

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462903

研究課題名(和文) 幹細胞を用いた歯髄再生におけるオートファジー必須遺伝子LC3とAPG5の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of autophagy-related genes LC3 and APG5 in dental pulp regeneration using stem cells

研究代表者

松本 享 (Matsumoto, Toru)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：10150781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト骨格筋幹細胞の象牙芽細胞分化誘導過程におけるオートファジー関連遺伝子LC3およびAPG5の新規な生理的役割を明らかにするため、siRNAを用いて詳細な検討を行った。ヒト骨格筋幹細胞の象牙芽細胞分化誘導において、LC3およびAPG5の発現亢進が認められた。さらに、siRNA処理により象牙芽細胞分化誘導の抑制が観察された。siRNAを用いたシグナルカスケードの検索により、ヒト骨格筋幹細胞の象牙芽細胞分化誘導はオートファジー関連遺伝子APG5を介して誘導されたMMP-3により制御されることを明示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the upregulation of autophagy-related gene (APG) signaling during human odontoblastic differentiation derived from human skeletal muscle stem cells. In a screening experiment, the mRNA and protein levels of microtubule-associated protein 1 light chain (LC3) and APG5, together with the amounts of autophagosomes and autophagy fluxes. Treatment with siRNAs against APG5 suppressed the odontoblast differentiation.

Taken together with our previous findings, we have revealed a unique sequential cascade involving APG5, and MMP-3 in odontoblastic cell differentiation of human skeletal muscle stem cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：オートファジー 歯髄再生

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の細胞内大規模分解系である Autophagy (オートファジー) は細胞質内タンパク質クリアランス, 発癌抑制, 感染, 免疫制御, プログラム細胞死, 発生や分化などのさまざまな生理的役割をもつことが解明されている。興味深いことに, 根尖性歯周炎の進展や加齢化歯髓細胞において, LC3 オートファゴソームマーカーの発現の上昇や, オートファジー関連遺伝子群 Autophagy related gene (APG) 5 タンパク質の動態変化によりオートファジーが活性化することが報告されている。歯髓組織は線維芽細胞, 神経細胞などから構成されるが, とりわけ象牙芽細胞の存在比が極めて高い。歯髓組織は象牙質を再生する高い潜在能力を有しており, 歯髓幹細胞が象牙質の再生に関与することが示唆されている。

近年, 従来のおもな治療法に代わる有効な手段として, 幹細胞を用いた細胞導入治療法が注目されており, 特に摘出した臓器に界面活性剤を灌流して細胞を溶解し, 脱細胞化した細胞外マトリックスを作成すること, これを足場 (スキャホールド) にして幹細胞を播種し再細胞化することにより臓器を再生する再生治療が注目されている。

申請者らはこれまでに, マウス ES 細胞, マウス iPS 細胞, さらにヒト骨格筋組織から確立したヒト骨格筋幹細胞を用いて, 象牙質・歯髓複合体の再生メカニズムを解析し, 新規な幹細胞を用いた細胞導入象牙質・歯髓複合体再生治療法のモデルを確立した。

本研究では, ヒト骨格筋幹細胞由来象牙芽細胞分化誘導の実験系を用いて, オートファジー必須遺伝子 LC3 と APG5 の詳細な動態ならびに機能解析を行い, 新規な *in vitro* 歯髓再生モデルの構築を目的とする。

2. 研究の目的

申請者らが新規に確立したヒト骨格筋幹

細胞から高率に象牙芽細胞となる分化誘導モデルを用いて, 象牙芽細胞の存在比が極めて高い歯髓の再生過程におけるオートファジー必須遺伝子 LC3 と APG5 の機能解析 (遺伝子ならびに遺伝子産物の動態) を行う。さらに, ラットを用いた *in vitro* の実験系で, 摘出した歯を基盤鋳型として, ヒト骨格筋幹細胞を用いて再細胞化した歯髓組織の再生過程において LC3, APG5 を含むオートファジー関連遺伝子の動態を観察することで, 従来の歯髓保存治療であるう蝕治療法や覆髓法に代わる新規な歯髓再生モデルを構築することを研究目的とする。

3. 研究の方法

ヒト骨格筋幹細胞による歯髓細胞分化過程におけるオートファジー必須遺伝子 LC3 と APG5 の機能解析を生化学的手法を用いて基礎的検討を行う。さらに, ラットを用いた *in vitro* において, 摘出した歯を基盤鋳型として, オートファジー制御による再細胞化した歯髓組織の再生を観察する。

4. 研究成果

(1) ヒト骨格筋幹細胞の象牙芽細胞細胞分化誘導の評価

Hanging drop 法を施した後, レチノイン酸存在下で 3 日間浮遊培養させ, その後, ゼラチン上に細胞を播種し, BMP-4 存在下で 7 日間培養を行った結果, 神経堤細胞マーカーと象牙芽細胞分化マーカーの遺伝子およびタンパク発現が観察された。

(2) 象牙芽細胞分化誘導前後のオートファジー必須遺伝子 LC3 と APG5 の発現動態の評価

経時的に total RNA を抽出し, 象牙芽細胞分化誘導における LC3 と APG5 遺伝子とタンパク質の発現動態を RT-PCR 法を用いて検討した結果, レチノイン酸添加後に統計学的有

意な LC3 と APG5 遺伝子発現が観察された。

(3) 歯基盤鋳型の作成

8 週齢の雄性 Wister 系ラットの前歯を顎骨ごと摘出し、24 時間の脱細胞化処理が歯基盤鋳型の作成に効果的であることが明らかとなった。

(4) オートファジー関連遺伝子産物による歯髓脱細胞化歯基盤の再細胞化の検討

作製した歯基盤鋳型に骨格筋幹細胞を播種し、細胞増殖能および細胞接着能について検討した結果、統計学的有意な歯基盤鋳型に対する骨格筋幹細胞の細胞増殖能および細胞接着能が観察された。

(5) オートファジー関連遺伝子産物による再細胞化基盤（脱細胞化マトリックス）の歯髓再生能の検討

作製した再細胞化基盤（脱細胞化マトリックス）に骨格筋幹細胞を播種し、歯髓再生能について検討した結果、統計学的有意な歯髓細胞分化マーカーの発現が観察された。

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 2 件）

- ① Ozeki N, Mogi M, Hase N, Hiyama T, Yamaguchi H, Kawai R, Kondo A, Matsumoto T, Nakata K. Autophagy-related gene 5 and Wnt5 signaling pathway requires differentiation of embryonic stem into odontoblast-like cells. *Experimental Cell Research*, 査読有, 341: 92-104, 2016.
- ② Ozeki N, Hase N, Hiyama T, Yamaguchi H, Kawai R, Kondo A, Matsumoto T, Nakata K, Mogi M. Interleukin-1 β -induced autophagy-related gene 5 regulates the proliferation of embryonic stem cell-derived odontoblastic cells.

PLoS One, 査読有, 10(4): e0124542.
doi:10.1371/journal.pone.0124542

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 樋口直也, 尾関伸明, 長谷 奈央子, 檜山太希, 山口秀幸, 川合里絵, 松本 享, 茂木 眞希雄, 中田和彦. ヒト iPS 細胞の象牙芽細胞への分化誘導におけるオートファジー関連遺伝子 Atg10 と Wnt5 シグナルの関与. 日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会（第 145 回）, 2016 年 10 月 27 日, キッセイ文化ホール（長野・松本）
- ② 尾関伸明, 山口秀幸, 長谷 奈央子, 檜山太希, 川合里絵, 茂木 眞希雄, 松本 享, 中田和彦. IL-1 β 誘導オートファジー関連遺伝子 Atg5 はマウス ES 細胞由来象牙芽細胞の細胞増殖を制御する. 日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会（第 142 回）, 2015 年 6 月 25 日, 西日本総合展示場・北九州国際会議場（福岡・小倉）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 享 (Matsumoto Toru)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：10150781

(2) 研究分担者

茂木 眞希雄 (Mogi Makio)

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：00174334

(3) 研究分担者

尾関 伸明 (Ozeki Nobuaki)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：70469005