

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10210

研究課題名(和文) 幹細胞マーカーであるアルカリホスファターゼのヒト乳歯歯髄細胞における機能的解析

研究課題名(英文) Functional analysis of alkaline phosphatase, a stem cell marker, using human deciduous dental pulp cells derived from the patient with Hypophosphatasia (HPP)

研究代表者

窪田 直子 (Kubota, Naoko)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：40569810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：低ホスファターゼ症(HPP)患者由来の乳歯歯髄細胞(HDDPC)の特性を解析した結果、アルカリホスファターゼ(ALP)陽性細胞は認められず、山中4因子遺伝子導入によるiPS細胞樹立にも失敗した。本細胞にALP(TNSALP)cDNA発現ユニットを搭載したpiggyBac(PB)系トランスポゾンベクターpT-TNSALP + pT-neo(neo発現ベクター) + pTrans(transposase発現ベクター)を遺伝子導入後、ALP細胞化学染色を実施した結果、ALP陽性細胞が出現した。しかしながら、細胞の維持・増殖の段階でALP活性を失うことも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

目的遺伝子(ALP)欠損細胞への正常な遺伝子の導入による機能回復実験から目的遺伝子の役割を証明する試みは、歯学系分野では類例がない。本研究ではHPP患者由来、健康小児由来のHDDPCを用い、多分化能性やiPS細胞形成能の違いを比較することでALPの存在意義を確認した。さらに、HPP患者細胞に正常なALP遺伝子を導入することで、一時的だがALP陽性細胞の出現を確認した。今後、当該細胞の濃縮が成功すれば、細胞の機能解析(多分化能性やiPS細胞誘導能など)を正確に行うことが出来、更には、人為的操作による細胞分化方向制御が可能となるため、再生医療の基礎的研究への波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Characterization of deciduous dental pulp cells (HDDPC) derived from the patient with hypophosphatasia (HPP), which is named "HPP-HDDPC", exhibited no alkaline phosphatase (ALP)-positive cells and failure in obtaining iPS cells after transfection with reprogramming factors (Yamanaka factors). Two days after transfection of HPP-HDDPC with piggyBac (PB)-based transposon vector pT-TNSALP (carrying the ALP (TNSALP) cDNA expression unit), pT-neo (PB-based vector carrying neo expression unit) and pTrans (carrying transposase expression unit), some cells exhibited staining for ALP activity. Continuous cultivation of those cells under G418 selection resulted in successful establishment of ALP-positive cells, which was designated ALP(+)-HPP-HDDPC. Unfortunately, reduced ALP activity during propagation of ALP(+)-HPP-HDDPC was prominent, which often disturbed further analysis of ALP(+)-HPP-HDDPC.

研究分野：小児歯科

キーワード：遺伝子工学的的手法 アルカリホスファターゼ ヒト乳歯歯髄細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルカリホスファターゼ (ALP) は脱リン酸化作用を有する酵素であり、ほとんどすべての生物で一般的に発現されている。ALP 高発現は、胚性幹細胞、体性幹細胞の表現型と強く相関し、その活性は細胞分化に伴い消失することから、当該細胞を規定する重要なマーカーの 1 つと考えられている。申請者らは過去の研究から、ALP 活性が高いヒト乳歯歯髄細胞 (HDDPC) は細胞増殖性も高く、山中 4 因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC) 導入による iPS 細胞樹立が可能であること、さらに、幹細胞特異的遺伝子 OCT3/4、SOX2、NANOG の発現も高いことを見出した。特に、OCT3/4 発現は ALP 活性が強い細胞にのみ認められたことから、ALP 高活性/OCT3/4 陽性細胞は、山中 4 因子によりリプログラミングされやすいのではないかと考えた。そのメカニズムを考えた場合、OCT3/4 遺伝子の繊維芽細胞等の分化細胞への遺伝子導入は、Wnt 発現を上昇させ、リプログラミング初期に Wnt シグナルを活性化させると見られるが、ALP 活性が Wnt シグナル経路にどのように関与するのか、あるいは、未知の経路で分化細胞のリプログラミングに関与しているか、などは未だ十分に解明されていない。

2. 研究の目的

低ホスファターゼ症 (HPP) は、歯の早期脱落、骨形成異常、てんかん様発作、筋力低下、呼吸障害などの症状を示す先天性疾患であり、ALP 遺伝子の変異により ALP 活性が低下することがその発症の原因と考えられている。HPP 患者由来の骨髄間葉系幹細胞 (BMSC) は、骨細胞への分化能の低下、脂肪細胞への分化能増大という、未分化細胞の分化多能性に関する経路に何らかの欠陥を示す。組織非特異型 ALP 遺伝子 (TNSALP) は Wnt シグナル経路で low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) と相互作用し、GSK-3 β のリン酸化を制御し、結果として、BMSC の多分化能を切り替える signal regulator としての役割を担うという報告が最近出された。

以上の学術的背景から、「HDDPC の多分化能性維持には ALP が重要な役割を果たす」と考えた。本研究では、この仮説を検証すべく、

(1) 先天的に ALP 活性が低下した HPP 患者由来の HDDPC (以下、HPP-HDDPC) と健康小児由来の HDDPC (以下、N-HDDPC) における多分化能性を比較検討することで、ALP の存在意義を確認すること

(2) HPP-HDDPC に ALP 発現ベクターを遺伝子導入し、当該細胞で強制的に発現誘導させることで、N-HDDPC が有する本来の多分化能性が回復するかどうかを検討することで、HDDPC における多分化能性維持に対する ALP の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、HDDPC の多分化能性維持における ALP の役割を明らかにすることを最終目標に据え、HPP-HDDPC の多分化能性と iPS 細胞形成能に関する検討、HPP-HDDPC への ALP 発現ベクターの遺伝子導入による ALP 陽性株の取得、ALP 陽性株の多分化能性と iPS 細胞形成能に関する検討、から HPP-HDDPC の多分化能性維持に関する機能回復の可能性を探る。

(1) HPP-HDDPC における多分化能性と iPS 細胞形成能についての検討：

HPP-HDDPC に分化誘導剤を与えた場合、神経や骨細胞などの分化細胞へ *in vitro* で分化できるか (多分化能性) 山中 4 因子導入により iPS 細胞が樹立できるかどうか (iPS 細胞形成能) を検討する。申請者らの過去の研究から 5 種類の N-HDDPC のうち ALP 活性の高い 2 種は、iPS 細胞樹立が可能だったが、ALP 低活性の 3 種からは iPS 細胞は樹立できなかった。この結果から、ALP 活性が殆ど無い HPP-HDDPC では、神経や骨細胞に分化誘導できない (あるいは、どちらかに偏った分化傾向を示す) iPS 細胞も樹立できないと予想する。

(2) HPP-HDDPC への ALP 発現ベクターの遺伝子導入による ALP 陽性株の取得：

HPP-HDDPC の ALP 発現ベクターの遺伝子導入には、TNSALP cDNA を内蔵する発現ベクター pTNSALP (Addgene より購入済み) を使用する。これにベクターの宿主染色体への導入を促進する piggyBac (PB) 成分を導入し、トランスポゾンベクター pT-TNSALP を作成する (図 1)。HPP-HDDPC に pT-TNSALP + pT-neo [neomycin 耐性遺伝子 (neo) 発現トランスポゾンベクター] + pTrans (transposase 発現ベクター) を Neon® Transfection system にて遺伝子導入し、G418 を含む培地で細胞を選別する。生じたコロニーを拾

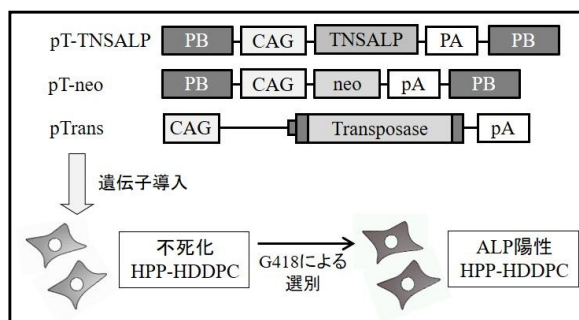


図 1 : HPP-HDDPC ALP 陽性株の樹立

い、ALP 発現の有無を市販の ALP 活性検出キットを用いて確認する。また、細胞を更に拡張し、最終的に導入遺伝子を genomic DNA-PCR で、また、その発現を RT-PCR で確認する。

(3) HPP-HDDPC の ALP 陽性株における多分化能性と iPS 細胞形成能についての検討 :

実験 (2) で取得した ALP 陽性 HPP-HDDPC 株について、実験 (1) と同様に多分化能性と iPS 細胞形成能を検討する。もし、ALP 発現ベクターの遺伝子導入により HPP-HDDPC が多分化能性や iPS 細胞形成能を獲得することができれば、HDDPC において ALP は多分化能性の維持に関与し、かつ、Wnt 経路の signal regulator としての役割を担っている可能性があると考えられる。

4 . 研究成果

(1) HPP-HDDPC における ALP 活性の確認と iPS 細胞形成能の検討

患者から取得した HPP-HDDPC について、ALP 発現の有無を市販の ALP 活性検出キットを用いて確認した結果、ALP の発現を認めなかった (図 2 左)。この細胞に山中 4 因子 (Oct-3/4, Sox2, Klf4, L-Myc) を搭載したプラスミドを Neon® Transfection system にて導入した。遺伝子導入後 10 日間は 20% 牛胎仔血清を含む培地にて培養を行い、以降、マウス胎仔由来 feeder 上に細胞を播種し、iPS 細胞用培地にて培養を行ったが、iPS 細胞樹立はできなかった。この結果は、我々が考えた仮説 (ALP 低活性細胞は iPS 細胞化しにくい) を裏付けた。

(2) HPP-HDDPC への ALP 発現ベクターの遺伝子導入による ALP 陽性細胞の取得

HPP-HDDPC に ALP 発現ベクターの遺伝子導入を試みた。pT-TNSALP + pT-neo + pTrans を HPP-HDDPC に遺伝子導入後、ALP 染色を実施した結果、ALP 陽性細胞の出現を確認した (図 2 右)。更に、G418 選別により ALP 陽性細胞 ALP(+)/HPP-HDDPC を作製した。

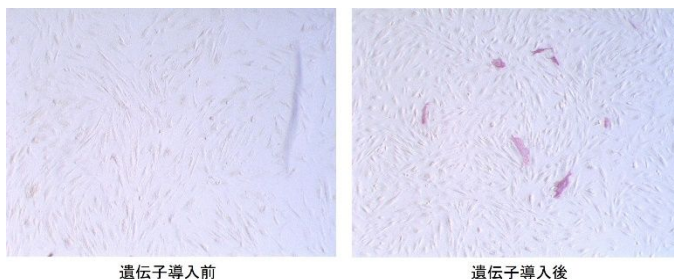


図 2 : HPP-HDDPC への ALP 発現ベクターの遺伝子導入による ALP 陽性細胞の出現

(3) ALP(+)/HPP-HDDPC における多分化能性についての検討

ALP(+)/HPP-HDDPC を維持・増殖

させた後、多分化能性を検討した。HPP-HDDPC、ALP(+)/HPP-HDDPC、N-HDDPC それぞれを神経分化誘導培地で 10 日間培養し、Nissl 染色 (神経細胞を特異的に染色) を行った。その結果、いずれの細胞も Nissl 小体を認め、神経細胞への分化を確認した。また、骨分化誘導培地で 2 週間培養した後、アリザリンレッド染色 (骨細胞を特異的に染色) を行った結果、N-HDDPC は骨への分化を認めたものの、HPP-HDDPC、ALP(+)/HPP-HDDPC では骨への分化は認められなかった。同様に、脂肪分化誘導培地で 2 週間培養後、Oil Red O 染色 (脂肪細胞を特異的に染色) を行った結果、HPP-HDDPC、ALP(+)/HPP-HDDPC ではわずかに脂肪への分化を認めたものの、N-HDDPC では脂肪への分化は認めなかった。ALP(+)/HPP-HDDPC は、N-HDDPC と同様の分化程度を示すことを期待していたが、予想に反する結果となった。後の検証では、ALP(+)/HPP-HDDPC の培養過程で ALP 活性が一部消失する現象が見られ、これが上記結果に反映されたのではないかと考えた。今後、ALP(+)/HPP-HDDPC での ALP(+) の有無を厳密に確認しながら、実験を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sato Masahiro, Saitoh Issei, Akasaka Eri, Inada Emi	4. 巻 5
2. 論文標題 Development of a Novel Pipette Tip-Aided Cell Cloning Method for The Effective Isolation of Genome-Edited Porcine Cell	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 OBM Genetics	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21926/obm.genet.2101126	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 Inada Emi, Saitoh Issei, Kubota Naoko, Iwase Yoko, Kiyokawa Yuki, Noguchi Hirofumi, Yamasaki Youichi, Sato Masahiro	4. 巻 23
2. 論文標題 RNA analysis based on a small number of manually isolated fixed cells (RNA-snMIFxC) to profile stem cells from human deciduous tooth-derived dental pulp cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological Procedures Online	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12575-021-00149-5	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 Saitoh Issei, Sato Masahiro, Kiyokawa Yuki, Inada Emi, Iwase Yoko, Ibane Natsumi, Noguchi Hirofumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Induced Tissue-Specific Stem Cells (iTSCs): Their Generation and Possible Use in Regenerative Medicine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics13060780	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 Sato Masahiro, Saitoh Issei, Kiyokawa Yuki, Iwase Yoko, Kubota Naoko, Ibane Natsumi, Noguchi Hirofumi, Yamasaki Youichi, Inada Emi	4. 巻 10
2. 論文標題 Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase, a Possible Mediator of Cell Maturation: Towards a New Paradigm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10123338	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 Sato M, Inada E, Saitoh I, Watanabe S, Nakamura S	4. 巻 12
2. 論文標題 piggyBac-Based Non-Viral In Vivo Gene Delivery Useful for Production of Genetically Modified Animals and Organs.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 pii: E277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics12030277	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 Kiyokawa Y, Sato M, Noguchi H, Inada E, Iwase Y, Kubota N, Sawami T, Terunuma M, Maeda T, Hayasaki H, Saitoh I	4. 巻 9
2. 論文標題 Drug-Induced Naive iPS Cells Exhibit Better Performance than Primed iPS Cells with Respect to the Ability to Differentiate into Pancreatic -Cell Lineage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 E2838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9092838.	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 Sato M, Saitoh I, Akasaka E, Inada E	4. 巻 5
2. 論文標題 Development of a novel, pipette tip-aided cell cloning method for effective isolation of genome-edited porcine cell	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 OBM Genetics	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21926/obm.genet.2101126	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1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 稲田絵美, 齊藤一誠, 清川裕貴, 早崎治明, 山崎要一
2. 発表標題 免疫染色された少数細胞の簡便な取得に基づくヒト歯髄細胞の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第58回日本小児歯科学会
4. 発表年 2020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	佐藤 正宏 (Sato Masahiro) (30287099)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部・共同研究員 (82612)	
研究分担者	稲田 絵美 (Inada Emi) (30448568)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	
研究分担者	野口 洋文 (Noguchi Hirohumi) (50378733)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001)	
研究分担者	齊藤 一誠 (Saitoh Issei) (90404540)	朝日大学・歯学部・教授 (33703)	

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
---------	---------