

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10189

研究課題名(和文) ヒト歯髄幹細胞の骨芽細胞分化におけるヘッジホッグ関連遺伝子制御システムの解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of hedgehog in osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells

研究代表者

近津 大地(Chikazu, Daichi)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：30343122

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)：ヒト歯髄幹細胞(DPSCs)はいくつかの研究で骨形成分化能に個体差があることが指摘されてきたが、それらを決定する要因は不明であった。そこで我々はDPSCsの個体差に関連する遺伝子を特定するべく、ヘッジホッグ関連遺伝子と骨形成分化能の高低により分別した2群(HG, LG)において、RNA-seqを用いて遺伝子発現パターンを比較した。VCAM1, GFPT2という2つの候補遺伝子を選択し、2つの遺伝子がRas-MEK-Erk経路、PI3K/Akt経路やHBP経路など骨分化を促進するシグナル伝達に関与し、2つの遺伝子を高発現するDPSCsは高い骨形成分化能を有している可能性を秘めていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト歯髄幹細胞(DPSCs)は高い増殖能と高い多分化能を有する優れた細胞資源である。DPSCsの個体差の原因を解明することは、DPSCsを用いた再生細胞治療の適応範囲を広げることにつながる。本研究では、DPSCsの骨形成分化能の高低を比較し、VCAM1とGFPT2がDPSCsの骨形成分化能を予測するための候補遺伝子であることを示した。未分化状態のDPSCsにおけるVCAM1とGFPT2の発現量を事前に調べることは、骨再生のための同種細胞移植のドナーの選択基準の設定に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DPSCs have high proliferative and multilineage differentiation potential. However, several studies have indicated that there are individual differences in the potential for osteogenic differentiation, and the factors determining these differences are unknown. The purpose of this study was to designate the genes responsible for the individual differences in DPSCs. We focused on hedgehog associate genes and divided DPSCs into high and low osteogenic differentiation ability groups (HG or LG), and compared the gene expression patterns using RNA-seq. Among these patterns, VCAM1 and GFPT2 were significantly expressed in the HG than in the LG. These results indicated that VCAM1-mediated Ras-MEK-Erk and PI3K/Akt pathways and GFPT2-mediated HBP signaling influences osteogenic differentiation of DPSCs. These findings indicate that DPSCs that highly express VCAM1 and GFPT2 have a high capacity for osteogenic differentiation.

研究分野：口腔外科学分野

キーワード：ヒト歯髄幹細胞 骨芽細胞 ヘッジホッグ関連遺伝子 DPSCs VCAM1 GFPT2

## 1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域における骨喪失性疾患として、慢性歯周炎による歯槽骨欠損、唇顎口蓋裂等の先天疾患、腫瘍による顎骨欠損、外傷などが挙げられ、患者の審美的障害や精神的苦痛は計り知れない従来、骨欠損部位に対する自家骨や人工材料を用いた治療法が選択されてきたが、採骨部の外科的侵襲や治療成績など多くの課題が残されている。これらの顎骨欠損に対して、幹細胞を用いた再生医療の研究が盛んに行われており、研究代表者らは不要となった抜去歯から採取可能なヒト歯髄幹細胞による骨再生法の確立に向けて、生理活性物質を用いたヒト歯髄幹細胞の高効率な分化誘導に関する研究を行い、その成果を報告した(*Stem Cell Res Ther.* 2018)。その中で、研究代表者らが検討を行ってきた生理活性物質の1つであるヘッジホッグシグナルのアゴニストの Smoothened agonist(SAG)は、マウス間葉系幹細胞、ヒト骨髄幹細胞、ヒト iPS 細胞の骨分化誘導を促進するにも関わらず、ヒト歯髄幹細胞では骨分化マーカーの発現やアルカリフォスファターゼ活性が抑制されるという非常に興味深い結果が得られた。ヘッジホッグは、個体の発生、体性の極性、パターンニング、細胞の増殖・分化など様々な生理活性機能を担っていることがこれまでに明らかにされている。またヘッジホッグは歯堤形成期や帽状期での活性化の報告、ヘッジホッグの異常による歯の形態異常やエナメル・象牙質形成の異常が報告されている。しかし、ヘッジホッグシグナルに対する歯髄幹細胞特有の反応機序は不明であり、歯根完成後の歯髄内でのヘッジホッグの役割も未だ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト歯髄幹細胞を用いた骨再生医療の実現化に向けて骨組織や歯髄、象牙質発生の基礎的知見を解析し、その組織形成過程の分子メカニズムを分化・組織誘導刺激に応用することで新規骨再生法開発の礎を築くことを目的とする。そのためにわれわれは、組織発生ならびに骨再生療法で重要な鍵を握る分子と期待されているヘッジホッグと、その転写メディエーターである Gli ファミリーに着目した。また、ヒト歯髄幹細胞の骨芽細胞分化能に個体差があることに着目し、バイオインフォマティクスを駆使した網羅的な解析を行い、その遺伝子発現制御システムとエピゲノムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト歯髄幹細胞の単離・培養並びに骨芽細胞分化能の比較

ヒト歯髄幹細胞(16 - 29 歳の抜去歯より採取:東京医科大学倫理審査承認 No.3468)の骨分化誘導後3週時点における骨芽細胞分化能を比較:ヒト歯髄幹細胞の骨芽細胞分化能をアルカリフォスファターゼ(ALP)染色、von Kossa 染色を用いて比較検討し、骨芽細胞分化能の高い群(HG群)と低い群(LG群)の2群に分けた。染色の定量化には ImageJ を用いた。また、real-time PCR 法を用いて2群間の骨芽細胞マーカーの発現を評価した。

### (2) ヒト歯髄幹細胞の遺伝子発現パターンの網羅的な解析

ヒト歯髄幹細胞、ヒト骨髄幹細胞を SAG およびヘッジホッグシグナルアンタゴニストである Cyclopamine 添加培地で培養を行った後 RNA サンプルを回収し、RNA-Seq による遺伝子発現パターンを解析し、候補遺伝子の発現を real-time PCR で追認した。

また、同様にヒト歯髄幹細胞の骨芽細胞分化能の高い群(HG)、低い群(LG)をそれぞれ成長培地で培養し、RNA サンプルを回収し、RNA-Seq を用いて遺伝子発現パターンを網羅的に解析した。解析結果を既知のデータベースより組織発生・文化、多能性維持、細胞増殖等に関与している候補遺伝子を絞り込み、候補遺伝子の発現を real-time PCR で追認した。

### (3) 候補遺伝子の発現抑制による細胞内における機能解析

候補遺伝子の siRNA (small interfering RNA) を用いてトランスフェクションを行い、細胞内発現抑制実験を実施した。トランスフェクションから48時間後に RNA サンプルを回収し、ヒト歯髄幹細胞の骨芽細胞分化への影響を real-time PCR 法を用いて骨芽細胞マーカーの発現を評価した。

### (4) 候補遺伝子の細胞内シグナル伝達経路の解析

候補遺伝子と骨芽細胞分化におけるシグナル伝達の関与を調べるために、候補遺伝子の siRNA を用いて骨芽細胞分化時の細胞内シグナル伝達下流にあたるタンパク分子の発現をウエスタンブロット法により解析した。

#### 4. 研究成果

(1) アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色は骨芽細胞分化誘導後 2 週、von Kossa 染色は骨芽細胞分化誘導後 3 週でそれぞれ ImageJ を用いて定量化し、骨芽細胞分化能の高い群 (HG) と低い群 (LG) の 2 群に分けた。Student's t-tests を用いて検定をしたところ、HG と LG の間に統計学的に有意な差を認めた (図 1)。さらに、骨芽細胞分化誘導 3 週の時点で、ALP、Runx2、Sp7、COL1A1、BGLAP などの骨芽細胞マーカーの発現を real-time PCR を用いて比較したところ、ALP に統計学的に有意差を認めたが、他のマーカーにおいては有意な差は認めなかった (図 1)。

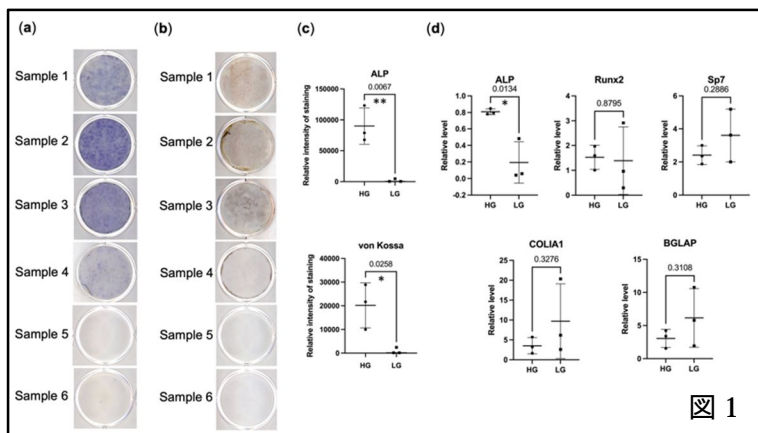


図 1

(2) SAG およびヘッジホッグシグナルアンタゴニストである Cyclopamine 添加培地で培養を行った後 RNA サンプルを回収し、RNA-Seq による遺伝子発現パターンを解析したが、候補遺伝子の発現とヘッジホッグ並びに Gli ファミリーとの統計学的に有意差を認めなかったため (未発表データ)。

骨芽細胞分化能の高い群 (HG) および低い群 (LG) 2

群間の遺伝子発現を RNA-seq を用いて比較したところ、179907 の遺伝子パターンが検出され、8397 の候補遺伝子が検出された。特に有意差が明らかだった 2 つの遺伝子 (VCAM1, GFPT2) を選択した。2 つの候補遺伝子の発現を real-time PCR で確認したところ、VCAM1、GFPT2 の発現は HG で統計的に有意に高値を認めた (図 2)。

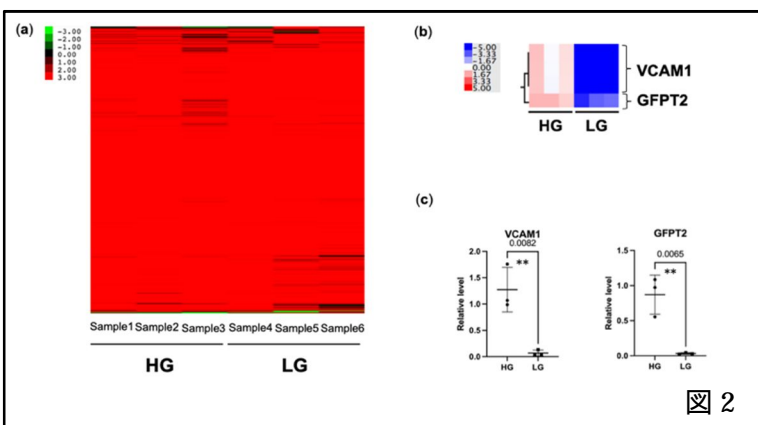


図 2

(3) siRNA を用いて VCAM1 と GFPT2 の発現抑制実験を実施した。real-time PCR 法を用いてトランスフェクション効率を確認し、骨芽細胞マーカーの発現を比較した。VCAM1 のノックダウンにより、骨芽細胞マーカーである ALP、Runx2、Sp7 が有意に阻害された。また、GFPT2 のノックダウンにより、ALP、Runx2 は有意に減少したが、Sp7 に関しては統計的に有意な差は認めなかった (図 3)。

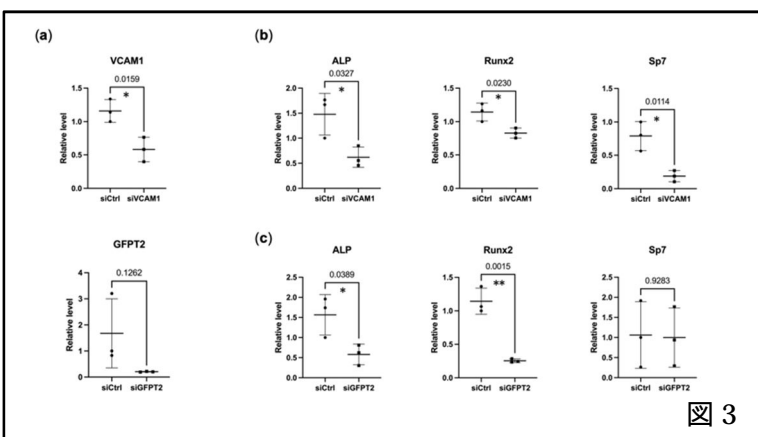


図 3

(4) VCAM1 および GFPT2 の発現が、DPSC における骨芽細胞分化経路に影響を与えるかどうかを検討した。ウェスタンブロット解析の結果、siVCAM1 を導入した細胞における  $\beta$ -カテニンは、siCtrl と比較して、有意に減少していることが示唆された (図 4a)。さらに、siVCAM1 を導入した細胞では、phospho-MAPK (Erk1/2) の発現が有意に低下していた。しかし、MAPK (Erk1/2) レベルは、グループ間で有意な差はなかった (図 4b)。Ras-MEK-Erk 経路は、細胞表面の受容体から DNA 核に信号を伝達し、細胞周期を行うタンパク質の連鎖経路であり、PI3K/AKT/GSK3 /  $\beta$ -catenin シグナル伝達経路は、細胞の増殖と分化に影響を与えることが知られている。これらの結果により、VCAM1 が PI3/Akt および Ras-MEK-Erk 経路を介して DPSC の骨芽細胞分化を制御していることが示唆された。

次に、GFPT2 ノックダウンが in vitro での DPSC の骨形成分化経路に影響を与えるかどうかを検

討した。ヘキソサミン合成経路(HBP)で働く O-GlcNAc 転移酵素である OGT は、siGFPT2 をトランスフェクトした細胞で有意に抑制されていた(図 4c)。これらの結果から、DPSC の骨芽細胞分化において、GFPT2 のダウンレギュレーションが HBP を阻害していることが示唆された。

DPSC の個体差の原因を解明することは、DPSC を用いた再生細胞治療の適応範囲を広げることにつながる。本研究では、DPSC の骨形成分化能の高低を比較し、VCAM1 と GFPT2 が DPSC の骨形成分化能を予測するための候補遺伝子であることが示された。未分化状態の DPSC における VCAM1 と GFPT2 の発現量を事前に調べることは、骨再生のための同種細胞移植のドナーの選択基準の設定に有用であると考えられる。

以上の概要を国際学会誌 (Bone, under review) に報告し、現在査読中である。

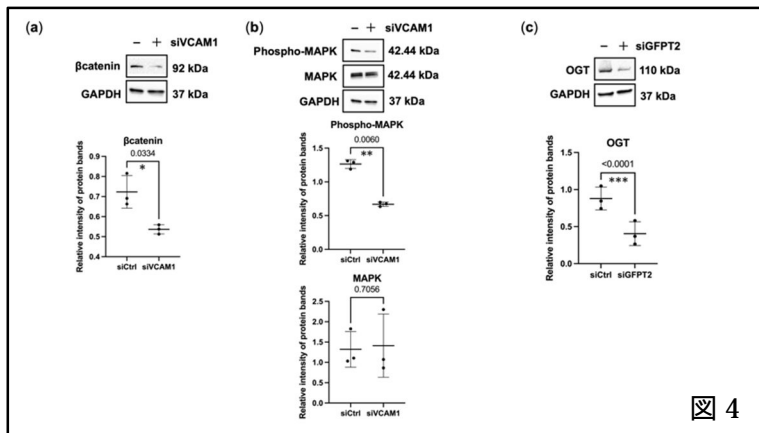


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 M. Sato, Y. Kawase-Koga, D. Yamakawa, Y. Fujii, D. Chikazu	4. 巻 21
2. 論文標題 Bone Regeneration Potential of Human Dental Pulp Stem Cells Derived from Elderly Patients and Osteo-Induced by a Helioxanthin Derivative	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7731,7745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21207731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 D. Yamakawa, Y. Kawase-Koga, Y. Fujii, Y. Kanno, M. Sato, S. Ohba, Y. Kitaura, M. Kashiwagi, D. Chikazu	4. 巻 21
2. 論文標題 Effects of Helioxanthin Derivative-Treated Human Dental Pulp Stem Cells on Fracture Healing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9158,9171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21239158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 D. Yamakawa, Y. Kawase-Koga, Y. Fujii, Y. Kanno, M. Sato, D. Chikazu
2. 発表標題 Human dental pulp stem cells with small-molecular compound promote highly osteogenesis in vitro
3. 学会等名 The 2019 New York Stem Cell Foundation Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Kanno, D Yamakawa, Y Fujii, Y. Kawase-Koga, D. Chikazu
2. 発表標題 Chondrogenic differrenntation by human dental pulp stem cells using a thienoindazole derivative and cell-sheet technology
3. 学会等名 The 2019 New York Stem Cell Foundation Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	古賀 陽子  (Koga Yoko)  (10392408)	東京医科大学・医学部・兼任教授    (32645)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------