

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592947

研究課題名(和文) 歯嚢由来細胞のトランスクリプトーム解析

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of dental follicle cells

研究代表者

小倉 直美 (Ogura, Naomi)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：10152448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)： 歯科治療過程で破棄される歯嚢には幹細胞が存在し、歯嚢由来細胞(歯嚢細胞)は骨芽細胞誘導培地にて培養すると石灰化することが報告され、骨再生医療の細胞源として注目されている。一方、microRNAはmRNAの3'末端非翻訳領域に結合して発現を調節し、発生や分化、病態形成に関与すると示唆されている。本申請では、歯嚢細胞の骨芽細胞分化・石灰化を制御するmicroRNAを検索するとともに、そのmicroRNAの標的遺伝子を検索する。Non-codingおよびcoding RNAの両面からのトランスクリプトーム解析は、骨再生医療に適する細胞のスクリーニングや石灰化機序の解明に役立つと考える。

研究成果の概要(英文)： The dental follicle, which is an ectomesenchymal tissue that surrounds developing tooth germ, contains stem cells and/or progenitor cells of the periodontium. Human dental follicle cells (hDFC) have the ability to mineralize under in vitro culture using osteogenic induction medium (OIM). hDFC have great potential for utilized in regenerative cell therapy.

MicroRNAs (miRNAs) are characterized a class of small non-coding RNAs that mediate the post-transcriptional regulation of gene expression by binding to partially complementary site 3'-untranscriptional region of target mRNAs. miRNA have emerged as key regulators of diverse biological process.

In this study, we performed the gene expression profiles for miRNA and mRNA in hDFC during osteogenic differentiation, and analyzed the biological role of the miRNAs during osteogenic differentiation by examining the expression of bioinformatically predicted miRNA target genes.

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：歯嚢由来細胞 トランスクリプトーム microRNA microRNA標的遺伝子 骨芽細胞分化 石灰化

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療は目覚ましい発展を遂げてきたが、未だ幹細胞の確保には問題が残っている。歯嚢は歯科治療過程で破棄される組織である。歯嚢組織には幹細胞が存在すること、歯嚢由来の細胞は骨芽細胞誘導培地にて培養すると石灰化することが明らかとなった。廃棄される組織から骨再生に用いる細胞を採取できるのであれば、患者の身体的負担を軽減することができる。

近年、タンパク質をコードしない RNA が多数転写され、遺伝子発現制御機能を持つことが報告された。MicroRNA (miRNA) はゲノムにコードされた内在性の small RNA で、自身の配列と部分相補的な標的 mRNA からのタンパク質翻訳を制御し、発生、アポトーシス、細胞増殖、病態形成などに関与しているといわれている。miRNA および miRNA 標的遺伝子、両面からのトランスクリプトーム解析は、骨再生医療に適する細胞のスクリーニングや石灰化機序の解明に役立つと考える。

### 2. 研究の目的

歯嚢由来細胞（歯嚢細胞）の骨芽細胞分化・石灰化に関与する miRNA およびその標的遺伝子を検索する。

#### (1) miRNA 発現解析

歯嚢細胞の骨芽細胞分化・石灰化過程で発現変動する miRNA を検索する。

#### (2) miRNA 標的候補遺伝子検索

骨芽細胞分化・石灰化過程で発現変動した miRNA の標的遺伝子を検索する。

#### (3) miRNA 遺伝子導入

骨芽細胞分化・石灰化に関与する miRNA を歯嚢細胞に遺伝子導入し、歯嚢細胞の骨芽細胞分化・石灰化への影響を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯嚢細胞の分離・培養

埋伏歯の抜歯の際に採取した歯嚢を collagenase/dispase 処理し、歯嚢細胞を分離、初代培養および継代培養を行った。

#### (2) 歯嚢細胞の細胞学的性質

歯嚢細胞の細胞表層マーカーは免疫染色法を用いて調べた。また、石灰化能はアリザリン染色法およびアルカリホスファターゼ活性を測定した。

#### (3) microRNA マイクロアレイ解析

歯嚢細胞を骨芽細胞誘導培地または増殖培地で培養後、miRNeasy kit を用いて total RNA を抽出した。Agilent human miRNA Rel. 12.0 array を用いて、microRNA 発現量を測定した。

#### (4) microRNA 標的候補遺伝子検索

歯嚢細胞を骨芽細胞分化過程で発現変動した miRNA の標的候補遺伝子を miRNA Database である TargetScan, MicroCosm 等から検索した。また、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) miRNA Target Filter を用いて標的候補遺伝子の絞り込みを行った。

#### (5) DNA マイクロアレイ解析

骨芽細胞誘導培地または増殖培地で培養した歯嚢細胞の遺伝子発現量を Affymetrix GeneChip HG U133 Plus 2.0 Array を用いて網羅的に測定した。

#### (6) microRNA-mRNA 比較解析

歯嚢細胞の骨芽細胞分化・石灰化で発現変動の認められた miRNA の標的候補遺伝子を GeneSpring にインポートし、遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析と比較した。

#### (7) microRNA 遺伝子導入

歯嚢細胞に HiPerFect Transfection 試薬を用いて miRNA 遺伝子導入を行った。

#### (8) タンパク質量の測定

miRNA を遺伝子導入した歯嚢細胞と導入していない歯嚢細胞を可溶化し、miRNA 標的遺伝子から翻訳されるタンパク質量を Western-blot 法、ELISA 法を用いて調べた。

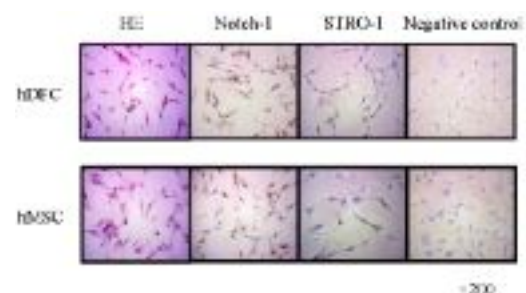
#### (9) 遺伝子発現

miRNA を遺伝子導入した歯嚢細胞と導入していない歯嚢細胞から total RNA を抽出し、real time-PCR 法を用いて、miRNA 標的遺伝子の発現量を測定した。

### 4. 研究成果

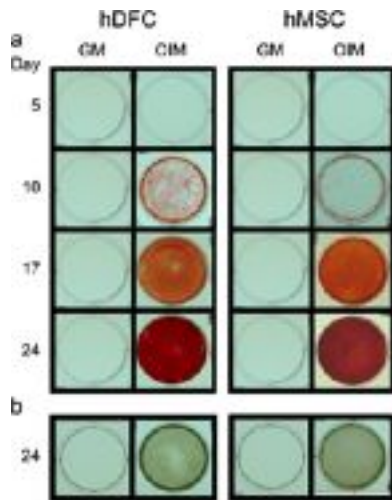
#### (1) 歯嚢細胞の細胞学的性質

歯嚢細胞の細胞学的性質を調べた。対象として骨髄由来未分化間葉系幹細胞を用いた。まず、幹細胞マーカーである Notch-1, STRO-1 の免疫組織染色を行った。

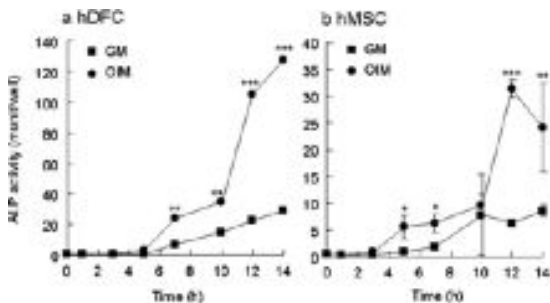


歯嚢細胞は Notch-1, STRO-1 陽性であった。

歯嚢細胞を骨芽細胞誘導培地で培養した時の石灰化をアリザリン染色および von Kossa 染色によって調べた。



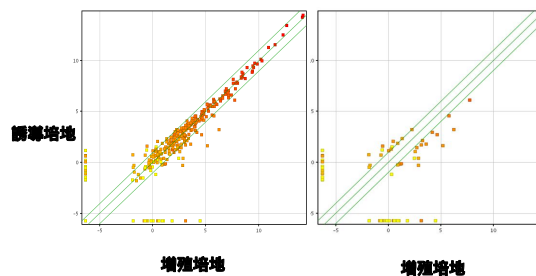
骨芽細胞誘導培地で培養 10 日目からアリザリン染色陽性となり、培養 24 日目では von Kossa 染色陽性であった。



歯嚢細胞を骨芽細胞誘導培地で培養するとアルカリホスファターゼ活性の上昇が認められた。

### (2) miRNA マイクロアレイ解析

歯嚢細胞の骨芽細胞分化・石灰化に関与する miRNA の検索を目的に、歯嚢細胞を骨芽細胞誘導培地または増殖培地で 7 日間培養し、発現変動した miRNA を miRNA マイクロアレイ解析によって検索した。

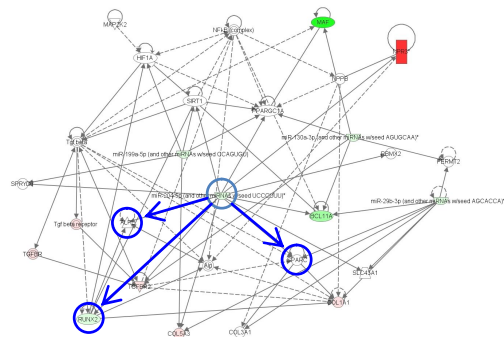


960 miRNA 中、歯嚢細胞で発現が認められたのは、307 miRNA であった。骨芽細胞誘導培地で培養した時、増殖培地に比べ 2 倍以上発現上昇したのは 33 miRNA、1/2 以下に発現減少したのは 35 miRNA であった。

歯嚢細胞を骨芽細胞誘導培地で培養した時、発現減少率の高かった上位 10 遺伝子を示す。

Ranking	Molecules	Fold Change
1	miR-150-3p	-1122.434
2	miR-292-5p	-179.832
3	miR-1224-5p	-100.763
4	miR-1908	-76.005
5	miR-424-3p	-69.677
6	<b>miR-204-5p</b>	<b>-52.353</b>
7	miR-294-5p	-45.454
8	miR-193b-5p	-36.164
9	miR-671-5p	-32.731
10	miR-188-5p	-29.845

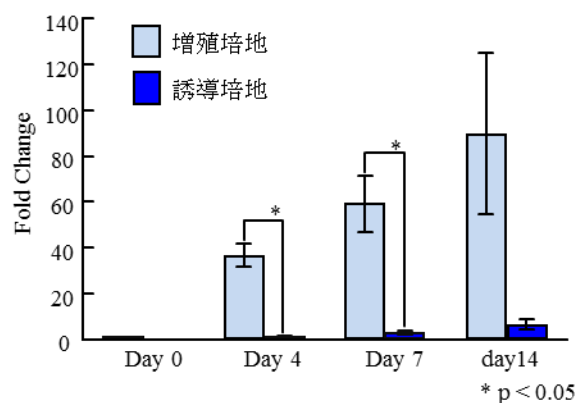
歯嚢細胞を骨芽細胞誘導培地で培養した時、発現変動した miRNA の標的候補遺伝子を miRNA データベースより検索した。miRNA とその標的候補遺伝子を IPA にアップロードし、分子間相互作用を検索した。



歯嚢細胞の骨芽細胞分化過程において発現減少した miR-204 は、ALP, RUNX2, SPARC を標的にしていた。

### (3) miRNA-204 発現

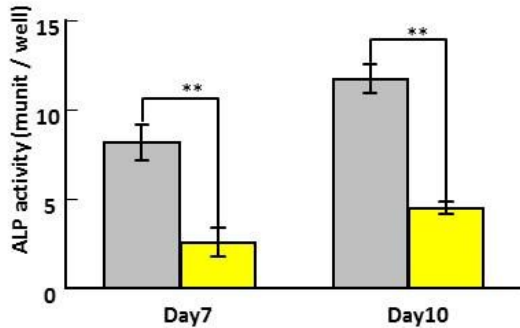
歯嚢細胞の骨芽細胞分化誘導過程での miRNA-204 の発現を調べた。



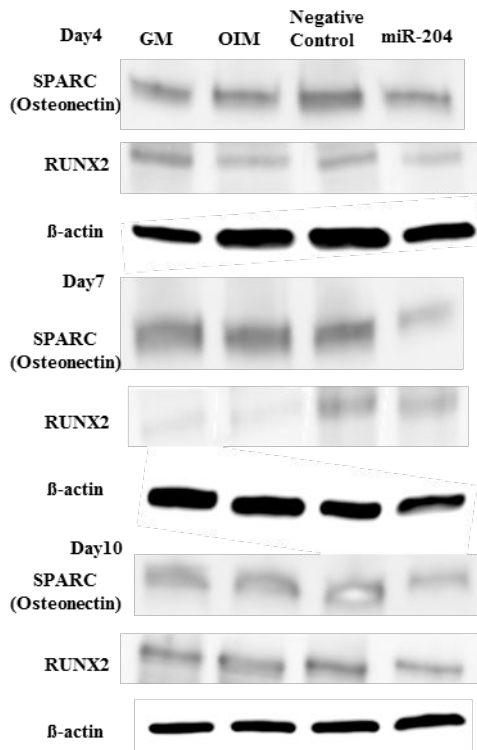
歯嚢細胞を増殖培地で培養した時と比較して、骨芽細胞誘導培地で培養した時、miR-204 の発現は減少した。

#### (4) miRNA-204 の影響

歯嚢細胞の骨芽細胞分化過程における miR-204 の影響を調べるために、miR-204 または Negative Control を培養 0 日目および 3 日目に遺伝子導入し、骨芽細胞誘導培地で培養した。

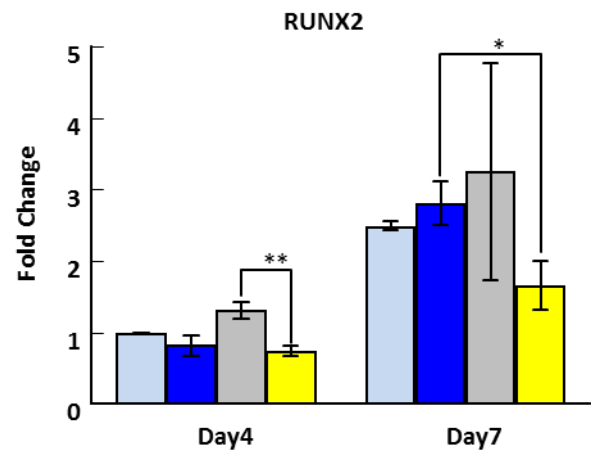
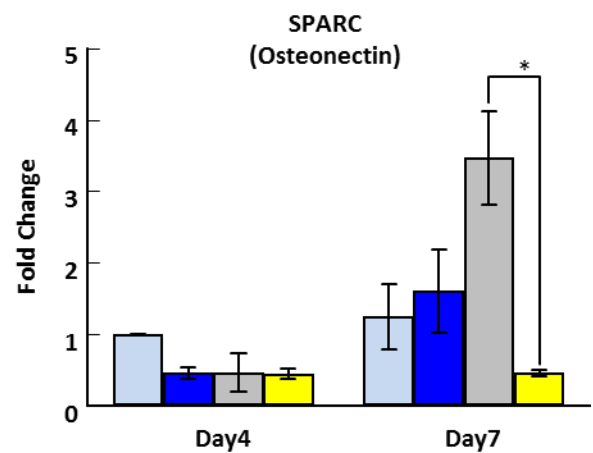
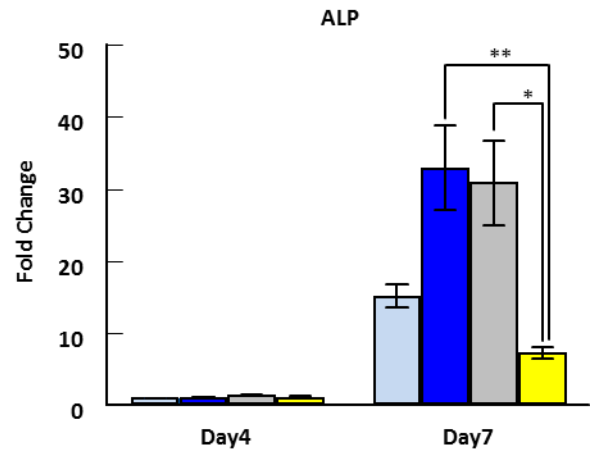


miR-204 を歯嚢細胞に遺伝子導入すると、Negative Control と比較して miR-204 導入群でアルカリホスファターゼ活性の減少を認めた。



miR-204 を歯嚢細胞に遺伝子導入すると、Osteonectin, RUNX2 のタンパク質産生は、Negative Control と比較して miR-204 導入群で培養 4 日目、7 日目において発現減少を認めた。

次に、歯嚢細胞に miR-204 を遺伝子導入し、培養 4 日目および 7 日目の遺伝子発現を real time PCR で調べた。



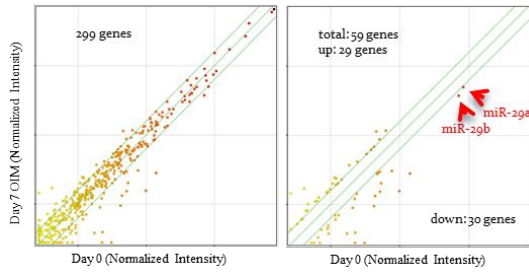
miR-204 を歯嚢細胞に遺伝子導入した。ALP, Osteonectin, RUNX2 の遺伝子発現は、Negative Control と比較して miR-204 導入群で発現減少を認めた。

#### (5) miRNA-29 発現

歯嚢細胞の miRNA マイクロアレイ解析の結果、培養 0 日に比べ、骨芽細胞分化誘導培地で培養 7 日目で発現が減少した miRNA 群の中に、miRNA-29a, -29b が認められた。



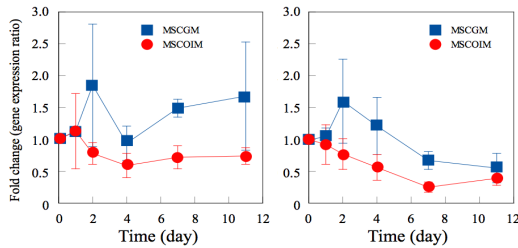
## miRNA マイクロアレイ解析



歯嚢細胞の骨芽細胞分化誘導過程での miRNA-29 の発現を real time-PCR 法で調べた。

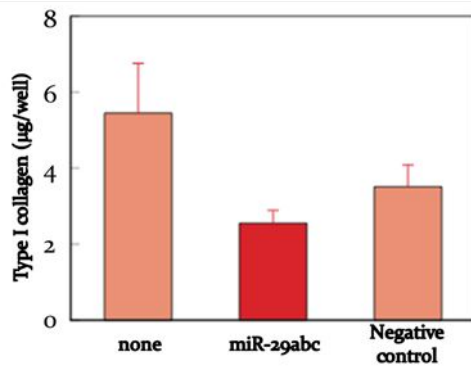
miR-29a

miR-29b



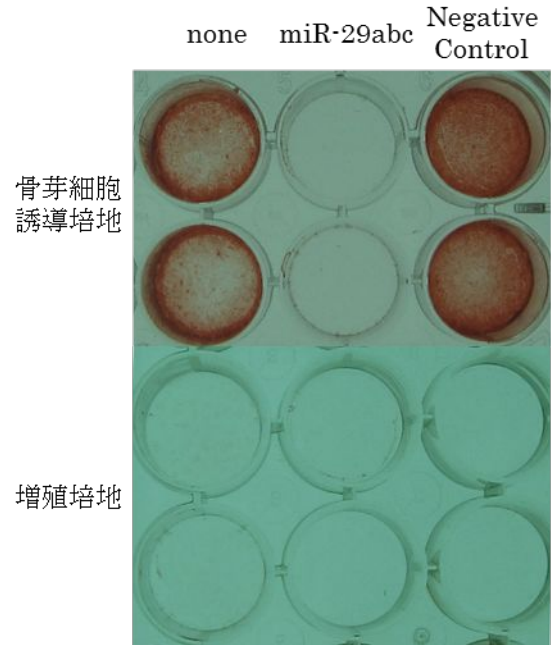
miR-29a, -19b とともに、骨芽細胞誘導培地で培養すると、増殖培地に比べ、発現は減少した。

miRNA データベースから、miR-29 はコラーゲンを標的にしていることが認められた。そこで、歯嚢細胞に miR-29abc を遺伝子導入し、タイプ I コラーゲン産生を調べた。



歯嚢細胞に miR-29abc を遺伝子導入したところ、タイプ I コラーゲン産生は減少した。

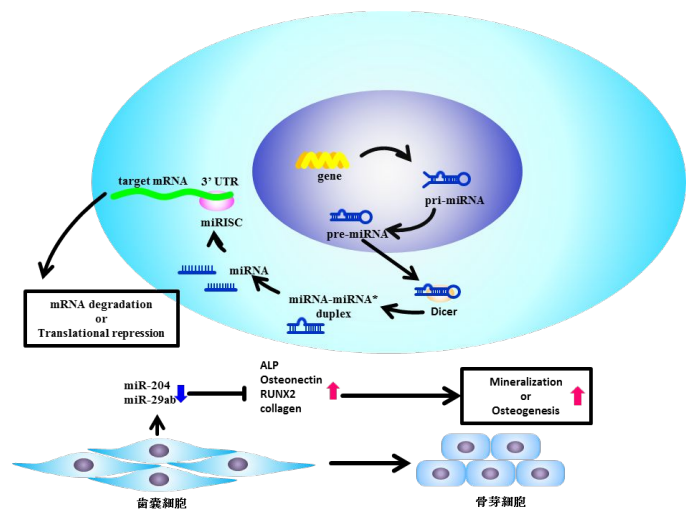
次に、歯嚢細胞に miR-29abc を遺伝子導入した時の石灰化能を調べた。骨芽細胞誘導培地または増殖培地で 14 日間培養後、アリザリン染色を行った。



歯嚢細胞に miR-29abc を遺伝子導入したところ、石灰化の遅延が認められた。

## (6) 考 察

歯嚢細胞の骨芽細胞分化過程では、骨芽細胞分化・石灰化に關与する Runx2, アルカリホスファターゼ, オステオネクチン、コラーゲンを標的とする miRNA の発現が減少することが認められた。これらの miRNA が減少することにより、Runx2, アルカリホスファターゼ, オステオネクチン、コラーゲンの翻訳が亢進し、骨芽細胞分化や石灰化が促進されると示唆された。



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)

Takahashi K, Ogura N, Aonuma H, Ito K, Ishigami D, Kamino Y, Kondoh T. Bone morphogenetic protein 6 stimulates mineralization in human dental follicle cells without dexamethasone. Arch Oral Biol (査読有) 58: 690-698, 2013. doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.10.018.

Fujimoto Y, Ogura N, Aonuma H, Takahashi K, Ito K, Kondoh T. Gene Expression and Protein Production of Leukemia Inhibitory Factor in Human Dental Follicle Cells. Int J Oral-Med Sci (査読有) 11:156-162, 2012. <http://www.mascat.nihon-u.ac.jp/labo/info/index.html>

Ogura N, Takahashi K, Iwai S, Fujimoto Y, Hashimoto H, Kondoh T. Comparative Analysis of MicroRNA-mRNA Expression Profiles of Mesenchymal Stem Cells and Dental Follicle Cells. Int J Oral-Med Sci (査読有) 11:13-21, 2012. <http://www.mascat.nihon-u.ac.jp/labo/info/index.html>

[学会発表](計 14 件)

Tomoki R, Ogura N, Takahashi K, Aonuma H, Ishigami D, Ito K, Kamino Y, Kondoh T. Analysis of microRNA-mRNA expression profiles in dental follicle cells. International Association for Dental Research, Mar, 23, 2013, Seattle, WA, USA.

Takahashi K, Ogura N, Tomoki R, Aonuma H, Ishigami D, Ito K, Kamino Y, Kondoh T. microRNA profiling of dental follicle cells during osteogenic differentiation. International Association for Dental Research, Mar, 23, 2013, Seattle, WA, USA.

Iwai S, Kuyama K, Kuboyama N, Ogura N, Eda T, Yamamoto H, Kondoh T. Osteogenic potential of human dental follicle cells. International Association for Dental Research, Mar, 22, 2013, Seattle, WA, USA.

友木里沙, 小倉直美, 高橋康輔, 青沼陽菜, 枝卓志, 岩井聡, 石上大輔, 伊藤耕, 神野良一, 近藤壽郎, ヒト歯嚢由来細胞の石灰化過程における血管申請因子の検討, 日本口腔外科学会, 2012, 10, 19, 横浜.

ヒト歯嚢由来細胞の LIF 発現と LIF 標的 microRNA 発現解析, 藤本陽子, 小倉直美, 近藤壽郎, 神野良一, 伊藤耕, 青沼陽菜, 高橋康輔, 友木里沙, 日本口腔外科学会, 2012, 10, 20, 横浜.

ヒト歯嚢由来細胞が骨芽細胞へ分化する過程における BMP6 の影響, 高橋康輔, 小倉直美, 友木里沙, 青沼陽菜, 藤本陽子, 岩井聡, 石上大輔, 伊藤耕, 神野良一, 近藤壽郎, 2012, 10, 21, 横浜.

小倉直美, 高橋康輔, 青沼陽菜, 伊藤耕, 神野良一, 近藤壽郎, 骨髄由来未分化間葉系幹細胞と歯嚢由来細胞間での microRNA-mRNA 発現解析, 日本骨代謝学会, 2012, 7, 19, 東京.

高橋康輔, 小倉直美, 青沼陽菜, 岩井聡, 藤本陽子, 伊藤耕, 神野良一, 近藤壽郎, ヒト歯嚢細胞の石灰化過程での遺伝子発現およびシグナル伝達解析, 日本骨代謝学会, 2011, 7, 28, 大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小倉 直美 (OGURA NAOMI)  
日本大学・松戸歯学部・講師  
研究者番号: 1 0 1 5 2 4 4 8

### (2) 研究分担者

伊藤 耕 (ITO KO)  
日本大学・松戸歯学部・助教  
研究者番号: 2 0 4 1 9 7 5 8

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

高橋康輔 (TAKAHASHI KOSUKE)  
日本大学・松戸歯学部・助教  
研究者番号: 3 0 7 0 5 6 8 7