

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593001

研究課題名(和文) ヒト歯髄幹細胞におけるHOX遺伝子群の発現パターン解析と制御

研究課題名(英文) Expression pattern analysis and control of the HOX genes in the human pulpal stem cell

研究代表者

淀川 慎太郎 (Yodogawa, Shintaro)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：60433439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯髄由来幹細胞を採取し、HOX遺伝子の発現パターン解析を行った。neurosphere法で得られた幹細胞はHOXC群の発現が上昇していた。これは幹細胞中に神経前駆細胞が含まれていた可能性が考えられた。DPSC(AllCells社製)ではHOXA、HOXB群の発現が上昇していた。この細胞は間葉系幹細胞に似ており、neurosphere法で得られた細胞と異なる結果であった。以上より歯髄より万能幹細胞を樹立することが困難であることが明らかとなった。DPSCにHOXC5遺伝子発現プラスミドベクターを導入し、神経細胞への分化を検討したが、分化は確認されなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined expression pattern of HOX genes in the stem cell that collected from human dental pulp. As for the stem cell provided by the neurosphere method, expression of HOXC group increased. As for this result, It is assumed that a neural progenitor cells was included in in this stem cell was thought about. On the other hand, HOXA, expression of HOXB group rose in Dental Pulp Stem Cells(DPSC/AllCells).This cell resembled a mesenchymal stem cell and was the result that was different from a provided cell in the neurosphere method. It was found that it was difficult to establish a totipotent stem cell than human dental pulp, because a result varied according to a method of the purification of the stem cell derived from human dental pulp. We introduced HOXC 5 genes expression plasmid vector into DPSC and examined the differentiation to nerve cells, but the differentiation was not confirmed.

研究分野：口腔外科学

キーワード：歯髄幹細胞 HOX 分化誘導

## 1. 研究開始当初の背景

生物が胚発生から形態形成される過程で、時間的・空間的に統制のとれた細胞間のコミュニケーションが出来るのは、形態形成のマスター調節因子としてホメオボックス遺伝子が司令塔の役目を果たしているからである。ホメオボックスファミリーに属する遺伝子のなかでも、形態形成過程における位置情報の担い手として HOX 遺伝子群が知られている [ 1 ] [ 2 ]。この 39 個の遺伝子から構成される HOX 遺伝子群は、胚発生時に最も活躍するが、成体においても組織・臓器に特徴的な発現パターンを示すことが知られてきた [ 3 ]。生物が臓器・組織の構築と機能を維持しているのは、個々の構成細胞が正しい位置情報を認識しているためと考えられ位置情報は、その情報の下流において臓器・組織の特異化に関連する数多くの遺伝子群の発現を時間的・空間的に制御している。ヒトの発生過程と同様に成人でも頭部から尾部に向かって、HOX 遺伝子の発現が変化しており、各臓器は固有の HOX コードを持っていることが明らかとなった。近年の報告でヒト歯牙の歯髄中から多分化能をもつ幹細胞が存在することが明らかとなっている。ところが、実際には歯髄中の幹細胞増殖・分化の機序は不明である。本研究ではヒト歯髄から幹細胞を分離し、任意の組織・臓器と比較した HOX 遺伝子群の発現パターン解析を行ない、歯髄由来幹細胞の HOX 遺伝子の発現制御を行なうことで、任意の組織・臓器へ分化誘導が可能であるかを検討した。

## 2. 研究の目的

ヒト歯髄由来幹細胞の HOX 遺伝子群 (HOX39 遺伝子) と他のホメオ遺伝子群、計約 50 種類の発現パターンを解析。他の幹細胞 (造血幹細胞、間葉系幹細胞等) も

同じ解析を行ない、それらの幹細胞間でホメオ遺伝子群の発現パターンにどのような違いが存在するのかを検討する。更にはそのデータをもとに分化誘導制御を試みる。

## 引用文献

[ 1 ] W. J. Gehring, and Y. Hiromi, Homeotic Genes and the Homeobox. Annu. Rev. Genet. 20 (1986) 147 - 173

[ 2 ] W. McGinnis, R. Krumlauf, Homeobox genes and axial patterning, Cell 68 (1992) 283 - 302.

[ 3 ] Y. Takahashi, J. Hamada, K. Murakawa, et al, Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system, Exp Cell Res, 293 (2004) 144-153.

## 3. 研究の方法

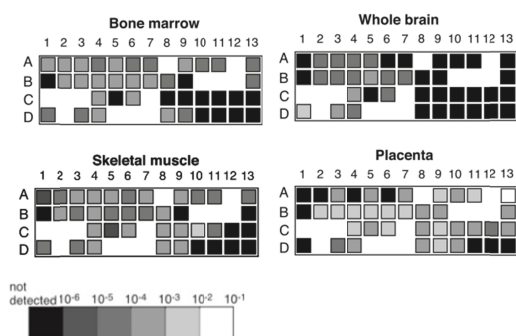
抜去歯牙 (主に齲蝕に冒されていない上顎智歯、矯正治療上抜去が必要となった歯牙等) より歯髄を採取する。採取した歯髄は、細胞培養液中に移し neurosphere 法にならい培養し、幹細胞の分離・純化を行なう。その後、リアルタイム PCR を用い、HOX39 遺伝子および他のホメオボックス遺伝子計、約 50 遺伝子についてヒト歯髄由来幹細胞の発現パターンの解析を行う。さらに、発現ベクターや siRNA を用い、歯髄由来幹細胞の発現パターンを変化させその phenotype を観察する。

## 4. 研究成果

1. リアルタイム PCR を用いた成人の正常組織の HOX 発現パターン解析

遺伝子発現解析は、SYBR Green ケミストリを利用した定量的リアルタイム RT-PCR 法で行った。内部標準には  $\beta$ -actin 遺伝子の発現を定量した。PCR 終了後、解離曲線解析を行い、PCR 産物の特異性を確認した。

また、データの解析には Sequence Detector Systems version 2.0 software を用いた。最初の材料である RNA 量のサンプル間におけるばらつきを考慮し、対象遺伝子の発現量は、内部標準として用いた *-actin* 遺伝子の発現量で補正した相対比 (対象遺伝子の発現量 / *-actin* 遺伝子の発現量) で表した。



## 2. 歯髄幹細胞の培養、分離、HOX 発現パターン解析

まず抜去歯牙から歯髄幹細胞の分離・培養・HOX 遺伝子を齶食のないヒト智歯より採取した歯髄をウシ胎児血清含有 *-MEM* で培養し、培養皿底面に付着した細胞を hydrocell 上で B-27suppliment、bFGF 含有の培養液で培養した。neurosphere 様の浮遊細胞塊を得た。未分化なまま、これを継代培養することには成功したが、細胞塊中の歯髄幹細胞を同定するのに困難を極めた。この細胞塊では HOXC5, HOXC6, HOXC8、HOXC9 の発現上昇がみられた。これは脊髄神経細胞の HOX 発現パターンに類似しているが、神経前駆細胞の contamination も否定できない結果となった。

次に、ベリタス社製の歯髄幹細胞を培養し、上記結果との比較を行った。安定した継代培養が困難であり、実験の遅延が生じた。この細胞は CD73、CD90、CD105、CD166 陽性、CD34、CD45、CD133 陰性であり、間葉系幹細胞様の細胞であることが示唆された。この細胞では HOXA2 をはじめ A 群、HOXB 群の発現上昇がみられ neurosphere 法で得られた結果と差が生じていた。

## 3. HOXC5 発現プラスミドベクター作成、遺伝子導入

HOXC5 発現プラスミドベクターを構築し、ベリタス社製歯髄幹細胞に導入した。これにより phenotype の変化を確認した。導入の際に多くの細胞死が起こり、実験計画に大きな遅延が生じた。導入後 24~48 時間後 Mock 導入と比して HOXC5 の発現レベルは高くなっていた。これから安定発現株を樹立するために選択培地での培養を行ったが増殖してきた細胞は HOXC5 を発現していないことが明らかとなった。

## 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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

淀川 慎太郎 (YODOGAWA, Shintaro)

北海道医療大学歯学部助教

研究者番号：60433439

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

村田 勝 (MURATA, Masaru)

北海道医療大学歯学部准教授

研究者番号：00260662

浜田 淳一 (HAMADA, Junichi)

北海道医療大学看護福祉学部教授

研究者番号：50192703