

論文内容要旨

ヒト歯嚢由来細胞の mRNA および miRNA 発現解析と
骨芽細胞分化過程での LIF 発現

日本大学松戸歯学部 顎顔面外科学講座

藤本 陽子

(指導：近藤 壽郎 教授)

要旨

歯嚢は、神経堤由来の外胚葉性間葉からなる結合組織であり、未分化間葉系幹細胞が存在し、ヒト歯嚢組織から分離した細胞 (hDFC: human dental follicle cells) は、骨芽細胞誘導培地で培養すると石灰化することが報告されている。hDFC は、各種細胞の誘導培地やスキャホールドを用いて培養すると、セメント芽細胞、歯根膜線維芽細胞、神経細胞へと分化するといわれており、骨をはじめとする組織再生医療の細胞源として注目されている。

本研究ではまず、hDFC の体性幹細胞としての性質と、骨芽細胞への分化能力および分子生物学的性質の検討を行った。対照として、代表的な体性幹細胞であるヒト骨髄由来未分化間葉系幹細胞 (hMSC: human mesenchymal stem cells from bone marrow)を用いた。

さらに、骨芽細胞分化に関与する遺伝子の検索を目的にマイクロアレイ検索を行い、骨芽細胞分化誘導過程で遺伝子発現が減少する LIF (Leukemia Inhibitory Factor) に着目した。hDFC における骨細胞分化時の経時的 LIF 遺伝子発現および、タンパク質発現変動を検討し、LIF を標的とする microRNA (miRNA) についても検討した。

本研究によって、以下の結果を得た。

1. hDFC を OIM で培養すると、Alizarin red S 染色、von Kossa 染色陽性を認めた。
2. hDFC の ALP 活性は、培養 7 日目から、GM に比べ OIM で培養した細胞で ALP 活性が有意に高かった。
3. hDFC は間葉系細胞の表層マーカーである CD13 等が発現しており、Notch1, Sca-1, SSEA-1 などの幹細胞マーカーの発現は認められたが、CD14 などの造血幹細胞マーカーの発現は認められなかった。
4. DNA マイクロアレイ解析から、hDFC では LHX8 が、hMSC では HOXA5, HOXA9, HOXA10 の発現が高いことが認められた。

5. miRNA のマイクロアレイ解析を行ったところ、hDFC で発現が高いのは 32 miRNA、hMSC で発現が高いのは 37 miRNA であった。
6. hDFC で発現が高い 32 miRNA の標的候補遺伝子のうち、実験的に標的遺伝子として実証されているのは 256 遺伝子であり、hMSC で発現が高い 37 miRNA で実験的に実証されたのは 457 遺伝子であった。
7. hDFC と hMSC 間で発現に差が認められた miRNA の標的候補遺伝子で hDFC では FOXO1 が、hMSC では HOXA の発現が高いことを認めた。
8. hDFC の DNA マイクロアレイ解析で、骨芽細胞分化過程で発現が減少する遺伝子群に LIF を認めた。
9. hDFC を OIM で培養し、0, 1, 2, 4, 7, 11 日目における LIF 遺伝子発現量を測定したところ、経時的に減少していた。
10. hDFC を OIM で培養し、LIF タンパク質量を測定したところ、培養 1 日目までは減少し、その後上昇した。
11. LIF を標的候補遺伝子とする miR-29b は hDFC 細胞分化過程で発現が減少していた。
12. miR-29b を hDFC に遺伝子導入すると LIF タンパク質量は減少した。

本研究結果から、hDFC は骨芽細胞へ分化可能であり、その能力は hMSC と同程度であると考えられた。また、マイクロアレイ解析で HOX 遺伝子の発現を認めたことより、成人組織から分離した体性幹細胞においても、生体発生時において各組織形成に関与する遺伝子の一部が発現していることが示唆された。さらに、FOXO1 や HOXA など、部位特異的な遺伝子を標的とする miRNA も高く発現していることが認められたことから、mRNA-miRNA の発現解析は、その細胞の発生や性質等を検討する上で重要と考えられた。さらに、hDFC での骨芽細胞分化過程では、LIF 遺伝子発現は経時的に減少した一方、LIF タンパク質量は培養 1 日目で減少し培養 4 日目で上昇した。これは LIF を標的とする miR-29b 発現の減少が関与している可能性が考えられた。LIF は未分化な細胞の増殖や多

能性の維持に関わるとともに、骨形成にも関与するといわれており、体性幹細胞の自己複製や骨芽細胞分化に重要な役割を担っていることが示唆された。以上より、hDFCは骨再生医療の細胞供給源となる可能性を有し、骨芽細胞分化機序研究に有用であることが示唆された。