉系幹細胞のみでは効率的に供給できてないことが議論されており、より効率的に歯周組織を再生する事ができる多分化能を有した細胞の開発が急務である。

一方で、倫理的な観点からその臨床応用に大きな制約のある ES 細胞と異なり、組織幹細胞を分化した状態から未分化な状態へと時間の矢を逆行させることができる iPS 細胞作製技術は画期的な技術であり、様々な難治性疾患に対する再生医療の基盤技術として大きな期待がよせられている。しかしながら、iPS 細胞の臨床応用には、作製過程の複雑性、細胞の完全な初期化による腫瘍化の危険性など、未だ解決しなければならない問題が山積している。

## 2. 研究の目的

これらの問題点を解決するために、本申請研究では、新たな歯周組織再生療法の開発を念頭に置き、より簡便な手法を用いた未分化な組織幹細胞を開発することを目的として研究計画を立案した。その戦略として、歯周組織の構成成分の一つである、歯根膜組織から組織前駆細胞を単離し、同定した転写因子や miRNA を駆使することで、部分的なリプログラミングを行い、歯周組織再生に寄与する特化した分化能を有した細胞を作製しようとしている。すなわち、組織に存在する前駆細胞をリプログラミングすることで、その細胞の特性を持たせたまま未分化組織幹細胞を作製する技

術を開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト歯髄細胞、歯根膜細胞の分離・培養

岡山大学倫理委員会承認のもと、本実験の趣旨に同意の得られた患者から矯正治療等で抜歯になった健全歯を得た。Gronth (Proc Natl Acad Sci USA, 2000)および Seo (Lancet, 2004)らの方法に従い、歯髄細胞、歯根膜細胞を分離、培養した。

### (2) セルソーターを用いた未分化間葉系幹細胞の分離および機能解析

未分化間葉系幹細胞は通常の組織細胞と比較し、ABCG トランスポーターの機能が高く、Hoechst にて染色し、Hoechst Blue と Red にてドットプロットを行うと、Main population (MP)分画と異なる部位に分布する (Side population (SP)分画) ことが知られている。そこで、分離した歯髄細胞、歯根膜細胞を Hoechst にて染色し、FACS Aria にて SP 細胞を分離した。

分離した SP 細胞と MP 細胞を比較検討するため、ABCG2 トランスポーターおよび未分化幹細胞マーカーの一つである OCT4、NANOG の遺伝子発現量を定量性 RT-PCR 法にて評価した。また、colony forming unit-fibroblast (CFU-F) アッセイにてコロニー形成能を比較検討した。

### (3) miRNA array 解析および in silico 解析

MP細胞に高発現するmiRNAの探索を目的に、miRCURY LNATM microRNA Arrayシステム (Exiqon Life Sciences, Vedbaek, Denmark)を用い、網羅的に解析した。

また、in silico解析にはmiRDBソフトウェア (<http://mirdb.org/miRDB>)を使用した。

### (4) miRNA 過剰発現、発現抑制モデルを用い

## た機能解析

実験3で抽出されたmiRNA-720に関して、強制発現モデルでは、has-miR-720 Mimic (mirVana, Life Technologies)を、発現抑制モデルにはmiR-720 inhibitor (mirVana)を Lipofectamine RNAi-Max (Life Technologies)を用い遺伝子導入した。miR-720の過剰発現、発現抑制が間葉系幹細胞に与える影響を、幹細胞マーカーの一つである *NANOG* の遺伝子発現量を定量性 RT-PCR法、タンパク質の発現量を細胞免疫化学染色法にて、細胞膜表面のSSEA4の発現量をフローサイトメーターにて解析した。また、miR-720を強制発現または発現抑制した歯髓細胞を骨芽細胞誘導培地にて培養し、骨芽細胞分化に与える影響をAlizarin red 染色および骨芽細胞分化マーカーの発現量を定量性RT-PCR法にて評価した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト歯髓細胞、歯根膜細胞の分離・培養

Gronth および Seo らの方法に従い、ヒト抜去歯から歯髓細胞、歯根膜細胞を分離、培養した。

### (2) セルソーターを用いた未分化間葉系幹細胞の分離および機能解析

分離した細胞を Hoechst にて染色し、FACS Aria を用いて Hoechst Blue と Red にてドットプロットし、SP 細胞と MP 細胞に分離した。また、ABC G プロモーターの機能阻害剤である verapamil を加えると SP 細胞が消失することを確認した。

分離した SP 細胞と MP 細胞を比較検討した結果、ABC G2 トランスポーターおよび未分化幹細胞マーカーの一つである *OCT4*、*NANOG* の遺伝子発現量は SP 細胞において有意に高かった。また、CFU-f アッセイの結果、SP 細胞群の方がコロニー系性能が高い細胞群であることが明らかとなった。

### (3) miRNA array 解析および in silico 解析

miRNA array 解析の結果、MP 細胞において、miR-1260b, miR-720, miR1280, miR-491-3p, miR-1260a, miR-138-1 が高発現していることが明らかとなった。これらの miRNA のターゲット遺伝子の探索を目的に in silico 解析を行った。その結果、miR-720 は未分化幹細胞マーカーの一つである *NANOG* をターゲットにし、間葉系幹細胞の未分化維持を制御している可能性が示唆された。そこで、以降の実験では、miR-720 に関し詳細に検討した。

### (4) miRNA 過剰発現、発現抑制モデルを用いた機能解析

実験3で抽出されたmiR-720に関して、強制発現、発現抑制モデルを用い機能解析を行った。その結果、miR-720を強制発現させると、*NANOG*の遺伝子発現量、タンパク質の発現量は有意に抑制され、SSEA4の発現量も低下した。一方、miR-720を発現抑制すると、*NANOG*の遺伝子発現量、タンパク質の発現量は有意に亢進し、SSEA4の発現量も増加した。また、これらの細胞を骨芽細胞分化誘導培地にて培養すると、miR-720過剰発現群では骨芽細胞分化が促進され、miR-720発現抑制群では抑制された。

つまり、miR-720は*NANOG*の発現を制御することで、歯髓細胞、歯根膜細胞の未分化維持に関与している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Hara ES, Ono M, Eguchi T, Kubota S, Pham HT, Sonoyama W, Tajima S, Takigawa M, Calderwood SK, Kuboki T. miRNA-720 controls stem cell phenotype, proliferation and differentiation of

human dental pulp cells . PLoS One.; 8(12): e83545, 2013. (査読有り)

2. Eguchi T, Watanabe K, Hara ES, Ono M, Kuboki T, Calderwood SK. OstemiR: a novel panel of microRNA biomarkers in osteoblastic and osteocytic differentiation from mesencymal stem cells. PLoS One.; 8(3): e58796, 2013. (査読有り)

[学会発表](計 4 件)

1. Hara ES, Ono M, Eguchi T, Pham HT, Tajima S, Calderwood SK, Matsumoto T, Kuboki T. miR-720 regulates the stem cell phenotype and differentiation of human dental pulp-derived mesenchymal stromal cells. 25th 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science. (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems) Nagoya, Japan. 2014.11.11.
2. Pham HT, Ono M, Hara ES, Nakajima R, Sonoyama W, Kuboki T. Differential effects of short-term treatment with tumor necrosis factor-alpha on the stem cell phenotype and differentiation ability of dental tissue-derived stem/progenitor cells. 第32回日本骨代謝学会学術集会 . 大阪 , 日本 . 2014.7.25.
3. Hara ES, Ono M, Eguchi T, Pham HT, Calderwood SK, Tajima S, Matsumoto T, Kuboki T. Control of stemness of human dental pulp-derived mesenchymal stem/progenitor cells by miR-720. バイオアセンブラ第3回若手シンポジウム. 東京, 日本. 2014.7.3.
4. Hara ES, Ono M, Sonoyama W, Eguchi T, Pham HT, Calderwood SK, Kuboki T. miRNA-720 regulates stem cell phenotype, proliferation and differentiation of

dental pulp cells. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会 . 岡山 , 日本 . 2013.9.21.

[図書](計 0 件)

[産業財産権](計 0 件)

[その他] 特になし

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

窪木 拓男 (KUBOKI Takuo)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
インプラント再生補綴学分野・教授  
研究者番号 : 00225195

### (2) 研究分担者

大野 充昭 (ONO Mitsuaki)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
インプラント再生補綴学分野・助教  
研究者番号 : 60613156

秋山 謙太郎 (AKIYAMA Kentaro)

岡山大学・大学病院  
クラウン・ブリッジ補綴科・講師  
研究者番号 : 70423291