

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)

Analysis of mRNA - microRNA expression profiles and LIF expression during osteogenic differentiation in cells from human dental follicle

FUJIMOTO Yoko

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Department of Maxillofacial Surgery

The dental follicle is an ectomesenchymal tissue that surrounds the developing tooth germ, which contains osteoblastic lineage-committed stem/progenitor cells. The aims of this study are to investigate the osteogenic differentiation capacity and the cellular and the molecular characteristics of human dental follicle cells (hDFC) for bone regeneration therapy.

Characterization as somatic stem cells in hDFC was performed by comparison with human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSC). Like hMSC, hDFC differentiate into the osteoblastic lineage. On gene expression profiling, the expression of cell markers and growth factor receptors in hDFC and hMSC were similar, whereas the expression patterns of homeobox (HOX) genes differed between hDFC and hMSC. In addition, to elucidate the molecular differences that underlie the more primitive characteristics of hDFC, we performed a comprehensive analysis of mRNA and microRNA (miRNA) expression profiles using miRNA microarray and DNA microarray. HOX genes, which were selected as miRNA targets, were genes whose mRNA expression differed between hDFC and hMSC.

Next, we examined kinetic gene expression and protein production of leukemia inhibitory factor (LIF), which was down-regulated during osteogenic differentiation by DNA microarray analysis. Gene expression was decreased in a time-dependent manner. LIF protein levels decreased until culture day 1, and then increased until day 4 in Osteogenic Induction Medium culture. These results suggest that LIF expression is regulated by miRNA. The production of LIF was significantly lower in cells transfected with miR-29b.

In conclusion, we found that hDFC are committed progenitor osteoblasts, and have therapeutic utility for the bone regeneration and in molecular studies into osteogenic differentiation.

緒言

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 (1,2)。hDFC は、スキヤホールドや各細胞の誘導培地を用いると、セメント芽細胞 (3)、歯根膜線維芽細胞 (4)、神経細胞 (5) へと分化するといわれている。また、hDFC は、ヒト骨髄由来未分化間葉系幹細胞 (hMSC: human mesenchymal stem cells from bone marrow) と比べて細胞増殖能が優れていると報告されている (6)。したがって歯嚢は、骨をはじめとする組織再生医療の細胞源としての可能性を有している。

本研究ではまず、hDFC の体性幹細胞としての性質を明らかにすることを目的とし、DNA マイクロアレイおよび microRNA (miRNA) マイクロアレイを用いて、hDFC と代表的な体性幹細胞である hMSC との間で遺伝子発現解析を行った。miRNA は、20 数塩基の内因性 non-coding RNA であり、標的とする mRNA の 3'末端非翻訳領域に結合することにより翻訳を制御し (7)、発生や分化、病態等に関与するとされている (8-10)。

次に、hDFC の骨芽細胞分化に関与する因子の検索を目的として、DNA マイクロアレイ解析を行った。骨芽細胞分化過程で発現減少した遺伝子群の中に Leukemia inhibitory factor (LIF) が存在した。LIF は糖タンパク質のサイトカインで、マウス骨髄性白血病細胞の増殖抑制や分化促進することが報告されている (11,12)。また、LIF はマウスの胚性幹細胞 (ES cells: embryonic stem cells) において未分化な細胞の増殖や多能性維持に必須の因子であり (13)、分化誘導を行っていないヒト骨髄由来間質細胞 (hBMSC: human bone marrow derived stromal cells) では高発現しているが、骨芽細胞や脂肪細胞へと分化誘導すると発現減少すると報告されている (14)。そこで、hDFC の骨芽細胞分化に LIF が関与しているか検討するために、LIF 遺伝子発現、タンパク質量を検討し、LIF を標的遺伝子とする miRNA の検討も行った。

材料および方法

1. hDFC の分離および培養

十分なインフォームドコンセントの得られた 6 名の患者から下顎埋伏智歯を抜歯し、歯冠に付着する歯嚢を採取した。歯嚢を phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄し、血液成分を取り除いた後、メスを用いて細切し、0.1 U/ml collagenase type I と 1 U/ml dispase (Roche 社製) を用いて、37°C で 1 時間酵素処理し hDFC を分離した。分離した hDFC は増殖培地 (GM: Mesenchymal stem cell growth medium, Lonza 社製) を用い、37°C, 5% CO₂ 条件下で初代および継代培養を行った。GM の組成は Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (Lonza 社製) に MSCGM SingleQuants® [10% fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin/streptomycin, Lonza 社製] を加えたものとした。培地は 3 日ごとに交換した。実験には継代数 5~6 の hDFC を使用した。

本実験は日本大学松戸歯学部倫理委員会 (認証番号: EC05-025, EC10-36) の方針に従って行った。

2. hMSC の培養

hMSC は Lonza 社から購入した。hMSC は GM を用い、37°C, 5% CO₂ 条件下で初代および継代培養を行った。培地は 3 日ごとに交換した。

3. 骨芽細胞への分化誘導

hDFC を 3.1×10^3 cells/cm² になるように播種し、24 時間後に骨芽細胞誘導培地 (OIM: Mesenchymal stem cell osteogenic induction medium, Lonza 社製) に置換した。OIM は、Osteogenic Basal Medium (Lonza 社製) に Osteogenic Single Quants™ (10% FBS, L-glutamine, penicillin/streptomycin, dexamethasone, ascorbate, β -glycerophosphate,

Lonza 社製) を加えたものを使用した。また、培地を OIM に交換した日を 0 日目、翌日を 1 日目とした。

4. Alizarin Red S 染色および von Kossa 染色

hDFC を 10% 中性ホルマリンで 30 分間固定後、1% Alizarin 溶液 (Kanto chemical 社製) で 10 分間染色を行った。

von Kossa 染色は Jaiswal らの方法 (15) に従って行った。hDFC を 10% 中性ホルマリンで 30 分間固定後、5% AgNO₃ (Kanto chemical 社製) で 10 分間染色した。暗所に 30 分放置後、精製水で水洗し、蛍光灯下に 15 分間放置した。

5. Alkaline Phosphatase 活性

Alkaline Phosphatase (ALP) 活性は StemTAG™ Alkaline Phosphatase Activity Assay Kit (Cell Biolabs 社製) を用いた。遊離した *p*-nitrophenyl 量を 415 nm で測定し、1 μmol の *p*-nitrophenol が 1 分間に遊離する力価を 1 unit とした。

6. Total RNA の抽出

hDFC, hMSC を 1×10⁶ cells / 100 mm dish で播種し、24 時間後 GM または OIM に交換した。経時的に TRIZOL Regent™ (Invitrogen) を用いて細胞を溶解し、Acid Guanidium-Phenol-Chloroform 法 (AGPC 法) により total RNA を抽出した。

7. マイクロアレイ解析

total RNA の純度および品質は、RNA 6000 Nano Gel System を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologys) で測定し、さらに Gene Chip Test 3 Chip (Affymetrix) で確認した。

DNA マイクロアレイは、Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用い、Affymetrix の通法に従い行った。すなわち、total RNA 5 µg を用いて、One-Cycle cDNA Synthesis 法にて double-stranded cDNA を作製し、GeneChip Sample Clean Up Module Kit (Affymetrix) で精製した。精製した cDNA から *in vitro* transcription で biotin-labeled cDNA を増幅させ精製し、cDNA を得た。次に、cDNA を断片化し、hybridization cocktail を作製し、array に添加し、45°C で 16 時間 hybridization を行った。hybridization 終了後、array を Fluidics station (Affymetrix) に設置し、洗浄および streptavidine phycoerythrin (SARP: Molecular Probes) を用いた染色を行った。スキャナー (Affymetrix) にて画像を取り込み、Affymetrix Microarray Suite にて蛍光強度の測定を行った。

miRNA microarray 解析には、Agilent human miRNA Rel.12.0 arrays または miRXplore™ Microarray (Milteny Biotech) を用いた。Agilent Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent) には、miRNA を含んだ total RNA を 100 ng 使用した。array は 55°C にて 20 時間 hybridization を行った。スライドは洗浄し、遠心分離を行った (3000 rpm, 室温)。スキャナー (Agilent) で画像を取り込み、Feature Extraction Software (Agilent) で蛍光強度を数値化した。miRXplore™ Microarray による測定は、Milteny Expression Service に依頼した。

データ解析には、GeneSpring 解析ソフト (Agilent Technologies) および miRXplore™ Microarray (Milteny Biotech) を用いた。

8. mRNA - miRNA 解析

miRNA の標的候補遺伝子は miRNA database の TargetScan™ を用いて検索し、Ingenuity Pathway Knowledge Base (IPA; Ingenuity® Systems) の miRNA Target Filter で標的候補遺伝子の絞り込みを行った。次に、実験的に miRNA の標的遺伝子と証明された遺伝子を GeneSpring に取り込み、DNA マイクロアレイ解析と比較検討した。

9. real time-PCR

total RNA を 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整し, GeneAmp™ RNA PCR Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を作成した. 作成した cDNA 溶液 2 μl , DyNAmo SYBR™ Green qPCR Kit (Thermo) 10 μl , 滅菌精製水 6 μl , 下流および上流 primer (20 μM) 各々 1 μl を加え, 全量 20 μl とし, PCR 溶液を作成した. PCR 溶液を DNA Engine Opticon 1 (BioRad) で 95°C, 5 分間加熱後, 94°C15 秒, 55°C30 秒, 72°C30 秒を 40 サイクル行って DNA を増幅し, サイバークリーンによる蛍光量をモニターした. コントロールとして GAPDH を用いた. 遺伝子発現量は $\Delta\Delta\text{CT}$ 法で算出した (16). プライマーは,

5'-TGCCAATGCCCTCTTTATTC- 3' (LIF forward primer);

5'-GTTGATAGCCCAGATTCTTC- 3' (LIF reverse primer);

5'-ATCACCATCTTCCAGGAG- 3' (GAPDH forward primer);

5'-ATGGACTGTGGTCATGAG- 3' (GAPDH reverse primer) を用いた.

10. LIF ELISA

hDFC を OIM で培養し, 24 時間ごとに上清をすべて採取した後, OIM を添加して培養を継続した. 採取した培養上清は測定するまで -80°C で保管した. 培養上清中の LIF タンパク質量は Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit (RayBiotech) を用いて計量した.

11. miRNA 導入

hDFC を 24 well plate に 2×10^4 cells / well で播種し, 24 時間後に培地を OIM に交換後, miRNA 導入用溶液を各 well に 100 μl を添加した. miRNA 導入用溶液は, 20 μM miRNA (miR-29b, miR-125a, miR-199-5p, または miR-199-3p) Mimic™ (Qiagen) または negative control を 0.1 μl , HyPerFect 試薬を 3 μl に, Mesenchymal Stem Cell Basal

Medium を加えて 100 μ l に調整し, 10 分間室温で放置した. Negative control は AllStars Negative Control siRNA™ (Qiagen) を用いた. 培養 72 時間後に上清を採取し, LIF 量を測定した.

12. 統計解析

統計解析は, Student's *t*-test を用いた.

結果

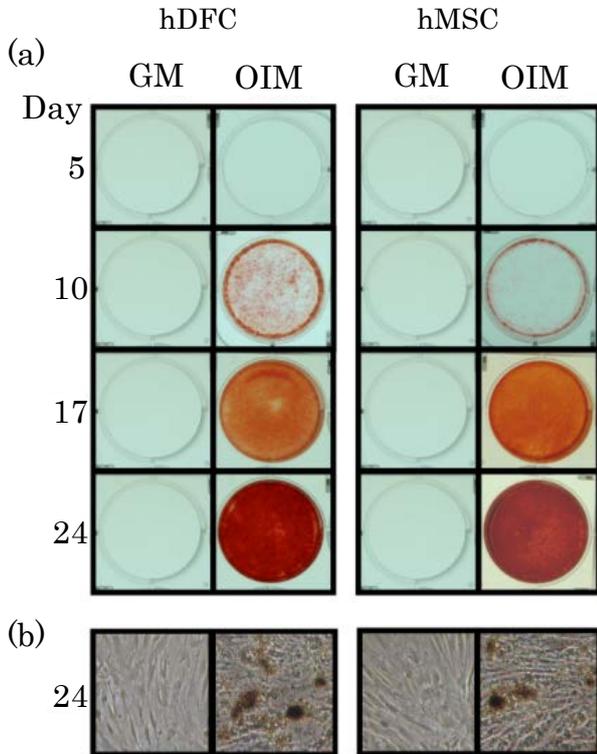
1. hDFC の性質に関する検討

(1) hDFC の骨芽細胞分化能

hDFC の骨芽細胞分化能を, Arizarin red S 染色, von Kossa 染色および ALP 活性測定により検討した. 対照として hMSC を用いた. Arizarin red S 染色において, hDFC を OIM で培養すると 10 日目で弱い染色を示し, 培養 17 日から 24 日目と日を追うごとに強く染色された. von Kossa 染色では培養 24 日目で陽性であった. 一方, GM で培養した hDFC は染色されなかった (図 1 A). Arizarin red S 染色および von Kossa 染色は hMSC と類似していた.

hDFC の ALP 活性を調べたところ, OIM および GM いずれの培養でも継時的に上昇した. また, 培養 7 日目から OIM で培養した hDFC の ALP 活性は, GM と比べ有意に高かった. 一方, OIM で培養した hMSC の ALP 活性は, 培養 12 日目がピークであり, 培養 5 日目から GM に比べ有意に高かった (図 1 B).

(A) 石灰化能



(B) ALP 活性

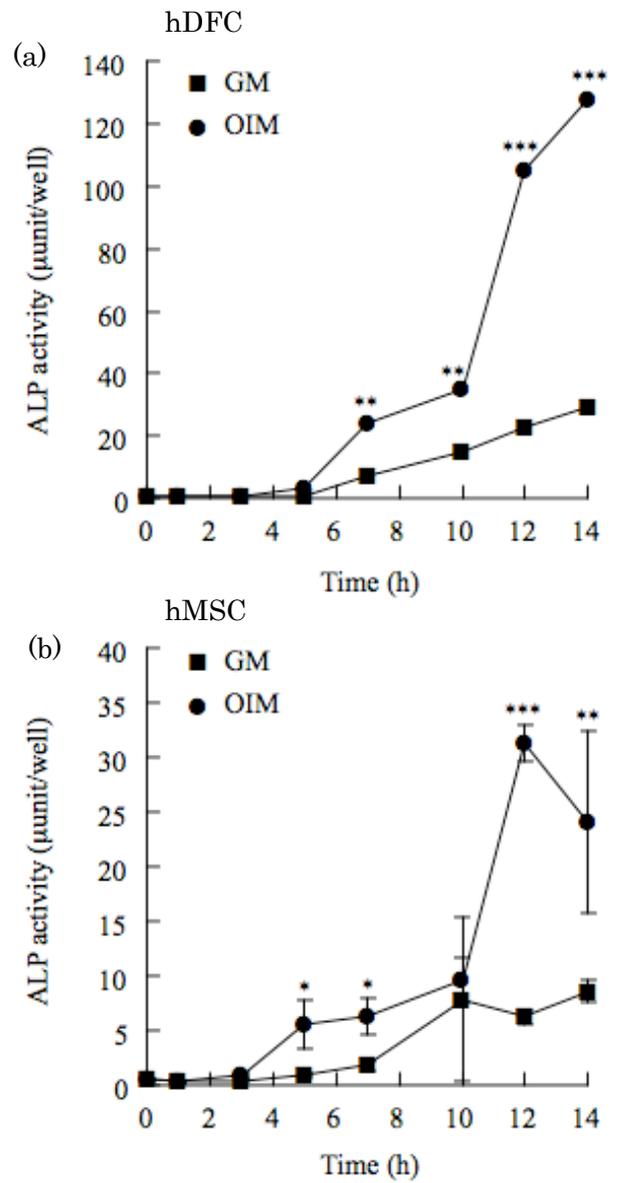


図 1 hDFC の骨芽細胞への分化能

(A) : (a) Arizarin red S 染色 (b) von Kossa 染色 (B) : ALP 活性

(a) hDFC (b) hMSC. GM : Growth Medium OIM : Osteogenic Induced Medium

hDFC : human dental follicle cells hMSC : human mesenchymal stem cells

n=3 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ vs GM.

(2) hDFC の遺伝子発現解析

hDFC に関して、体性幹細胞としての性質を明らかにするため、hDFC, hMSC の両細胞間で DNA マイクロアレイ解析を行った。hDFC および hMSC では間葉系細胞の表層マーカーである CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 の発現を認めた。造血幹細胞マーカーである CD14, CD34, CD45, CD62 および抗原提示細胞マーカーである HLA class II は、ともに発現を認めなかった。また、両細胞とも幹細胞マーカーである Notch1, Sca-1, SSEA-1 の発現を認めた。TGF- β receptor などの Growth Factor Receptor の発現は hDFC と hMSC では類似していた (表 1)。

表 1 hDFC および hMSC における細胞マーカー遺伝子発現

Common name	Genebank ID	Normalized Intensity		
		hDFC	hMSC	
Cluster of differentiation				
CD13	NM_001150	7.6	29.6	alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)
CD29	NM_133376	229.2	261.7	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
CD44	NM_000061	67.0	65.9	CD44 molecule (Indian blood group)
CD73	NM_002526	106.2	103.8	5'-nucleotidase, ecto (CD73)
CD90	AL161958	59.3	64.8	Thy-1 cell surface antigen
CD105	NM_000118	7.0	53.5	endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)
CD106	NM_001078	4.0	33.1	vascular cell adhesion molecule 1
CD14	NM_000591	absent	absent	CD14 molecule
CD31	NM_000558	absent	absent	hemoglobin, alpha 1
CD34	M81104	absent	absent	CD34 molecule
CD45	NM_002838	absent	absent	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
CD62	NM_080923	absent	absent	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)
HLA Class II				
HLA-DRA1	M60334	absent	absent	major histocompatibility complex, class II, DR alpha
HLA-DRB1	NM_002125	absent	absent	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
HLA-DQA1	BG397856	absent	absent	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
HLA-DQB1	AL583173	absent	absent	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
HLA-DPA1	A128225	absent	absent	histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
HLA-DPB1	NM_002121	absent	3.8	Transcribed locus
Stem cell markers				
Oct 4	NM_002701	absent	absent	POU domain, class 5, transcription factor 1
Nanog	NM_024865	absent	absent	Nanog homeobox
Notch1	NM_017617	2.6	2.7	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
Sca-1	NM_004346	19.8	15.2	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
UTF-1	NM_003577	absent	absent	undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
SSEA-1	M58596	2.0	3.2	M58596
Receptors				
TGFBR1	NM_004612	2.3	4.6	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa)
TGFBR2	NM_003242	1.7	3.3	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)
Flg	NM_023107	4.4	1.9	fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)
FGFR2	NM_022969	2.8	10.7	fibroblast growth factor receptor 2 isoform 2 precursor
FGFR3	M58051	absent	absent	fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)
PDGFR1	NM_002609	18.5	25.8	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
PDGFR2	NM_002606	175.3	172.3	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
Flt-1	AA058828	3.5	absent	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
CXCR4	AF348491	absent	absent	chemokine (C-X-C motif) receptor 4

Normalized intensity は Data transformation: Set measurements less than 0.01 to 0.1 および Per chip normalization: normalize to median or percentile を行い算出した。

次に、hDFC, hMSC 両細胞間で発現に差を認めた遺伝子について検討した。発現に違いのある遺伝子は Homeobox (HOX) 遺伝子群に多く認められ、LIM Homeobox 8 (LHX8) は hDFC で高く発現し、hMSC では発現していなかった。一方、HOXA5, HOXA9, HOXA10 は hMSC で発現が高く、hDFC では発現を認めなかった (表 2)。

表 2 hDFC と hMSC で細胞特異的に発現していた遺伝子

Common name	Genebank ID	Ratio	Normalized Intensity (F)		Gene Title_Affy
			hDFC	hMSC	
Up-regulation expressed genes in hDFC					
<i>LHX8</i>	BC040321	1093.4	35.04 (P)	0.03 (A)	LIMhomeobox 8
<i>ITGA8</i>	BF939224	417.0	6.68 (P)	0.02 (A)	integrin, alpha 8
<i>EPBA1L3</i>	AI770004	408.5	4.09 (P)	0.01 (A)	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3
<i>FOXF1</i>	NM_001451	372.1	23.85 (P)	0.06 (A)	forkhead box F1
<i>APCDD1</i>	N48299	306.4	41.25 (P)	0.13 (A)	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1
<i>HSPB3</i>	NM_006308	278.4	22.31 (P)	0.08 (A)	heat shock 27kDa protein 3
	N21096	267.0	4.28 (P)	0.02 (A)	syntaxin binding protein 6 (amisyn)
<i>TFAP2C</i>	NM_000591	252.6	25.10 (P)	0.10 (A)	transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)
	BC036630	249.5	8.80 (P)	0.04 (A)	CDNA clone IMAGE:5294528
<i>FLT1</i>	AA149648	214.5	8.94 (P)	0.04 (A)	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
Up-regulation expressed genes in hMSC					
<i>RSG4</i>	NM_005613	986.3	0.07 (A)	71.18 (P)	regulator of G-protein signalling 4
<i>CHI3L1</i>	M80927	584.4	0.11 (A)	64.76 (P)	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)
<i>ZNF423</i>	AW149417	528.1	0.06 (A)	29.94 (P)	zinc finger protein 423
<i>HOXA9</i>	U418131	397.9	0.06 (A)	23.59 (P)	homeo box A9
<i>HOXA5</i>	NM_019102	385.0	0.02 (A)	7.94 (P)	homeo box A5
<i>MEF5</i>	AW665892	355.6	0.40 (P)	142.96 (P)	microfibrillar associated protein 5
<i>PITX2</i>	NM_000325	333.0	0.04 (A)	14.59 (P)	paired-like homeodomain transcription factor 2
<i>NPR3</i>	NM_000908	316.9	0.12 (A)	37.57 (P)	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)
<i>EMX2</i>	AI478455	262.7	0.03 (A)	8.80 (P)	empty spiracles homolog 2 (Drosophila)
<i>HOXA10</i>	BF792917	241.5	0.07 (A)	16.18 (P)	homeo box A10

Normalized intensity は Data transformation: Set measurements less than 0.01 to 0.1 および Per chip normalization: normalize to median or percentile を行い算出した。

Ratio: hDFC normalized intensity/hMSC normalized intensity または hMSC normalized intensity/hDFC normalized intensity

(3) hDFC の miRNA 発現解析

体性幹細胞は、分離された組織に特異的な miRNA を発現していることが報告されている。そこで、hDFC および hMSC 間で miRNA 発現解析を行った。骨芽細胞等に分化誘導を行っていない hDFC と hMSC について、miRNA マイクロアレイ解析を用いて miRNA 発現を測定したところ、955 miRNA のうち、661 miRNA は hDFC, hMSC ともに発現が認められなかった。また、hDFC および hMSC 間で発現に差が認められた miRNA を検索したところ、hDFC で 2 倍以上発現が高いのは、32 miRNA, hMSC で 2 倍以上発現が高いのは 37 miRNA であった (表 3)。

表3 hMSC と hDFCとの間で発現に違いがみられたmiRNA

microRNA name	Accession No.	Fold	microRNA name	Accession No.	Fold
microRNAs more highly expressed in hMSC			microRNAs more highly expressed in hDFC		
hsa-miR-196a	MIMAT0000226	798.0	hsa-miR-20A*	MIMAT0004493	79.5
hsa-miR-224	MIMAT0000281	710.7	hsa-miR-129-3P	MIMAT0004605	75.5
hsa-miR-10b	MIMAT0000254	501.3	hsa-miR-19B-1*	MIMAT0004491	47.6
hsa-miR-196b	MIMAT0001080	420.5	Ebv-miR-MART12	MIMAT0003423	47.3
hsa-miR-150*	MIMAT0004610	183.2	hsa-miR-769-5p	MIMAT0003886	46.9
hsa-miR-143*	MIMAT0004599	154.5	hsa-miR-199b-5p	MIMAT0000263	8.03
hsa-miR-24-1*	MIMAT0000079	105.6	hsa-miR-32	MIMAT0000090	3.7
hsa-miR-340	MIMAT0004692	65.3	hsa-miR-34c-5p	MIMAT0000686	3.4
hsa-miR-193b*	MIMAT0004767	55.4	hsa-miR-1271	MIMAT0005796	3.2
hsa-miR-23b*	MIMAT0004589	40.8	hsa-miR-18b	MIMAT0001412	3.1
hsa-miR-181d	MIMAT0002821	37.9	hsa-miR-7	MIMAT0000252	3.1
hsa-miR-181c	MIMAT0000258	31.4	hsa-miR-630	MIMAT0003299	2.9
hsa-miR-1306	MIMAT0005950	31.3	hsa-miR-222*	MIMAT0004569	2.8
hsa-miR-132*	MIMAT0004594	30.9	hsa-miR-18a	MIMAT0000072	2.6
hsa-miR-664	MIMAT0005949	30.9	hsa-miR-29b	MIMAT0000100	2.5
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	30.7	hsa-miR-155	MIMAT0000646	2.5
hsa-miR-1181	MIMAT0005826	29.7	hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	2.5
hsa-miR-615-3p	MIMAT0003238	29.1	hsa-miR-1225-3p	MIMAT0005573	2.4
hsa-miR-1237	MIMAT0005592	28.5	hsa-miR-1539	MIMAT0007401	2.4
hsa-miR-377*	MIMAT0004689	19.9	hsa-miR-17*	MIMAT0000071	2.4
hsa-let-7e*	MIMAT0004485	17.5	hsa-miR-455-5p	MIMAT0003150	2.4
hsa-miR-135a*	MIMAT0004595	17.1	hsa-miR-17	MIMAT0000070	2.4
hsa-miR-629	MIMAT0004810	15.0	hsa-miR-7-1*	MIMAT0004553	2.4
hsa-miR-10a	MIMAT0000253	13.8	hsa-miR-20b	MIMAT0001413	2.3
hsa-miR-31	MIMAT0000089	7.8	hsa-miR-20a	MIMAT0000075	2.3
hsa-miR-31*	MIMAT0005404	5.7	hsa-miR-503	MIMAT0002874	2.3
hsa-miR-335	MIMAT0000765	4.6	hsa-miR-19a	MIMAT0000073	2.2
hsa-miR-138	MIMAT0000430	4.0	hsa-miR-93	MIMAT0000093	2.2
hsa-miR-497	MIMAT0002820	3.9	hsa-miR-25	MIMAT0000081	2.2
hsa-miR-143	MIMAT0000435	3.6	hsa-miR-15b*	MIMAT0004586	2.1
hsa-miR-195	MIMAT0000461	3.2	hsa-miR-130b	MIMAT0000691	2.0
hsa-miR-27b	MIMAT0000437	3.2	hsa-miR-106b	MIMAT0000680	2.0
hsa-miR-145	MIMAT0000418	2.6			
hsa-miR-23b	MIMAT0004601	2.3			
hsa-miR-145*	MIMAT0000419	2.2			
hsa-let-7i	MIMAT0000415	2.2			
hsa-miR--21	MIMAT0000076	2.2			

Fold: hMSCでの遺伝子発現量/hDFCでの遺伝子発現量またはhDFCでの遺伝子発現量/hMSCでの遺伝子発現量

miRNAは安定鎖, miRNA*は不安定鎖

(4) mRNA - miRNA 比較解析

hDFC と hMSC で発現に差が認められた miRNA の標的候補遺伝子を、データベース TargetScan™を用いて検索した。hMSC で発現が高い 37 miRNA の標的候補遺伝子は 14,280 遺伝子で、実験的に標的遺伝子と証明されているのは 457 遺伝子、標的遺伝子の確率が高いのは 6,323 遺伝子、標的遺伝子の可能性があるものは 7,500 遺伝子であった。一方 hDFC で発現が高い 32 miRNA の標的候補遺伝子は 11,172 遺伝子で、実験的に標的遺伝子と証明されているものは 256 遺伝子、標的遺伝子の確率が高いものは 5,065 遺伝子、標的遺伝子の可能性があるものは 5,851 遺伝子であった (表 4)。

表 4 hDFC と hMSC との間で発現量が認められた miRNA の標的遺伝子数

	Uploaded to IPA	Number of target genes		
		Experimentally verified	Predicted High confidence	Moderate confidence
More highly expressed in hMSC	37 microRNAs	457 genes	6,323 genes	7,500 genes
More highly expressed in hDFC	32 microRNAs	256 genes	5,065 genes	5,851 genes

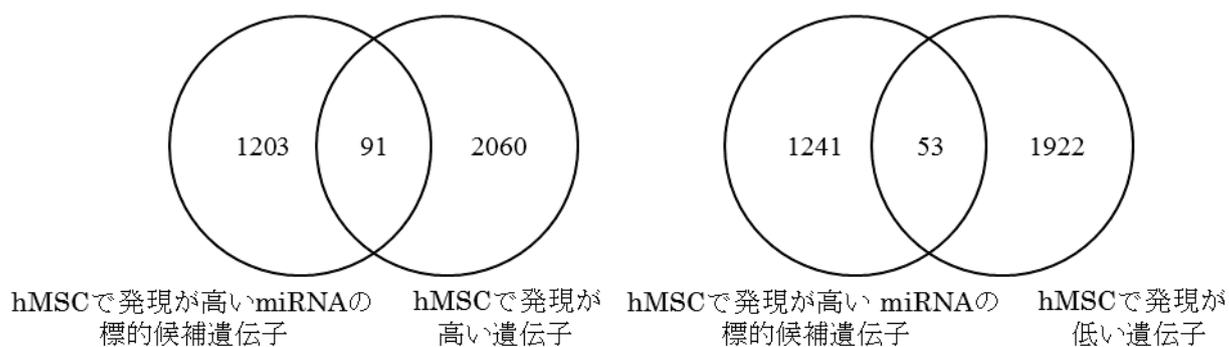
Experimentally verified: 実験的に miRNA 標的遺伝子と認められた遺伝子

High confidence: miRNA 標的遺伝子である可能性の高い遺伝子

Moderate confidence: miRNA 標的遺伝子の可能性のある遺伝子

次に、hDFC と hMSC 間で発現に差が認められた miRNA の標的候補遺伝子のうち、実験的に証明されている遺伝子について、hDFC および hMSC での発現量を DNA マイクロアレイ解析を用いて調べた。hDFC において発現が高かった miRNA の標的候補遺伝子 256 遺伝子 (Affimetrix Gene Chip は 793 プローブセット) のうち、hDFC で発現が高い標的候補遺伝子は 24 遺伝子で、発現が低い遺伝子は 56 遺伝子であった。一方、hMSC において発現が高かった miRNA の標的候補遺伝子 457 遺伝子 (Affimetrix Gene Chip は 1294 プローブセット) のうち、hMSC で発現が高い標的候補遺伝子は 91 遺伝子で、発現が低い標的候補遺伝子は 53 遺伝子であった (図 2)。

(A) hMSC で高い発現を認めたmiRNAの標的候補遺伝子



(B) hDFC で高い発現を認めたmiRNAの標的候補遺伝子

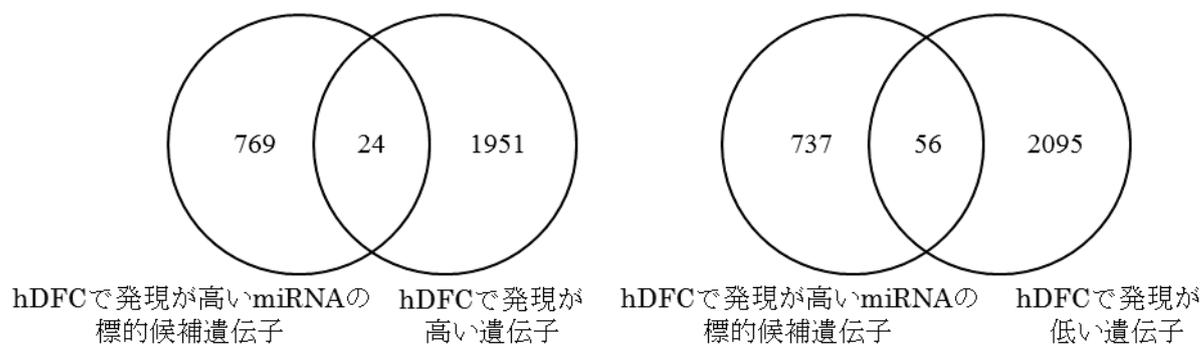


図2 miRNA 標的候補遺伝子とDNAマイクロアレイ解析との比較

また、miRNA の標的候補遺伝子について機能分類を行った。Gene Ontology Project による機能分類を行ったところ、DNA に結合する機能を有する DNA binding に分類される遺伝子が多かった (data not shown)。DNA binding に分類された遺伝子の中で、hDFC では歯の発生に関与するといわれている Forkheadbox (FOX) O1 の遺伝子発現が高く、hMSC では体軸形成に重要な HOXA1, HOXA7, HOXA11 などの HOX 遺伝子群の発現が高いことが認められた (表 5)。

表5 hDFCとhMSCとの間で発現量で差を認めたmiRNAの標的候補遺伝子

Gene symbol	Gene title	Entrez gene number
Target genes of microRNA more highly expressed in hMSC		
Genes highly expressed in hMSC		
FLI1	Friend leukemia virus integration 1	2313
GATA6	GATA binding protein 6	2627
NFIB	nuclear factor I/B	4781
HOXA1	homeobox A1	3198
HOXA11	homeobox A11	3207
HOXC8	homeobox C8	3224
NFIA	nuclear factor I/A	4774
HOXD8	homeobox D8	3234
HOXA7	homeobox A7	3204
PMS1	PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	5378
HES1	hairy and enhancer of split 1, (<i>Drosophila</i>)	3280
Genes expressed at lower level in hMSC		
SMAD4	SMAD family member 4	4089
THRB	thyroid hormone receptor, beta	7068
HMGA2	high mobility group AT-hook 2	8091
SATB2	SATB homeobox 2	23314
ESR1	estrogen receptor 1	2099
FOXO1	forkhead box O1	2308
UHRF1	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	29128
TCF21	transcription factor 21	6943
Target genes of miRNAs more highly expressed in hDFC		
Genes more highly expressed in hDFC		
ETS1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	2113
SYNE2	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2	23224
ESR1	estrogen receptor 1	2099
NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	4929
FOXO1	forkhead box O1	2308
Genes expressed at a lower level in hDFC		
TP63	tumor protein p63	8626
MEIS1	Meis homeobox 1	4211
MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B	9935
MEOX2	mesenchyme homeobox 2	4223
HOXA5	homeobox A5	3202

hDFCとhMSCとの間で発現量に差が認められたmiRNAの標的候補遺伝子のうちDNA bindingに分類された遺伝子を示す。

2. hDFC の骨芽細胞分化過程における LIF 遺伝子発現の検討

(1) LIF の遺伝子発現

hDFC の骨芽細胞分化過程で発現変動する遺伝子を検索することを目的に、DNA マイクロアレイ解析を行った。OIM または GM で培養した 3 日目および 10 日目の hDFC についてマイクロアレイ解析を行った。3 日目および 10 日目のいずれにおいても、GM で培養した時に比べ、OIM で培養した hDFC で発現が減少した遺伝子群に LIF 遺伝子が認められた。マイクロアレイ解析による LIF の遺伝子発現を図 3 に示す。GM および OIM の培養系いずれも 3 日目に比べて 10 日目で LIF 遺伝子発現は減少していた。

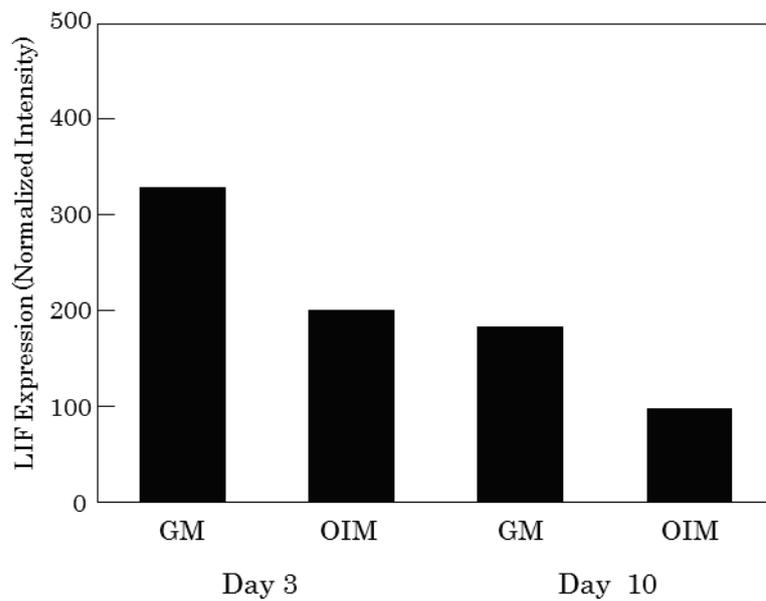


図3 DNAマイクロアレイ解析によるhDFCのLIF遺伝子発現量

次に、OIMで培養したhDFCについて、培養0,1,2,4,7,11日目のLIF遺伝子発現量を、real-time PCR法を用いて検索した。その結果、OIMにおけるLIF遺伝子発現量は培養4日目までは経時的に減少し、その後はプラトーであった(図4)。

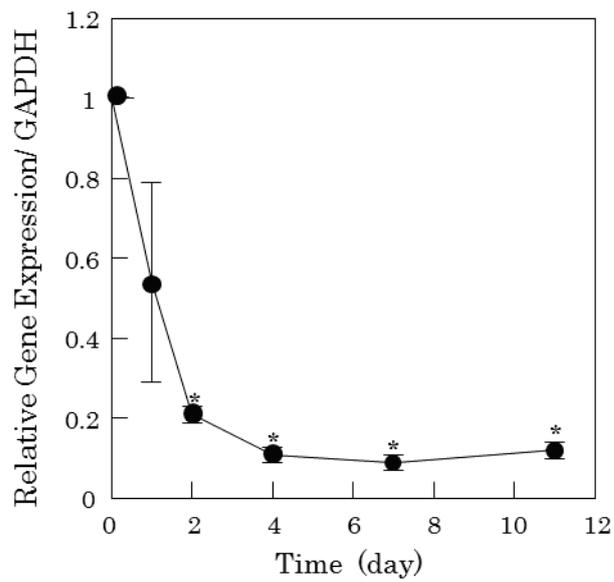


図4 hDFCのLIF経時的遺伝子発現
hDFCはOIMで11日間培養を行った。
* $p < 0.005$ vs 培養0日目

(2) LIF のタンパク質量

OIM で培養した hDFC の LIF タンパク質量を測定した. 図 5 は hDFC 培養上清中の LIF タンパク質量を示す. LIF タンパク質量は培養 0 日目では高い値を示したが, 培養 1 日目では低下した. また, 培養 4 日目までは LIF タンパク質量は上昇したが, 培養 5 日目では低下を認めた.

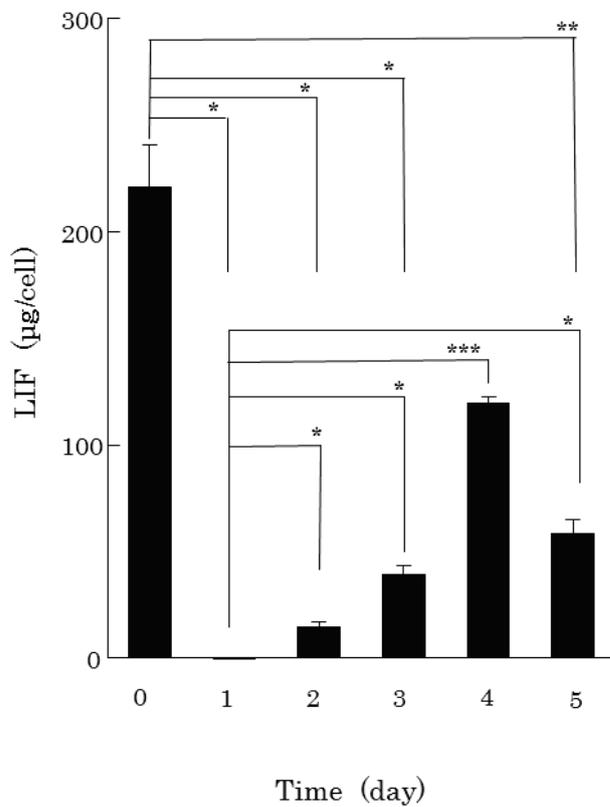


図5 hDFCのLIFタンパク質量の推移
hDFCをOIMで培養を行った上清中のLIF濃度を示す.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs day 0
* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ vs day 1

(3) LIF 発現における miRNA の影響

OIM で培養した hDFC において、LIF 遺伝子発現量は培養 11 日目までは減少した一方で、LIF のタンパク質量は培養 2 日目から 4 日目において増加していた。この結果から、LIF タンパク質量には、転写後に何らかの調節機構が働いていると考えられた。miRNA は翻訳を制御していることが報告されている。そこで、LIF タンパク質産生は miRNA による影響を受けているのではないかと考えた。miRNA データベースの TargetScan™ を用いて、LIF を標的とする miRNA を検索した。さらに、miRNA マイクロアレイ解析から、OIM 培養 1 日目に対し、培養 5 日目の hDFC で発現が減少していた miRNA を調べた。LIF を標的遺伝子とし、マイクロアレイ解析で培養 5 日目に発現減少するのは、miR-29b, miR-125a, miR-199-5p, miR-199-3p, の 4 つの miRNA であった (表 6)。

表 6 hDFC における miRNA 遺伝子発現量

miRNA	expression ratio* (day 5/day 1)
miR-199a-5p	0.692
miR-199a-3p	0.656
miR-125a	0.600
miR-29b	0.647

* : 培養 5 日目の遺伝子発現量/培養 1 日目の遺伝子発現量

次に、この4つの miRNA を hDFC へ導入し、LIF タンパク質量を測定し、その阻害率を算出した。その結果、miR-29b によって有意に LIF タンパク質量が減少した (図 6)。

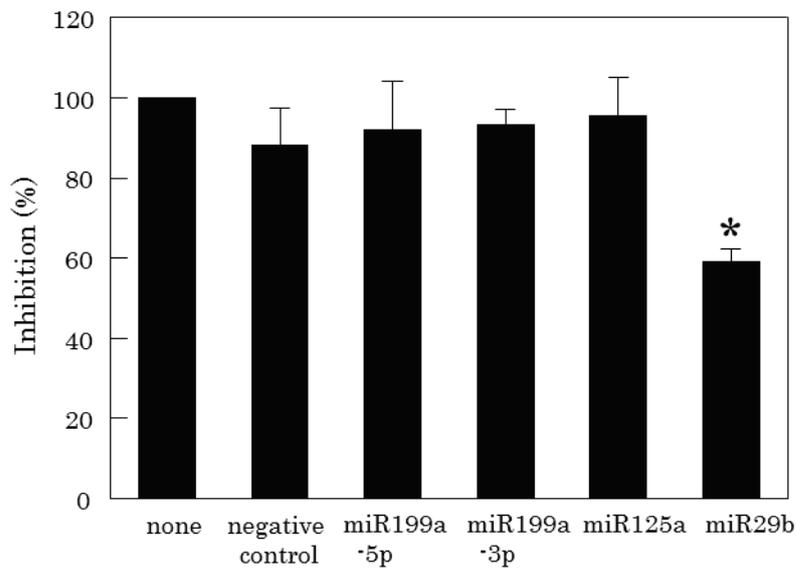


図6 遺伝子導入時のLIFタンパク質量
Inhibition: miRNA導入時LIFタンパク質量 / noneのLIFタンパク質量
× 100
*p<0.05 vs none

考察

本研究で用いた hDFC は OIM で培養すると、石灰化し (図 1A), ALP 活性の上昇を認めた (図 1B). 以前の報告でも, hDFC を OIM で培養すると石灰化することは報告されている (1,2). ラットやマウス由来の歯嚢細胞も OIM で培養すると石灰化し, その過程では ALP 活性が上昇すると報告されている (17). さらに, hDFC は脂肪細胞や神経細胞へ分化することは報告されている (2,5).

本研究で用いた hDFC は Notch1, Sca-1 などの幹細胞マーカーや, CD29 や CD44 などの間葉系細胞マーカーの発現を認めたが, CD14 等の造血幹細胞マーカーや, HLA class II などの抗原提示細胞マーカーの発現は認めず過去の報告と一致し (1,3), hMSC に類似の間葉系幹細胞が存在すると考えられた.

本研究では, hDFC および hMSC の両細胞間で mRNA-miRNA 比較発現解析を行った. hMSC で発現が高かった miRNA は 37 遺伝子, hDFC で発現が高かった miRNA は 32 遺伝子であった. これらの miRNA が標的とする候補遺伝子を検索したところ, hDFC では FOXO1 遺伝子, hMSC では HOXA 遺伝子群が標的候補遺伝子としてあがった. HOX 遺伝子群は発生時の体幹形成に重要な因子とされており (18), DNA マイクロアレイ解析から, hMSC では HOXA 遺伝子群の発現が高いことを認めている (表 2). 一方, hDFC で miRNA の標的遺伝子として候補に挙げられた FOXO1 は歯胚形成に関与するとの報告がある (19). また, DNA マイクロアレイ解析において hDFC で遺伝子発現が高かった LHX8 は, 上顎骨などの口腔領域発生部位で発現が高いと報告されている (20). よって, hDFC は歯胚や口腔領域の臓器形成に関与する細胞に類似の形質発現性を有することが示唆された.

次に, hDFC の骨芽細胞分化に関与する遺伝子の検索を目的に, DNA マイクロアレイ解析を行ったところ, 骨芽細胞分化誘導時に発現低下する遺伝子群の中に LIF が認められた (図 3). LIF は未分化な細胞の増殖や多能性の維持に関与していると考えられており, マウス ES 細胞では, LIF による STAT3 の活性化が多能性を有する細胞の増殖に必要であるこ

と (13), LIF-STAT3 シグナルは多能性や未分化性の維持に重要な Kruppel-like Factor 4 や Nanog 発現を上昇させることが報告されている (21). 一方, ヒトの ES 細胞では LIF は必須ではないものの多能性の維持に関与しており, STAT3 を介さないといわれている (22). また, hBMSC では分離培養早期の細胞では LIF 発現は高く, passage doubling を繰り返したり, 骨芽細胞および脂肪細胞へ分化誘導することで LIF 発現は減少することが報告されている (14). よって, hBMSC と同様に hDFC でも, 未分化な時期において LIF の発現は高く, 骨芽細胞への分化が始まる時期では LIF の発現が減少することが示唆された.

hDFC の骨芽細胞分化過程での LIF のタンパク質量について測定したところ, GM で培養した 0 日目の LIF タンパク質量は高い値を示し, OIM に交換後の培養 1 日目では低下した (図 5). しかし, 培養 4 日目まで LIF タンパク質量は増加した. LIF 遺伝子発現は経時的に減少しているにもかかわらず, LIF タンパク質量は上昇した. これは, miRNA が mRNA 転写後のレベルで遺伝子発現を抑制するからではないかと考えた. miRNA は相補性を有する mRNA の 3' 末端非翻訳領域に結合することにより翻訳を抑制しているといわれている (7-10). これまでに hBMSC では, miR-199a-5p と miR-346 が LIF を標的にしていると報告されている (23). また, 肝細胞癌では miR-637 が LIF を標的にしているとの報告もある (24). われわれは, hDFC 骨芽細胞分化過程での LIF タンパク質量上昇は, LIF を標的にする miRNA が発現低下していることによると推定し, miRNA のデータベースで LIF を標的候補遺伝子とする miRNA のうち, hDFC 培養 1 日目に比べ培養 5 日目で発現が低下している miRNA (miR-199a-5p, miR-199a-3p, miR-125, miR-29b) を hDFC に遺伝子導入し, LIF タンパク質量を測定した. 結果としては, miR-29b 導入により LIF タンパク質量の低下がみられた (図 6). LIF の遺伝子発現が減少しているにもかかわらず, LIF タンパク質量が上昇したのは, LIF を標的とした miR-29b の減少が一因をなすと考えられた. さらに, miR-29b はタイプ I コラーゲン $\alpha 1$ および $\alpha 2$ (25) やオステオネクチン (26) を標的にしていることも報告されており, miR-29b の発現減少は石灰化や骨芽細胞分化に関連すること

が示唆された。一方、BMSCにおいてLIFを標的にしているとされるmiR-199a-5pやmiR-195-3p, miR-125をhDFCに導入しても、LIFタンパク質量の減少を認めなかったのは、miRNAの作用が細胞種により異なるからではないかと考えた。最近の報告で、mRNAの3'末端非翻訳領域にはmiRNAの他にも様々なタンパク質が結合し、翻訳を制御していること(27)、RNAタンパク質とmiRNAは競合する(28)などから、細胞種によるmiRNAの影響の違いにはRNA結合タンパク質が関与している可能性が考えられた。

LIFノックアウトマウスでは、長管骨の短縮や海綿骨の異常、骨芽細胞の減少がみられる骨欠損モデルにLIFを投与すると、骨修復が促進したとの報告もある(29)。また、LIFはマウスES細胞のPPAR γ 発現を低下させ、脂肪細胞ではなく、骨芽細胞分化促進へ関与すると報告されており(30)、LIFの骨形成への関与が示唆されている。一方、ヒト歯髄細胞の培養系にLIFを作用させると石灰化が抑制されることが報告されている(31)。またALP活性については、MC3T3-E1にLIFを作用させるとALP活性を抑制するという報告がある(32)一方で、マウスES細胞にLIFを作用させるとALP活性は上昇するとの報告もある(33)。LIFは細胞種や細胞分化ステージの違いによって作用が異なるのかもしれない。さらに、hMSC由来のLIFは破骨細胞の形成にも重要な働きを担っていると報告されており(34-36)、LIFは骨形成、骨吸収において重要な役割を担っていると示唆された。

本研究では、hDFCには、未分化間葉系幹細胞が存在し、骨芽細胞への分化能を有することを確認した。また、hDFCの骨芽細胞分化過程でLIF遺伝子発現は経時的に減少するが、LIFタンパク質量は培養4日目に上昇すること、これには、LIFを標的としうるmiR-29b発現の減少が関与している可能性を示唆した。

結語

本研究では、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 hMSC を用いた。さらに、hDFC における骨細胞分化時の LIF 遺伝子発現および、タンパク質発現の経時的な変動を検討し、LIF を制御していると思われる miRNA を検索し、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。

本研究では、hDFC は、骨芽細胞への分化能を有し、間葉系細胞マーカーを発現することを確認した。また、hDFC では歯の発生に重要な FOXO1 が、hMSC では体軸形成に重要な HOXA1 遺伝子の発現が高いことが認められた。さらに、hDFC の骨芽細胞分化過程で LIF 遺伝子発現が経時的に減少し、LIF タンパク質量が培養 4 日目に上昇するのは、LIF を標的としうる miR-29b の減少が関与していると考えられた。以上より、hDFC は骨再生医療の細胞供給源の 1 つとなりうると同時に、骨芽細胞分化機序研究に有用であることが示唆された。

本論文は、参考文献 1 「Gene expression and protein production of leukemia inhibitory factor in human dental follicle cells」(International Journal of Oral-Medical Science 11:156-162,2012)、参考文献 2 「Characteristics and osteogenic differentiation of stem/progenitor cells in the human dental follicle analyzed by gene expression profiling」(Cell Tissue Research 350:317-331,2012)、および参考文献 3 「Comparative analysis of microRNA-mRNA expression profiles of mesenchymal stem cells and dental follicle cells」(International Journal of Oral-Medical Science 11:13-21,2012) をまとめたものである。

引用文献

- 1) Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH: Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*, 24: 155-165, 2005.
- 2) Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE: Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res*, 87: 767-771, 2008.
- 3) Yagyuu T, Ikeda E, Ohgushi H, Tadokoro M, Hirose M, Maeda M, Inagake K, Kirita T: Hard tissue-forming potential of stem/progenitor cells in human dental follicle and dental papilla. *Arch Oral Biol*, 55: 68-76, 2010.
- 4) Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, Tsubakimoto T, Harada H, Eto K, Noguchi T, Teranaka T: Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res*, 327: 301-311, 2007.
- 5) Völlner F, Ernst W, Driemel O, Morsczeck C: A two-step strategy for neuronal differentiation in vitro of human dental follicle cells. *Differentiation*, 77: 433-441, 2009.
- 6) Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S: In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology*, 101:121-132, 2013.
- 7) Lewis BP, Shih I-h, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB: Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115: 787-798, 2003.
- 8) Ebert MS, Sharp PA: Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*, 149: 515-524, 2012.
- 9) Gao J, Yang T, Han J, Yan K, Qiu X, Zhou Y, Fan Q, Ma B: MicroRNA expression during osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow. *J Cell Biochem*, 112: 1844-1856, 2011.

- 10) Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF: A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature*, 481: 190-194, 2011.
- 11) Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M: Characterization of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic cells purified from conditioned medium of mouse Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Lett*, 178: 291-296, 1984.
- 12) Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A, Metcalf D: Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J*, 6: 3995-4002, 1987.
- 13) Boeuf H, Hauss C, Graeve FD, Baran N, Kedinger C: Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J Cell Biol*, 138: 1207-1217, 1997.
- 14) Whitney MJ, Lee A, Ylostalo J, Zeitouni S, Tucker A, Gregory CA: Leukemia inhibitory factor secretion is a predictor and indicator of early progenitor status in adult bone marrow stromal cells. *Tissue Eng, Part A*-15: 33-44, 2009.
- 15) Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AL, Bruder SP: Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, 64: 295-312, 1997.
- 16) Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402-408, 2001.
- 17) Aonuma H, Ogura N, Kamino Y, Ito K, Kondoh T: Microarray analysis of human dental follicle cells in osteogenic differentiation - Gene expression of IGF-II and IGFBP-2 during osteogenic differentiation. *J Hard Tissue Biol*, 18: 27-34, 2009.
- 18) McGlenn E, Yekta S, Mansfield JH, Soutschek J, Bartel DP, Tabin CJ: *In ovo* application of antagomiRs indicates a role for miR-196 in patterning the chick axial

- skeleton through Hox gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 18610-18615, 2009.
- 19) Poché RA, Sharma R, Garcia MD, Wada AM, Nolte MJ, Udan RS, Paik J-H, DePinho RA, Bartlett JD, Dickinson ME: Transcription factor FoxO1 is essential for enamel biomineralization. *PLoS One*, 7: e30357, 2012.
- 20) Inoue M, Kawakami M, Tatsumi K, Manabe T, Makinodan M, Matsuyoshi H, Kirita T, Wanaka A: Expression and regulation of the LIM homeodomain gene L3/Lhx8 suggests a role in upper lip development of the chick embryo. *Anat Embryol*, 211: 247-253, 2006.
- 21) Zhang P, Andrianakos R, Yang Y, Liu C, Lu W: Kruppel-like Factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *J Biol Chem*, 285: 9180-9189, 2010.
- 22) Humphrey RK, Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, King CC, Firpo MT, Rose-John S, Hayek A: Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem Cells*, 22: 522-530, 2004.
- 23) Oskowitz AZ, Lu J, Penforinis P, Ylostalo J, McBride J, Flemington EK, Prockop DJ, Pochampally R: Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: Regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 18372-18377, 2008.
- 24) Zhang J-F, He M-L, Fu W-M, Wang H, Chen L-Z, Zhu X, Chen Y, Xie D, Lai P, Chen G, Lu G, Lin MCM, Kung H-F: Primate-specific microRNA-637 inhibits tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by disrupting signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Hepatology*, 54: 2137-2148, 2011.

- 25) Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N: Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochem Biophys Res Commun*, 412: 74-79, 2011.
- 26) Luna C, Li G, Qiu J, Epstein DL, Gonzalez P: Role of miR-29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress. *Mol Vis*, 15: 2488-2497, 2009.
- 27) D'Ambrogio A, Nagaoka K, Richter JD: Translational control of cell growth and malignancy by the CPEBs. *Nat Rev Cancer*, 13: 283-290, 2013.
- 28) Srikantan S, Tominaga K, Gorospe M: Functional interplay between RNA-binding protein HuR and microRNAs. *Curr Protein Pept Sci*, 13: 372-379, 2012.
- 29) Dazai S, Akita S, Hirano A, Rashid MA, Naito S, Akino K, Fujii T: Leukemia inhibitory factor enhances bone formation in calvarial bone defect. *J Craniofac Surg*, 11: 513-520, 2000.
- 30) Poulton IJ, McGregor NE, Pompolo S, Walker EC, Sims NA: Contrasting roles of leukemia inhibitory factor in murine bone development and remodeling involve region-specific changes in vascularization. *J Bone Miner Res*, 27: 586-595, 2012.
- 31) Zhou Y, Qian M, Liang Y, Liu Y, Yang X, Jiang T, Wang Y: Effects of leukemia inhibitory factor on proliferation and odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*, 37: 819-824, 2011.
- 32) Noda M, Vogel RL, Hasson DM, Rodan GA: Leukemia inhibitory factor suppresses proliferation, alkaline phosphatase activity, and type I collagen messenger ribonucleic acid level and enhances osteopontin mRNA level in murine osteoblast-like (MC3T3E1) cells. *Endocrinology*, 127: 185-190, 1990.
- 33) Zandstra PW, Le H-V, Daley GQ, Griffith LG, Lauffenburger DA: Leukemia inhibitory factor (LIF) concentration modulates embryonic stem cell self-renewal

and differentiation independently of proliferation. *Biotechnol Bioeng*, 69: 607-617, 2000.

- 34) Mbalaviele G, Jaiswal N, Meng A, Cheng L, Bos CVD, Thiede M: Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34⁺ bone marrow hematopoietic progenitors. *Endocrinology*, 140: 3736-3743, 1999.
- 35) Richards CD, Langdon C, Deschamps P, Pennica D, Shaughnessy SG: Stimulation of osteoclast differentiation in vitro by mouse oncostatin M, leukaemia inhibitory factor, cardiotrophin-1 and interleukin, 6: Synergy with dexamethasone. *Cytokine*, 12: 613-621, 2000.
- 36) Bozec A, Bakiri L, Hoebertz A, Eferl R, Schilling AF, Komnenovic V, Scheuch H, Priemel M, Stewart CL, Amling M, Wagner EF: Osteoclast size is controlled by Fra-2 through LIF/LIF-receptor signalling and hypoxia. *Nature*, 454: 221-225, 2008.