

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18592211

研究課題名 (和文) 多能性歯髄幹細胞の可塑性を利用した再生に関する基礎的研究

研究課題名 (英文) Studies on the regenerative medicine utilizing the plasticity of dental pulp stem cells

研究代表者

野崎 中成 (NOZAKI TADASHIGE)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90281683

研究成果の概要：分化ポテンシャルの高い幹細胞を利用して、自己の生体組織を再生修復する新しい治療法が試みられている。これら幹細胞を用いた再生医療は移植に代わる治療法として社会的なニーズがある。本研究課題では、幹細胞のソースとして歯髄に存在する幹細胞に着目し、幹細胞の多分化能を分子レベルで解析した。歯髄に存在する幹細胞の有用性を明らかにし、その可塑性を利用した再生医療のための基礎となる研究を展開した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,800,000	0	1,800,000
19年度	1,000,000	300,000	1,300,000
20年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	510,000	4,010,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：歯髄・幹細胞・細胞分化・分化誘導・再生医学

1. 研究開始当初の背景

体細胞には分化能の高い幹細胞の存在が報告され、その増殖や分化に関する研究が行われている。ヒト歯髄にも分化能の高い間葉系幹細胞が存在する可能性が報告されている (Gronthos, S., 2000)。脱落した乳歯歯髄に幹細胞が存在していて、マウス皮下という *ex vivo* の条件下で一部の体細胞へ分化するとされている。しかし、歯髄幹細胞の特性について不明な点が多く、分化した細胞が歯髄幹細胞由来であるかどうかを証明する解析はなされていない。研究代表者らは歯髄幹細胞の特性について継続的に研究を行ってきた。ラット歯髄にヒト間葉系幹細胞のマーカである

STRO-1 が発現していることやマウス胚性幹細胞の未分化幹細胞マーカである Nanog, SSEA-1, Oct-3/4 が発現していることを報告した (Nozaki, T., 2005)。また、骨髄幹細胞をさまざまな体細胞へ分化誘導する系を改変し、歯髄幹細胞の分化へ応用する研究を行ってきた。そして、歯髄細胞から骨芽細胞系譜へ分化誘導できることを報告した (Takeyasu, M., Nozaki, T., 2004)。これらの研究成果を踏まえて、歯髄幹細胞から骨芽細胞系譜だけでなく、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞、神経細胞系譜への分化誘導を試み、分子生物学的手法を駆使して歯髄幹細胞の多能性を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

分化ポテンシャルの高い幹細胞を利用して、自己の生体組織を再生修復する新しい治療法が試みられている。これら幹細胞を用いた再生医療は移植に代わる治療法として社会的なニーズがある。本研究課題では、幹細胞のソースとして歯髄に存在する幹細胞に着目し、幹細胞の多分化能を分子レベルで解析する。歯髄に存在する幹細胞の有用性を明らかにし、その可塑性を利用した再生医療のための基礎となる研究を展開する。

3. 研究の方法

(1) 歯髄幹細胞の特性に関する解析

歯髄幹細胞の初代培養系を構築する。

リアルタイムPCR (ABI StepOne™ Real Time PCR System) による幹細胞マーカーのmRNA発現を定量的に解析する。未分化幹細胞マーカーとしてNanog, Oct-3/4 (Pou5F1), Sox2の発現を調べる。プライマーはPerfect Real Timeサポートシステム (タカラバイオ) で設計、合成する。

(2) 歯髄幹細胞の多分化能に関する解析

骨髄幹細胞の *in vitro* 分化誘導系を改変して歯髄幹細胞に適用し、分化誘導系を構築する。分化程度の評価法を構築し、分化誘導を試みる。

分化誘導剤としてN-2 Plus Media Supplement, EGF, FGFを添加し、神経細胞系譜への分化誘導を行う。分化誘導過程で経時的に総RNAを調製し、Nestin (Nes)、glial fibrillary acid protein (Gfap)、tubulin-III (Tubb3)、microtubule-associated protein 2 (Map2) についてリアルタイムPCRによるmRNA発現を定量的に解析する。ウエスタン法を用いてNestinタンパク質の発現量を解析する。

分化誘導剤として、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、Insulin、Dexamethasoneを添加し、脂肪細胞系譜への分化誘導を行う。Oil Red Oを用いて脂肪滴を検出する。分化誘導過程で経時的に総RNAを調製し、GeneChip™ (Affymetrix社) 解析による約30,000遺伝子の網羅的発現解析を行う。発現変動する遺伝子のpathway解析を行う。発現に差異のあった遺伝子についてリアルタイムPCRを用いてmRNA発現を定量的に解析する。

4. 研究成果

(1) 5週齢雄性 Wistar 系ラット下顎切歯から麻酔下で無痛的に歯髄組織を摘出し、初代培養系を構築した。すなわち、歯髄組織はリーマー-25mm、#10 で摘出し、タイプ コラゲナーゼと dispase を含んだ PBS(-) で 50 分、

37 で処理した。分散した細胞は Lab-Tek チャンバースライドに播種した。初代細胞スターティング培地 (MF-start, TOYOBO) で培養を開始し、37、5%CO₂ で 24 時間維持した。リアルタイム PCR による解析から Nanog, Oct-3/4, Sox2 の Ct 値は、37.4、37.9、25.9 であった。コピー数が分かっているプラスミドによる希釈系列から、これら未分化幹細胞マーカーは 10 コピー以上発現していることがわかった。

(2)

神経幹細胞マーカーである Nes の発現は、分化誘導前 (0W) と比べて分化誘導 2 週後 (2W) で 68.1% に減少した。グリア細胞分化マーカーである Gfap の発現は、0W と比べて 2W で 127.5% に増加した。幼若神経細胞分化マーカーである Tubb3 の発現変動は認められなかった。成熟神経細胞分化マーカーである Map2 の発現は、0W と比べて 2W で 61.8% に減少した (図 1)。

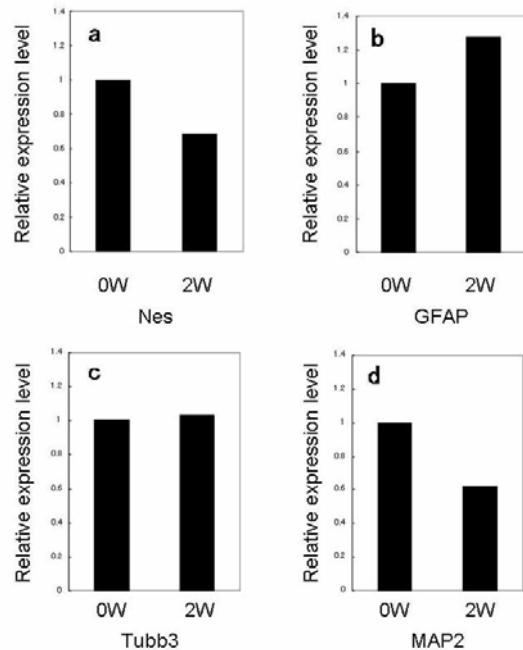


図 1 神経分化マーカーの発現変動

Nestin タンパク質の発現は、分化誘導前 (0W) と比べて分化誘導 2 週後 (2W) で 12.4% に減少した (図 2)。

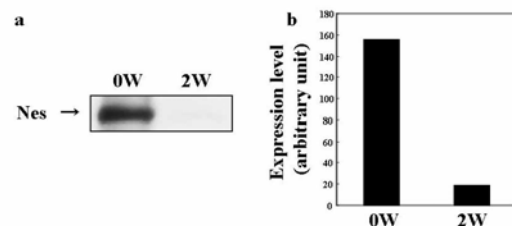


図 2 Nestin の発現変動

ラット歯髄の初代培養細胞に神経幹細胞マーカーである Nes の発現が認められ、神経幹細胞の存在が示唆された。分化誘導に伴い、Nes の発現が減少し、Gfap の発現が増加したことから、この分化誘導系においてグリア細胞系譜への分化が示唆された。

(3) 脂肪細胞系譜へ分化誘導過程で Oil Red O を用いて脂肪滴を検出し、脂肪細胞分化の指標とした(図 3)。左は分化誘導前(a: 0W)と分化誘導後 1、2、3 週(b-d: 1, 2, 3 W)における Oil Red O 染色を示す。矢印は細胞質にある Oil Red O に濃染する脂肪滴を示す。スケールバーは 100 μm を示す。右は脂肪滴の定量的変化を示す。値は 4 個の測定値の平均値 ± 標準誤差を示す。*は分化誘導前と比較して統計的有意差を示す(* $p < 0.05$)。

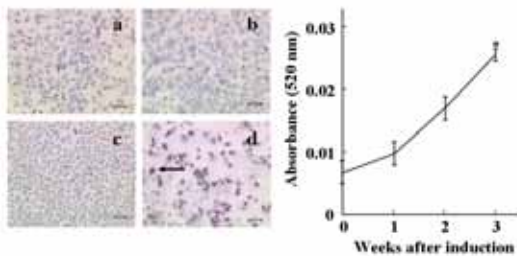


図 3 分化誘導による脂肪滴の経時的観察

脂肪細胞系譜へ分化誘導過程で経時的に総 RNA を調製し、GeneChip™(Affymetrix 社) 解析による約 31,042 遺伝子の網羅的発現解析を行った。遺伝子発現プロファイニングより、有意に($p < 0.01$)2 倍以上変動している遺伝子 3418 個を得た。分化誘導前(0W)に対し、分化誘導後 1、2、3W で Up-regulation している割合は各々 10.6、6.6、9.7%であり、Down-regulation している割合は各々 11.0、6.9、11.6%であった(図 4)。0W (X 軸) に対する、分化誘導後 1、2、3W (Y 軸) の値を各々プロットした。青線は 2 倍の変動を示す。

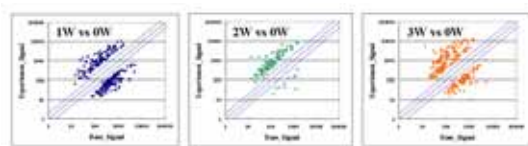


図 4 Scatter plot

有意に変動している遺伝子 3418 個の変動パターンからヒートマップ図を作成した(図 5)。左から分化誘導前(0W)、分化誘導後 1、2、3W を示す。

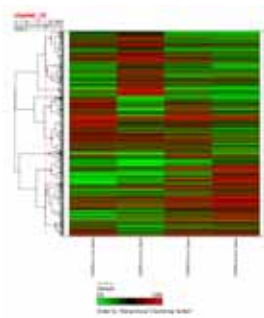


図 5 ヒートマップ

ヒートマップ図から 10 個のクラスターに分類した。各クラスターの変動パターンを図 6 に示す。

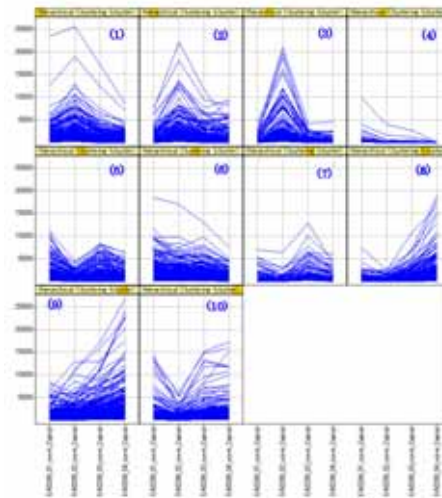


図 6 クラスター分類

各クラスターについて pathway 解析を行った。クラスター(3)には 156 個が含まれ、PPAR gamma pathway 上に存在する遺伝子の発現変動が特徴的に観察された(図 7)。

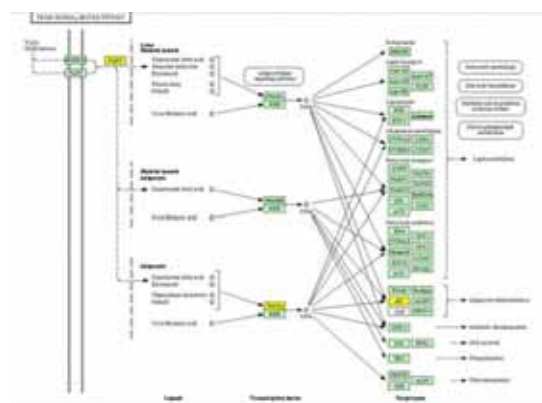


図 7 PPAR gamma pathway

リアルタイム PCR 解析で PPAR gamma pathway 上に存在する Ppar gamma、C/EBP family、および Fabp4(aP2)は 1W で発現が上昇していた(表 1)。

Gene	1W/0W	2W/0W	3W/0W
Ppar gamma	13.1	2.0	1.0
C/EBP alpha	2.9	1.2	1.6
C/EBP beta	2.8	1.4	0.9
C/EBP delta	7.5	0.9	0.9
Fabp4	23.3	5.4	2.2

表 1 脂肪分化マーカーの発現変動

RT-PCR による電気泳動においても同様の発現パターンを確認した(図8)。

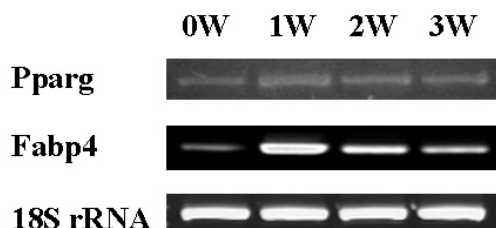


図8 RT-PCRによる発現変動

歯髄細胞は *in vitro* 分化誘導系で神経細胞系譜および脂肪細胞系譜へ分化できることを明らかにした。脂肪細胞系譜への分化には PPAR gammaシグナル伝達経路の関与が示唆された。研究代表者がこれまで報告していた歯髄細胞の骨細胞系譜への分化と合わせて、歯髄細胞の多分化能を有することを示した。また、歯髄細胞で未分化幹細胞マーカーである Nanog および OCT-3/4 の発現を明らかにした。

今後の展望を踏まえ、ラット歯髄の初代培養細胞を用いて内胚葉組織への分化転換のための予備的実験を行った。アルカロイド Cyclopamine、2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY-294002) および Wortmannin を各々添加し、転写因子 Pdx1 の発現の誘導を試みたが、添加後1週間まで Pdx1 の発現誘導は認められなかった。次に真核細胞で Pdx1 を発現するベクターを構築した。Pdx1 の coding region (852bp) の N 末端に真核生物の Kozac 配列を挿入した DNA を合成した。歯髄細胞への遺伝子導入ベクターには、IRES 配列を含み、クローン化された目的遺伝子と ZsGreen1 の翻訳領域の双方が一分子の mRNA から翻訳され、緑色蛍光を発する細胞の 100% が目的遺伝子を発現できる系を用いた。分化能を評価するために分化誘導過程で経時的に総 RNA を調製し、リアルタイム PCR を用いて内分泌系細胞への分化制御に関わる遺伝子の発現を調べた。導入3日後に Pdx1 の顕著な発現を認め、導入8日後にその発現は 9.2% に低下した。抗 Pdx1 抗体による免疫蛍光染色において、G418 選択下で導入3日後に緑色蛍光を発

する細胞が観察された。導入3、8日後において内分泌前駆細胞マーカーである Ngn3 の発現誘導は認められなかった。また、膵島を構成する細胞マーカーである glucagon、insulin、pancreatic polypeptide の発現誘導は観察されなかった。一方、somatostatin の発現は、導入3日後に約7倍の発現誘導が認められた。この実験系で内分泌細胞系譜へ分化できる可能性が示唆された。内分泌細胞系譜への分化には、Pdx1 に加えて転写因子 Ptf1a、Ngn3 の発現を制御する必要があり、今後の課題とした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Takeyasu, M., Nozaki, T., Daito, M., Differentiation of dental pulp stem cells into a neural lineage. Pediatric Dental Journal, 16(2), 154-162, 2006, 査読有。

野崎中成、多能性幹細胞による歯の再生、生物工学会誌, 86(5), 240, 2008, 査読無。

Nagata, S., Nozaki, T., Ohura, K., Daito, M., Analysis of gene expression during differentiation induction of normal human periodontal ligament cells into an osteoblast lineage. Journal of Oral Tissue Engineering, 6(2), 88-96, 2008, 査読有。

[学会発表](計2件)

野崎中成、歯髄細胞の脂肪細胞系譜への分化における遺伝子発現変動の網羅的解析, BMB2007 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会大会合同大会, 2007年12月11日, 横浜市。

Nozaki, T., Ohura, K., Gene expression profile in the adipogenesis induction of dental pulp cells. The American Society for Cell Biology, 48th Annual Meeting, 2008年12月17日, San Francisco, U.S.A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野崎 中成 (NOZAKI TADASHIGE)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 90281683

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし