

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659899

研究課題名（和文） 新たなリプログラミング法による組織幹細胞作製技術の適正化

研究課題名（英文） Development of a technic to generate somatic stem cells using a newly reprogramming method.

研究代表者

窪木 拓男（KUBOKI TAKUO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00225195

研究成果の概要（和文）：我々は、組織幹細胞の未分化維持に関わる因子の探索を目的にスクリーニングを行い、TNF- $\alpha$ が未分化維持に変わっていることを明らかとしてきた。実際、ヒト由来歯髄細胞を TNF- $\alpha$ 刺激することで、未分化幹細胞マーカーである CD146 や SSEA4 の発現レベルが上昇することを明らかとしてきた。さらに、いくつかの microRNA が未分化維持に関わっていることを突き詰めた。

研究成果の概要（英文）：We performed a screening for factors involved in the regulation of maintenance of stemness in dental pulp cells (DPCs). As a result, we found that TNF- $\alpha$  was involved in maintenance of stemness, and increased the number of cells positive for stem cell surface markers CD146 and SSEA4. Moreover, we also identified some microRNAs that regulate stemness, proliferation and differentiation of DPCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：補綴一般

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：リプログラミング, 歯髄細胞

## 1. 研究開始当初の背景

多能性を有した組織幹細胞は様々な組織に存在し、組織の維持や損傷の修復に寄与していること、すなわち組織の恒常性を担っていることが報告されている。現在、これらの組織幹細胞を利用した再生医療が試みられているが、細胞分離効率が低いことに加え、年齢と共に生体内での幹細胞数が減少することから、疾患によっては患者自身の組織幹細胞を分離し、利用することが困難なことも多い。

このような中、京都大学の山中らは線維芽細胞に Oct3/4, Klf4, Sox2, cMyc という

4つの遺伝子を導入することで、induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) が得られることを報告した (*Nature*, 448: 260-262, 2007)。この iPS 細胞作製技術は、分化した細胞を再び多能性幹細胞に戻すリプログラミング方法であり、革新的な医療を可能とする技術として注目されている。しかしながら、iPS 細胞を臨床応用するには、煩雑性、ガン化の危険性などまだまだ乗り越えなければいけないハードルは未だ数多く残されている。

## 2. 研究の目的

我々は、これらの問題を解決する手段とし

て、iPS 細胞のように完全に細胞を初期化するのではなく、組織中に多く存在する組織前駆細胞を対象として、その細胞の特性を持たせたまま、より未分化な組織幹細胞へとリプログラミングするアイデアへとたどり着いた。本技術が開発されれば、iPS 細胞が抱えている倫理問題や安全性の問題、幹細胞医療が抱えている患者からの細胞の分離とその純度の問題を一掃できる。本研究では、脊椎神経再生や歯髄再生に有効であることが報告されている歯髄由来幹細胞を、歯髄細胞をリプログラミングすることで効率よく手に入れることができないかと考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞の分離

岡山大学倫理委員会承認のもと、第三大白歯抜去歯に付着した歯根膜組織をピンセットにて回収した。その組織を細片化後、ディスペーゼ/コラゲナーゼにて 37°C で 1 時間酵素処理を行い、単一細胞を得た。そして、コロニー形成能を指標に幹細胞候補細胞の分離を行なった。

#### (2) リプログラミング候補因子のスクリーニング

近年、細胞膜表面抗原である STRO-1 や SSEA4 が間葉系幹細胞マーカーの一つとして知られるようになった。そこで、我々はこれらをマーカーに一次スクリーニングを行なった。

具体的な方法としては、歯髄細胞を播種し、FDA 認可薬剤や様々な成長因子を投与した。刺激 48 時間後に細胞を固定し、STRO-1 および SSEA4 の抗体を用い、免疫組織化学染色を行い、Thermo 社製細胞イメージアナライザーを用い評価した。

#### (3) 同定因子の再評価

実験 (2) で同定された因子に関し、歯根膜前駆細胞に作用させ以下の項目に関し評価した。

①未分化間葉系幹細胞マーカーである *OCT4* と *NANOG* の遺伝子発現量を定量性 RT-PCR 法にて評価した。

②フローサイトメーターを用い、SSEA4、CD146 の発現量を評価した。

#### (4) リプログラミングに関与する non-coding RNA の探索

①幹細胞はHoechst33342のような蛍光化学物質を細胞外へ排出する性質を持っている。そのため、UVレーザーを照射しフローサイトメーターを用いて解析を行うと、母集団 (main population: MP) と異なる部位 (side population: SP) に幹細胞が分布する事が知られている。そこでこの手法を応用し、cell Sorterにてヘテロな集団である歯髄細胞から幹細胞 (SP細胞) の分離を行なった。

②分離した SP 細胞を評価するため、未分化間葉系幹細胞マーカーである *OCT4* と *NANOG* の遺伝子発現量を定量性 RT-PCR 法にて評価した。

③分離した SP 細胞の機能を、Colony Forming Unit-Fibroblast (CFU-F) アッセイにて評価した。

④幹細胞維持に関わる microRNA の同定を目的に、MP 細胞および SP 細胞から mRNA を回収し、microRNA array を用い、網羅的に解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞の分離

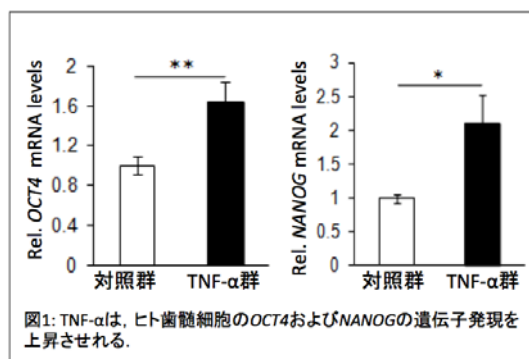
歯髄組織からコロニー形成能を有した細胞を分離することができた。分離した細胞は紡錘形を呈していた。

#### (2) リプログラミング候補因子のスクリーニング

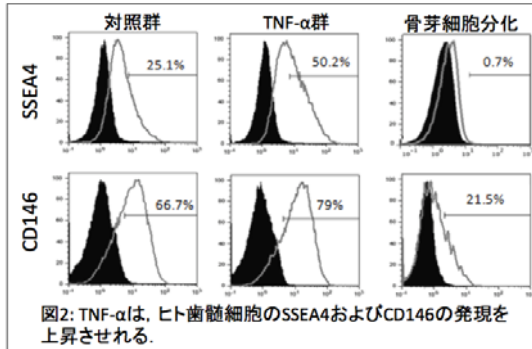
リプログラミング候補因子のスクリーニングを行った結果、炎症性サイトカインの一つである TNF- $\alpha$  刺激群において間葉系幹細胞マーカーの一つである STRO-1 や SSEA4 陽性細胞が増加することを免疫組織化学染色にて確認した。

#### (3) 同定因子の再評価

TNF- $\alpha$  を歯髄細胞に作用させ、以下の項目に関し評価した。



- ①未分化間葉系幹細胞マーカーである *OCT4* と *NANOG* の遺伝子発現量を定量性 RT-PCR 法にて評価した結果, TNF- $\alpha$  刺激により *OCT4* の遺伝子発現量は約 1.6 倍, *NANOG* の遺伝子発現量は約 2 倍に上昇した(図 1).
- ②フローサイトメーターを用いて SSEA4 および CD146 の発現量を評価した結果, SSEA4 の発現量は 25%から 50%に, CD146 の発現量は 66.7%から 79%に上昇した(図 2).

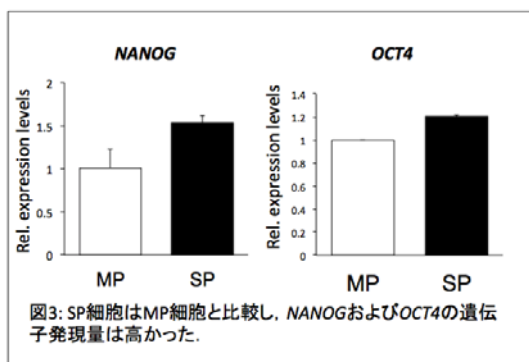


以上の結果から, 炎症性サイトカインのひとつである TNF- $\alpha$ は, 幹細胞の幹細胞性維持または細胞のリプログラミングに関与している可能性が示唆される. 今後, TNF- $\alpha$ の歯髄細胞への作用メカニズムを詳細に検討する予定である. また, TNF- $\alpha$ の本作用は歯髄細胞特異的な作用であるかを検討する予定である.

#### (4)リプログラミングに関与する non-coding RNA の探索

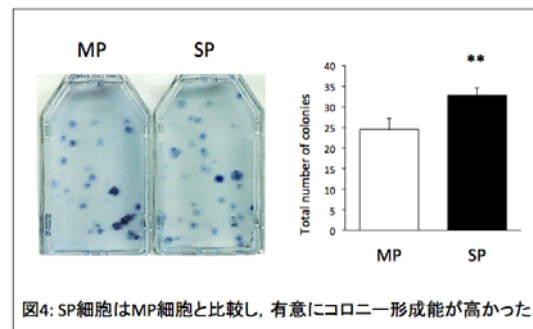
①歯髄細胞内に存在する未分化幹細胞の分離を目的に, Hoechst33342にて染色を行い, cell Sorter にてMP細胞およびSP細胞を分離することができた.

②分離した SP 細胞の *OCT4* および *NANOG* の遺伝子発現量を定量性 RT-PCR 法にて評価した. その結果, MP 細胞と比べ *OCT4* の遺伝子発現量は約 1.5 倍, *NANOG* の遺伝子



発現量は約 1.2 倍上昇した(図 3).

③分離した SP 細胞の機能を, CFU-F アッセイにて評価した. その結果, MP 細胞と比べ有意にコロニー形成能は高かった(図 4).



④MP 細胞および SP 細胞から mRNA を回収し, microRNA array を用い, 網羅的に解析した. その結果, SP 細胞と比較し MP 細胞において 10 倍以上の発現量を認めた microRNA が 13, MP 細胞と比較し SP 細胞において 1.4 倍以上の発現量を認めた microRNA が 9 つ同定された.

現在, 同定した microRNA に対し in-silico 解析を行っている. 今後, 遺伝子強制発現, 発現抑制モデルを用い, 同定した microRNA の機能解析を行う予定である.

#### 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)

[学会発表] (計 2 件)

①Pham Thanh Hai, T.Kuboki, *et al.* 『A comparative analysis of the effect of rhTNF- $\alpha$  treatment on the stem cell phenotype of cells derived from dental pulp, periodontal ligament and bone marrow.』 The Asean Plus and Tokushima Joint International Conference ( December 07-08, 2012) Yogyakarta, Indonesia.

② Pham Thanh Hai, T.Kuboki, *et al.* 『Effect of transient TNF- $\alpha$  treatment on the stem cell phenotype of human periodontal ligament cells and bone marrow stromal cells.』 Japanese Association of Regenerative Dentistry 10th Annual Meeting. ( September 1-2, 2012) Kobe, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪木 拓男 (KUBOKI TAKUO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
教授  
研究者番号：00225195

(2) 研究分担者

園山 亘 (SONOYAMA WATARU)  
岡山大学・大学病院・講師  
研究者番号：40325121

内部 健太 (UCHIBE KENTA)  
岡山大学・岡山大学病院・医員  
研究者番号：20584618

大野 充昭 (ONO MITSUAKI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助  
教  
研究者番号：60613156

(3) 連携研究者

該当なし