

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20592

研究課題名(和文) MSX1遺伝子による歯髄幹細胞の骨芽細胞/象牙芽細胞分化制御の解明

研究課題名(英文) Role of MSX1 in osteo/odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells

研究代表者

五藤 紀子(GOTO, NORIKO)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：10735137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：MSX1は歯髄幹細胞特異的に象牙芽細胞/骨芽細胞分化を制御している。MSX1ノックダウンにより発現が影響される遺伝子をDNAマイクロアレイにより網羅的に解析した。骨分化誘導条件下において、MSX1ノックダウンはコレステロール合成に関連する多くの遺伝子の発現を増加させた。以前よりコレステロール合成系の阻害が象牙芽細胞/骨芽細胞の分化を促進することが知られていたが、骨関連転写因子との関連は不明であった。本研究では、MSX1がコレステロール合成系全体を転写レベルで抑制することを示し、象牙芽細胞/骨芽細胞分化誘導の制御には、コレステロール代謝が関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：When human dental pulp stem cells were exposed to osteogenesis-induction medium, runt-related transcription factor-2 (RUNX2), bone morphogenetic protein-2 (BMP2), alkaline phosphatase (ALPL) mRNA levels, as well as alkaline phosphatase activity, increased on days 4-12 and thereafter the matrix was calcified on day 14. However, knockdown of MSX1 with small interfering RNA abolished the induction of the osteoblast-related gene expression, alkaline phosphatase activity and calcification. Interestingly, DNA microarray and PCR analyses revealed that MSX1 knockdown induced the sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) transcriptional factor and its downstream target genes in the cholesterol-synthesis pathway. Inhibition of cholesterol synthesis enhances osteoblast differentiation of various mesenchymal cells. Thus, MSX1 may downregulate the cholesterol synthesis-related genes to ensure osteoblast differentiation of human dental pulp stem cells.

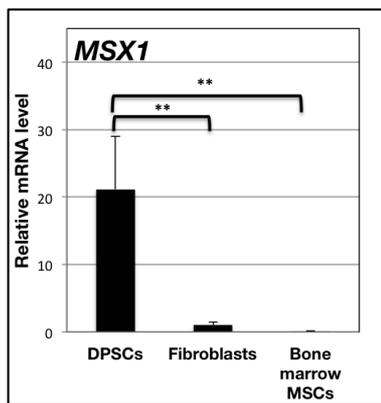
研究分野：小児歯科

キーワード：MSX1 歯髄幹細胞 骨分化 SREBP2 コレステロール合成 アルカリフォスファターゼ RUNX2 siRNA

### 1) 研究開始当初の背景

近年、再生医療で使用する細胞源のひとつとして歯髄幹細胞が注目されている。2003年にその存在と特性が明らかにされてから、その多分化能と高い増殖能により、顎顔面領域のみならず、全身の様々な組織の修復や再生に有効であることが証明されてきた。

また、申請者は、歯髄幹細胞において、体幹の骨髄、脂肪組織、関節滑膜由来の幹細胞や線維芽細胞よりホメオボックス遺伝子 MSX1 の発現が、5倍以上高いことを DNA マイクロアレイ解析により明らかにした(図 1)。MSX1 は、歯や頭頸部など様々な器官原基形成を制御する転写因子である。ヒト MSX1 に変異がおこると歯の先天性欠損や口唇口蓋裂が引き起こされる。MSX1 は歯胚の間葉で高発現して、歯の形成に大きな役割を果たすことが知られている。



(図 1) MSX1 発現レベルの比較

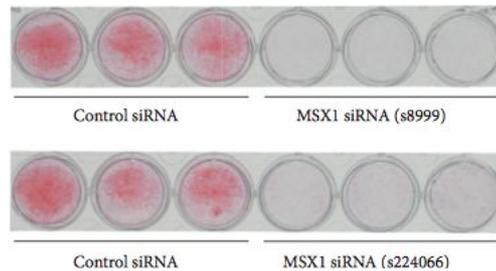
\*\* $p < 0.01$

MSX1 標的遺伝子の探索

MSX1 抗体を用いた ChIP-seq 解析と MSX1 ノックダウンにより発現が影響される遺伝子群のマイクロアレイ解析を行い、2つの解析結果をオーバーラップさせることで MSX1 の標的候補遺伝子を選定した。この中には骨芽細胞分化、象牙芽細胞分化に重要な遺伝子も多くみられた。また、リアルタイム PCR 解析を行い、これらの遺伝子の発現が MSX1 ノックダウンにより強く影響されることを確認した。

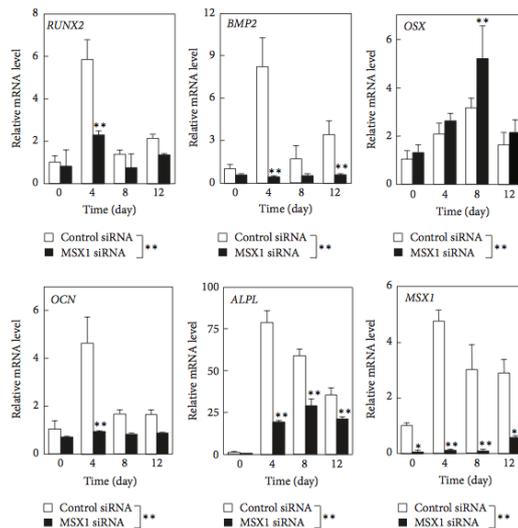
MSX1 ノックダウンの骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化に対する影響

siRNA を用いて MSX1 をノックダウンし、骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化誘導培地で培養したところ、MSX1 ノックダウン細胞では石灰化が抑制され(図 2)、アルカリフォスファターゼ活性、骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化関連遺伝子の発現が低下していた(図 3)。従って、MSX1 は骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化の促進因子であることが示唆された。



(図 2) アリザリンレッド染色

歯髄幹細胞の石灰化における MSX1 ノックダウンの効果(2種類の siRNA にてノックダウンを行った)



(図 3) MSX1 ノックダウンが与える影響

象牙芽細胞 / 骨芽細胞分化関連遺伝子および MSX1 の mRNA レベルの変化

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

### 2) 研究の目的

ホメオボックス遺伝子 MSX1 は上皮間葉相互作用による器官形成に重要な因子である。申請者は、MSX1 が歯髄幹細胞に高発現し、骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化に必須の因子であることを解明した。また、ChIP-seq および DNA マイクロアレイ解析を行い、MSX1 標的候補遺伝子を同定した。しかし、その下流で働く遺伝子や分化制御に関わるシグナル因子については不明である。本研究では、これら MSX1 下流候補遺伝子の骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化における役割を解析し、歯髄幹細胞における MSX1 の分化制御メカニズムを解明することを目的とする。

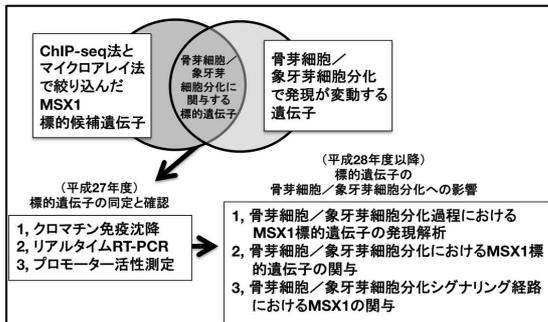
記述した学術的背景をふまえて、本研究では、ChIP-seq と DNA マイクロアレイ法により選出された MSX1 標的候補遺伝子と、表現系としてみられる骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化促進の関係について明らかにする。具体的な目標を以下に示す。

MSX1 標的候補遺伝子の中で骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化に関与する標的遺伝子を同定する。

歯髄幹細胞の骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化促進過程における **MSX1 を介するシグナル伝達経路** を明らかにする。

### 3) 研究の方法

まず、ChIP-seq と DNA マイクロアレイ法により絞り込まれた MSX1 標的候補遺伝子の中から、骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化に關与する遺伝子群を選出する。その後、種々の生化学的手法を用いて、標的遺伝子であることを確認する。これらの MSX1 標的遺伝子が実際に MSX1 の作用を仲介して、骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化を調節しているか解析する。また、MSX1 による骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化誘導に關与するシグナル因子についても解析する(図 4)。



(図 4) 研究計画の概略図

#### 平成 27 年度の計画

骨芽細胞分化 / 象牙芽細胞分化に關与する MSX1 標的遺伝子の絞り込み

以前の研究では、歯髄幹細胞を用いて MSX1 ノックダウンにより発現が影響される遺伝子群を DNA マイクロアレイにより解析し、MSX1 のゲノム上の結合領域を ChIP-Seq により解析することで MSX1 標的遺伝子を絞り込んだ。今回の申請では、骨分化 / 象牙芽細胞分化誘導した歯髄幹細胞の DNA マイクロアレイ解析を行い、以前同定した MSX1 標的遺伝子群の中から骨分化 / 象牙芽細胞分化で発現が変動 (増加または減少) する遺伝子をさらに絞り込む。

MSX1 標的遺伝子の同定と確認

- I. クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイにより、MSX1 標的遺伝子のプロモーター領域への MSX1 の結合の有無を調べる。
- II. MSX1 をノックダウンおよび過剰発現した歯髄幹細胞を用いて、リアルタイム RT-PCR により MSX1 標的遺伝子の発現変化を確認する。
- III. MSX1 標的遺伝子の MSX1 結合領域を含むゲノム領域をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に挿入したレポータープラスミドを作製し、プロモーター活性に対する MSX1 の作用を調べる。

#### 平成 28 年度以降の計画

骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化過程における MSX1 標的遺伝子の発現解析

歯髄幹細胞を骨芽細胞 / 象牙芽細胞に分化誘導し、分化誘導後の各ポイントにおける MSX1 およびその標的遺伝子の mRNA の発現量をリアルタイム RT-PCR で解析する。

また、骨芽細胞マーカー遺伝子 RUNX2, OSTERIX や、象牙芽細胞マーカー遺伝子 DSPP, DMP-1 の発現と比較する。

骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化における MSX1 標的遺伝子の關与

- I. ノックダウンによる骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化に対する影響
- II. 過剰発現による骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化に対する影響
- III. MSX1 ノックダウン細胞に対する MSX1 標的遺伝子を用いたレスキュー実験

骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化シグナリング経路における MSX1 の關与

象牙芽細胞 / 骨芽細胞分化には MAPK カスケード、BMP-Smad シグナリング、Wnt シグナリングが關係することが知られている。シグナル伝達因子の作動薬や阻害薬を用いて、MSX1 および MSX1 標的遺伝子発現に対する影響を調べる。

#### 4) 研究成果

骨芽細胞分化 / 象牙芽細胞分化に關する MSX1 標的遺伝子の絞り込み

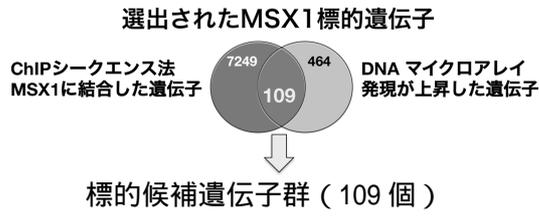
ChIP シークエンス法で検出された 7249 箇所の MSX1 結合部位と DNA マイクロアレイ解析で検出された 464 個の遺伝子を重ね合わせることで、109 個の標的候補遺伝子を絞り込んだ。2 つの解析法で共通したものとして選出された 109 個の遺伝子の中には、象牙質 / 骨分化に關する遺伝子がみられた。それらの遺伝子群に注目して、文献を参考にして、特に重要だと考えられる 5 つの遺伝子を選出した (図 5)。主に骨に關連する遺伝子に關して、MET は象牙質 / 骨分化の抑制 / 促進のどちらにも關与、GREM2 / LBH は象牙質 / 骨分化の抑制に關与、WNT2 / RBPJ は象牙質 / 骨分化の促進に關与することが示唆されている。

MSX1 標的遺伝子の同定と確認

上記 5 つの標的候補遺伝子に対して、ChIP アッセイで MSX1 との結合を確認した。各標的遺伝子の上流にある結合部位に対してプライマーを設計し、PCR を行った。標的遺伝子の MSX1 結合部位を含む DNA 断片が、MSX1 抗体特異的に沈降することを確認した (未発表のため資料未記載)。

また、象牙芽細胞 / 骨芽細胞分化關連遺伝子であるアルカリリンフォスファターゼ、オステオカルシン、RUNX2、BMP2 の mRNA 発現

が MSX1 ノックダウンにより顕著に低下した (未発表のため資料未記載)。予定していたプロモーター活性についてはまだ実験が行われていない。

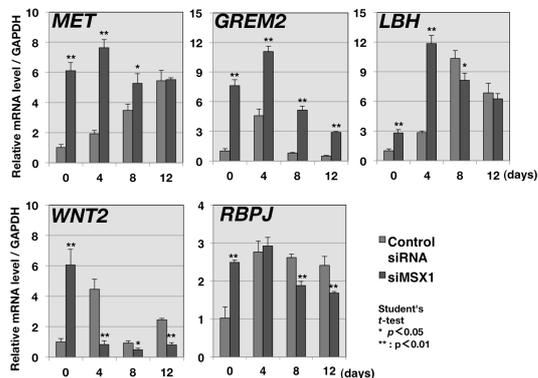


文献を参考にして選出された標的遺伝子のリスト		
gene symbol	結合領域	骨に関連する役割
<i>MET</i>	promoter	HGFレセプター、骨形成の抑制/促進に関与
<i>GREM2</i>	5'UTR	BMPアンタゴニスト、骨形成抑制
<i>LBH</i>	promoter	転写補助因子、軟骨形成抑制
<i>WNT2</i>	promoter	骨形成促進
<i>RBPJ</i>	promoter	ノッチシグナリングに関与する転写因子、骨形成促進

(図5) ChIPシーケンスとDNAマイクロアレイの結果より絞り込まれた標的候補遺伝子群の中で、文献を参考にして選出された遺伝子のリスト

骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化過程における MSX1 標的遺伝子の発現解析  
 同定した5つのMSX1の標的遺伝子について、象牙質 / 骨分化誘導後の発現レベルの変動を、定量的 RT-PCR 法により解析した。誘導開始 0 日には、MSX1 をノックダウンした DPSCs にて標的遺伝子群の mRNA レベルは上昇していた。しかし、象牙芽細胞 / 骨分化誘導条件下では、同じく *MET*、*GREM2*、*LBH* の mRNA レベルは MSX1 のノックダウンにより上昇したのに対し、*WNT2* と *RBPJ* の発現は低下した(図6)。

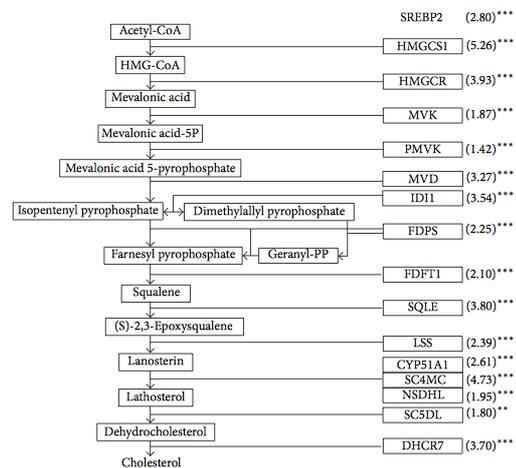
骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化における MSX1 標的遺伝子の関与  
 予定されていた実験は、まだ予備実験の段階である。それぞれの遺伝子をノックダウンさせた後に、骨分化誘導をかけることで細胞が弱るので多彩な条件検討が必要になってくる。後任者により今後施行する予定である。



(図6) MSX1 標的遺伝子発現の象牙質 / 骨分化誘導時における変動

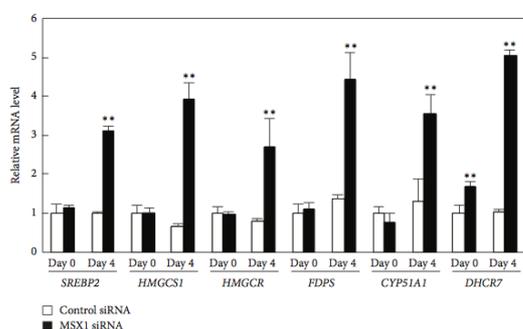
骨芽細胞 / 象牙芽細胞分化シグナリ

ング経路における MSX1 の関与  
 前述したように MSX1 標的遺伝子は、骨分化 / 象牙芽細胞分化していない状態から ChIP シークエンスと MSX1 をノックダウンした DNA マイクロアレイの結果より遺伝子を絞り込んで選出した。MSX1 標的遺伝子発現の象牙質 / 骨分化誘導時における変動を確認したが、逆に象牙芽細胞 / 骨芽細胞分化したときの遺伝子変動をみるために、象牙芽細胞分化 / 骨細胞分化誘導 4 日にマイクロアレイにて解析を行った。骨分化誘導条件下において、MSX1 ノックダウンは接着斑形成、軟骨内骨化、マトリックスメタロプロテアーゼ等に関連する多くの遺伝子発現を低下させ、一方、コレステロール合成に関連する多くの遺伝子の発現を増加させた(図7)。



(図7) SREBP2 の関与するコレステロール合成経路に MSX1 ノックダウンが与える影響  
 右側部分が MSX1 ノックダウンにより増加させた遺伝子  
 (括弧の中はノックダウンで増加させた倍数, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )

これらのコレステロール合成関連遺伝子の内、HMGCS1、HMGCR、FDPS、CYP51A1、DHCR7の発現がMSX1ノックダウンで増加することが定量PCRにより確認された(図8)。また、コレステロール合成において中心的役割を担う転写因子 SREBP2 の発現も MSX1 ノックダウンにより増加した。以前よりコレステロール合成系の阻害が象牙芽細胞 / 骨芽細胞の分化を促進することが知られていたが、骨関連転写因子との関連は不明であった。今回の結果は、MSX1 がコレステロール合成系全体を転写レベルで抑制することを示した。そして、MSX1 による象牙芽細胞 / 骨芽細胞分化誘導の制御には、コレステロール代謝が関わっていることが示唆された。



(図 8)

MSX1 ノックダウンが与える影響  
コレステロール合成関連遺伝子の mRNA レベルの変化

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

## 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 3 件)

1) Goto N, Fujimoto K, Fujii S, Ida-Yonemochi H, Ohshima H, Kawamoto T, Noshiro M, Shukunami C, Kozai K, Kato Y.

Role of MSX1 in osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells

Stem cells international

査読有り

1-13, 2016

DOI: 10.1155/2016/8035759

2) Sasamoto T, Fujimoto K, Kanawa M, Kimura J, Takeuchi J, Harada N, Goto N, Kawamoto T, Noshiro M, Ketut suardita, Tanne K, and Kato Y.

DEC2 is a negative regulator for the proliferation and differentiation of chondrocyte

lineage-committed mesenchymal stem cells

International Journal of Molecular Medicine

査読有り

38, 876-884, 2016

DOI: 10.3892/ijmm.2016.2660

3) Fujii S, Fujimoto K, Goto N, Kanawa M, Kawamoto T, Pan H, Srivatanakul, P, Rakdang W, Pornprasitwech J, Saskianti T, Suardita K, Nishimura F, and Kato Y

Characteristic expression of MSX1, MSX2, TBX2, and ENTPD1 in dental pulp cells

Biomedical Reports

査読有り

3, 566-572, 2015

DOI: 10.3892/br.2015.456

[学会発表](計 2 件)

1) 歯髄幹細胞においてホメオボックス型転写因子 MSX1 はコレステロール合成関連

遺伝子の発現を制御する。：五藤紀子、

藤本勝巳、藤井紗貴子、依田浩子、大島

勇人、河本健、能城光秀、宿南知佐、香

西克之、加藤幸夫：第 38 回日本分子生物

学会年会第 88 回日本生化学会合同大会

(2015. 12. 2 神戸/神戸ポートアイラン

ド)

2) ホメオボックス型転写因子 MSX1 による歯髄幹細胞分化制御：藤本勝巳、五藤紀子、河本健、能城光秀、宿南知佐、香西克之、加藤幸夫：第 99 回広島大学歯学会 併催 第 54 回広島県歯科医学会 (2015. 11. 8 広島/広島県歯科医師会館)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

五藤 紀子 (GOTO NORIKO)

広島大学病院 小児歯科 歯科診療医

研究者番号：10135137