

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01836

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞の多分化能を応用した再生血管の耐圧・耐久化と骨髄脂肪変性の予防

研究課題名(英文) Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) suppresses high  $Ca^{2+}$ -enhanced adipogenesis in bone marrow stromal cells

研究代表者

加藤 洋一 (Katoh, Youichi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：00231259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高濃度の細胞外カルシウム ( $[Ca^{2+}]_o$ ) が特異的に骨髄脂肪化をもたらすメカニズムの同定を試みた。その結果、プロテインキナーゼC (PKC) を介したシグナル伝達経路が骨髄脂肪化に関与することを突きとめ、PKC の活性化薬であるホルボールエステルPMAがCaイオンの骨髄脂肪化促進作用を抑制することを報告、さらに、グラム陰性菌の構成成分であるリポ多糖 (LPS) が、JAK/STATシグナル伝達経路を活性化し、酸化LDLの取込みに必要なスカベンジャー受容体CD204およびCD36をマウス骨髄由来マクロファージの細胞膜上に増大させることによって、動脈硬化を増悪させることを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄脂肪化は特に高齢者の骨折や貧血の一因であり、治療標的として注目されている。本研究では、高濃度の細胞外カルシウム ( $[Ca^{2+}]_o$ ) が特異的に骨髄脂肪化をもたらすメカニズムの同定を試みた。プロテインキナーゼC (PKC) を介したシグナル伝達経路が骨髄脂肪化に重要であることを突きとめ、PKC の活性化薬であるホルボールエステルPMAがCaイオンの骨髄脂肪化促進作用を抑制することを報告した (Hashimoto-R, Katoh-Y et al. J Physiol Sci 69: 741-748, 2019)。PKC の活性化薬が、高齢者の病的骨折減少への新たな治療戦略として期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that increased extracellular and intracellular  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_o$  &  $[Ca^{2+}]_i$ ) lead to adipocyte accumulation in bone marrow stromal cells (BMSCs). In the present study, we examined the effects of the diacylglycerol analog phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on proliferation and adipogenesis of mouse primary BMSCs. PMA suppressed the expression of both C/EBP $\alpha$  and PPAR $\alpha$  under normal adipogenesis, adipogenesis +  $CaCl_2$ , and adipogenesis + ionomycin conditions. PMA enhanced proliferation under normal adipogenesis conditions but suppressed proliferation under adipogenesis +  $CaCl_2$  and adipogenesis + ionomycin conditions. PMA did not affect the accumulation of adipocytes under normal adipogenesis conditions but suppressed adipocyte accumulation under adipogenesis +  $CaCl_2$  and adipogenesis + ionomycin conditions. These results suggest that the PMA-dependent pathway is an important signaling pathway to suppress high  $Ca^{2+}$ -enhanced adipocyte accumulation.

研究分野：動脈硬化、血管再生

キーワード：骨髄脂肪変性 動脈硬化 再生血管 カルシウムイオン 骨髄間質細胞 間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患に対する冠動脈バイパス術や、血液透析患者のアクセスサイトに対する必要性から、動脈圧に耐える再生血管が待ち望まれている。線維芽細胞を cell source として作製した再生血管では elastin や collagen 産生の不足から動脈瘤が形成されることが報告されており、分化誘導した平滑筋細胞を用いることの優位性が提唱されている。骨髄幹細胞から平滑筋細胞を分化誘導する際には、脂肪細胞への分化を抑制し、より効率よく平滑筋細胞への分化を促進させる必要がある。さらに、骨髄幹細胞から脂肪細胞への分化メカニズムの解明とその制御が可能となれば、骨髄間質の脂肪細胞置換が特に高齢者の病的骨折発症に重要であることに鑑み、間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化を抑制して骨の脆弱化防止に資することが期待された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、I. 先行研究で確立した cell-sorting 法を用いて、骨髄間質由来の間葉系幹細胞から平滑筋細胞を分化誘導し、動脈圧に耐え得る再生血管を作製すること、II. 骨髄間質の脂肪細胞置換が特に高齢者の病的骨折発症に重要であることに鑑み、間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化を抑制して骨の脆弱化を防止すること、及び III. 同メカニズムを利用して再生血管の石灰化による変性を防止し、臨床応用を目指すことである。

## 3. 研究の方法

本計画に先立ち、ラット大動脈平滑筋細胞は増殖期に T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルの発現が優位であること (Kuga-T et al, Circ Res 1996) の報告に対し、申請者らはマウス骨髄由来平滑筋細胞においても T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル電流が認められることを報告し (Hashimoto, Katoh et al, Ann Vasc Dis 2010)、さらにラット平滑筋細胞の場合とは異なって T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬 (mibefradil) 処理により、骨髄由来平滑筋細胞数が増加する結果を得ている。(平成 28 年度)

I. (A) 骨髄由来平滑筋前駆細胞の単離および平滑筋細胞分化誘導 ヒト腸骨より骨髄穿刺により骨髄間質細胞を単離し、平滑筋細胞特異的に発現するヒト SM22 遺伝子のプロモーターを GFP に連結した construct を transfection する (Kashiwakura, Katoh et al, Circulation 2003; Hashimoto, Katoh et al, J Stem Cell Res Ther 2015)。GFP 陽性細胞である骨髄由来平滑筋前駆細胞をフローサイトメトリーで分離後に培養、この骨髄由来平滑筋前駆細胞に T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬を作用させることにより大容量の平滑筋細胞の分化誘導を行う。(B) 動脈圧に耐え得る再生血管の構築 ヒト腸骨骨髄穿刺により骨髄単核球を分離、骨髄単核球を培養し、L-ラクチドと  $\epsilon$ -カプロラクトンから成る共重合体フィルムを PGA 不織布で強化した吸収性の合成人工硬膜である "SEAMDURA" に一層性に播種・培養する。Rolling により管状化した後、上記 I. (A) で分化誘導した大容量の平滑筋細胞を同様の方法で播種・培養した層を外装し( )、血液透析患者のブラッドアクセスサイトとしての動脈圧に耐え得る再生血管を構築を目指す。

(平成 29 年度) II. (A) 高濃度の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> が脂肪細胞数を増加させるかを、「骨髄、内臓脂肪および皮下脂肪」由来の間葉系幹細胞を用いて比較検討する。(A)-1「骨髄、内臓脂肪、皮下脂肪」からの間葉系幹細胞の単離; 骨髄からの間葉系幹細胞の単離に加え、内臓脂肪および皮下

脂肪からは酵素法を用いて、各々の間葉系幹細胞単離を行う。(A)-2 各間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化に必要な誘導因子; 脂肪細胞の分化誘導因子として isobutyl-methylxanthine(IBMx)、インスリン、デキサメタゾンが知られている。「内臓脂肪、皮下脂肪」由来のそれぞれの間葉系幹細胞について分化誘導に必要な因子を明らかにする。(A)-3 間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化過程における $[Ca^{2+}]_o$ の作用; 「骨髄、内臓脂肪、皮下脂肪」由来間葉系幹細胞をそれぞれ(A)-2で明らかにした条件下で、 $[Ca^{2+}]_o$ 濃度別に培養する。オイルレッドO法を用いて脂肪細胞数と細胞質内脂肪量、GPO-DAOS法にて細胞外分泌(培養液中)トリグリセライド量を測定し、総合的な脂肪化を定量する。(B)脂肪細胞数増加のメカニズムとして、間葉系幹細胞の増殖促進、間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化促進、分化した脂肪細胞の増殖促進など、 $[Ca^{2+}]_o$ がどのように関与しているかを検証する。(B)-1 間葉系幹細胞および分化脂肪細胞の増殖に対する $[Ca^{2+}]_o$ の作用;  $[Ca^{2+}]_o$ が間葉系幹細胞、分化した脂肪細胞の増殖を促進するかどうかを、PIを用いた細胞周期解析、BrdUを用いた増殖中の細胞数定量、MTTアッセイを用いた全細胞数の定量を行い評価する。(B)-2 脂肪細胞分化の定量法; 脂肪細胞分化マーカーとしてPPARやC/EBPを用いる。マウスの内臓脂肪・皮下脂肪を用いてRT-PCR法およびウエスタンブロット法を用いて定量する。(B)-3 間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化に対する $[Ca^{2+}]_o$ の作用;  $[Ca^{2+}]_o$ が間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を促進するかどうかを、(B)-2の方法を用いて検討する。

(平成30年度)(C)細胞外カルシウム $[Ca^{2+}]_o$ は、受容体を刺激するほか、チャネルから細胞内に流入しセカンドメッセンジャーとしてシグナルを伝達する。 $[Ca^{2+}]_o$ が脂肪細胞数を増加させるシグナル伝達経路を同定する。(C)-1  $[Ca^{2+}]_o$ 濃度の変化に伴う細胞内カルシウムイオン濃度( $[Ca^{2+}]_i$ )の変化; Calcium Imaging(Fura-2法)を用いて、 $[Ca^{2+}]_o$ を変化させた時に $[Ca^{2+}]_i$ がどのように変化するかを検証する。(C)-2 カルシウム受容体、カルシウムチャネルの発現; (B)にて明らかにした細胞について、CaSR、L型Caチャネル、T型Caチャネル、transient receptor potential(TRP)チャネルなどのmRNA発現をRT-PCR法にて確認する。(C)-3 刺激薬、阻害薬、ブロッキング抗体を用いたシグナル伝達経路の検討; (C)-2で認められた標的の刺激薬が $[Ca^{2+}]_o$ と同様に脂肪細胞数を増加させるかを検討する。また、阻害薬が高濃度 $[Ca^{2+}]_o$ のもと脂肪細胞数増加を抑制するかを検討する。CaSRの刺激薬として $Mg^{2+}$ 、阻害薬としてNPS 2143を用いる。L型Caチャネルの阻害薬としてニフェジピン、T型Caチャネルの阻害薬としてmibefradil、TRPチャネルの阻害薬としてYM-58483を用いる。阻害薬の非特異的応答を除外するためにそれぞれのブロッキング抗体も用いて検討する。(D)(C)で明らかにしたシグナル伝達経路の阻害で、骨髄脂肪化が抑制できるかをin vivoで検証する。(D)-1 in vivoにおける脂肪化の定量; 内臓脂肪および皮下脂肪それぞれの重量と比較する。(D)-2 シグナル伝達経路の阻害が骨髄脂肪化を抑制するかどうか; 骨髄脂肪化マウスとして、加齢マウス、肥満マウスを用いる。(C)にて明らかにしたシグナル伝達の阻害薬を投与することで、骨髄脂肪化を抑制できるか検証する。III.(C)で明らかにしたシグナル伝達経路活性化で、骨芽細胞分化を抑制し、再生血管石灰化を防止できるか検証する。

#### 4. 研究成果

2016年度は、骨髄間質由来の間葉系幹細胞から平滑筋細胞を分化誘導し動脈圧に耐え得る再生血管を作製するために、骨髄由来平滑筋前駆細胞の単離および平滑筋細胞分化誘導を行い、大量の平滑筋細胞を得ることを目指した。まず、ヒト腸骨より骨髄穿刺により単離した骨髄間質

細胞に、平滑筋細胞特異的に発現するヒト SM22 遺伝子のプロモーターを GFP に連結した construct(Kashiwakura, Katoh et al, Circulation 2003; Hashimoto, Katoh et al, J Stem Cell Res Ther 2015)を transfection した。GFP 陽性細胞である骨髄由来平滑筋前駆細胞をフローサイトメトリーで分離した後に培養を行った。先行研究で得られたように、T 型  $Ca^{2+}$ チャネル阻害薬(mibefradil)処理により、骨髄由来平滑筋細胞数が増加する結果に基づき、分離培養した骨髄由来平滑筋前駆細胞に T 型  $Ca^{2+}$ チャネル阻害薬である mibefradil を作用させることにより大容量の平滑筋細胞の分化誘導を行った。

2017 年度は、(A) 高濃度の  $[Ca^{2+}]_o$  が脂肪細胞数への影響を「骨髄、内臓脂肪および皮下脂肪」由来の間葉系幹細胞を用いて比較検討した。間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化過程における細胞外カルシウムイオン濃度  $[Ca^{2+}]_o$  の作用; 「骨髄、内臓脂肪、皮下脂肪」由来間葉系幹細胞をそれぞれ複数の  $[Ca^{2+}]_o$  (1.8 mM 10.8 mM) を用いて培養。オイルレッド O 法を用いて脂肪細胞数と細胞質内脂肪量、GPO-DAOS 法にて細胞外分泌(培養液中) TG 量を測定し、総体的な脂肪化を定量した。(B) 脂肪細胞数増加のメカニズムとして、間葉系幹細胞の増殖促進、間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化促進、分化した脂肪細胞の増殖促進など、 $[Ca^{2+}]_o$  がどのように関与しているかを検証。(B)-1 間葉系幹細胞および分化脂肪細胞の増殖に対する  $[Ca^{2+}]_o$  の作用; 脂肪細胞分化マーカーとして PPAR や C/EBP を用いた。マウスの内臓脂肪・皮下脂肪を用いて RT-PCR 法およびウェスタンブロット法を用いて定量。(B)-2 間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化に対する  $[Ca^{2+}]_o$  の作用;  $[Ca^{2+}]_o$  が間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を促進するかどうかを、(B)-1 の方法を用いて検討した。(C)  $[Ca^{2+}]_o$  が脂肪細胞数を増加させるシグナル伝達経路の同定。(C)-1  $[Ca^{2+}]_o$  濃度の変化に伴う細胞内カルシウムイオン濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の変化; Calcium Imaging (Fura-2 法) を用いて、 $[Ca^{2+}]_o$  を変化させた時の  $[Ca^{2+}]_i$  変化を検証。(C)-2 Ca 受容体、Ca チャネルの発現;(B) にて明らかにした細胞について、CaSR、L 型 Ca チャネル、T 型 Ca チャネル、transient receptor potential (TRP) チャネルなどの mRNA 発現を RT-PCR 法にて確認した。

2018 年度 (A) 脂肪細胞数増加のメカニズムとして、間葉系幹細胞の増殖促進、間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化促進、間葉系幹細胞から分化した脂肪細胞の増殖促進などが考えられる。 $[Ca^{2+}]_o$  が間葉系幹細胞そのものの増殖に与える影響と脂肪細胞への分化への関与、また分化後の脂肪細胞数に与える影響につき検討した。(B) 骨髄間質細胞の細胞外 Ca 濃度を上昇させることによって、その一部は Calcium Sensing Receptor を介して細胞内の Ca 濃度を上昇させること、その細胞内 Ca 上昇が脂肪細胞分化を正に調節している可能性が示された。脂肪幹細胞では、脂肪細胞への分化誘導後期に細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度が上昇すると脂肪細胞分化が促進されることより、脂肪細胞の分化には PPAR 以外に細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度が重要な役割を有する可能性が示されていたが、骨髄間質細胞の脂肪細胞分化における  $Ca^{2+}$ の役割は明らかでなかった。今回の我々の研究の結果、骨髄間質細胞の細胞外  $Ca^{2+}$ 濃度を上昇させるとその一部は Calcium Sensing Receptor を介して細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度を上昇させること、インスリンとデキサメタゾン存在下とそれらの非存在下では、同じ細胞内 Ca 上昇であっても骨芽細胞・脂肪細胞への分化・振り分けに対する作用が正反対となることが明らかとなった。メタボリック症候群など耐糖能障害存在下での骨髄脂肪変性のメカニズムが従来知られているものとは異なる可能性があり、CCB、CaSR 阻害薬をはじめとした薬剤による骨髄幹細胞内 Ca 濃度への介入が、メタボリック症候群と加齢に伴う病的骨折を減少させ、再生血管の石灰化を改善する可能性が示唆された。引き続き上記(A),(B)で明らかにしたシグナル伝達経路を阻害することで、骨髄脂肪化が抑制できるかを in vivo にて検討している。

2019年度 我々は平成30年度までの本研究において、細胞内Caイオン濃度の上昇、および細胞外Caイオン濃度の上昇がともに、マウス骨髄間葉系幹細胞に作用して骨髄脂肪化を促進する可能性を報告してきた。骨髄脂肪化は骨折や貧血の一因であり、治療標的として注目されている。2019年度の研究では、高濃度の細胞外カルシウム([Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>)が特異的に骨髄脂肪化をもたらすメカニズムの同定を試みた。その結果、プロテインキナーゼC(PKC)を介したシグナル伝達経路が骨髄脂肪化に関与することを突きとめ、プロテインキナーゼC(PKC)の活性化薬であるホルボールエステルPMAがCaイオンの骨髄脂肪化促進作用を抑制することを報告した (Hashimoto R, Katoh Y et al. *Journal of Physiological Sciences* 69: 741-748, 2019)。PKCの活性化薬が、高齢者の病的骨折減少への新たな治療戦略として期待される。さらに、グラム陰性菌の構成成分であるリポ多糖(LPS)が、JAK/STATシグナル伝達経路を活性化し、酸化LDLの取込みに必要なスカベンジャー受容体CD204およびCD36をマウス骨髄由来マクロファージの細胞膜上に増大させることによって、動脈硬化を増悪させる可能性を報告した (Hashimoto R, Katoh Y et al. *European Journal of Pharmacology* 871:172940, 2020)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashimoto Ryota, Kakigi Ryo, Miyamoto Yuki, Nakamura Kyoko, Itoh Seigo, Daida Hiroyuki, Okada Takao, Katoh Youichi	4. 巻 871
2. 論文標題 JAK-STAT-dependent regulation of scavenger receptors in LPS-activated murine macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 172940 ~ 172940
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.ejphar.2020.172940	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto Ryota, Miyamoto Yuki, Itoh Seigo, Daida Hiroyuki, Okada Takao, Katoh Youichi	4. 巻 69
2. 論文標題 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) suppresses high Ca <sup>2+</sup> -enhanced adipogenesis in bone marrow stromal cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 741 ~ 748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s12576-019-00690-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto-R, Daida-H, Okada-T, Katoh-Y	4. 巻 5
2. 論文標題 A simple method to increase the proportion of bonemarrow-derived macrophages positive for M-CSFR using the reducing agent dithiothreitol (DTT)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods X	6. 最初と最後の頁 1540, 1548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.11.014">https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.11.014</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto R, Kakigi R, Nakamura K, Itoh S, Daida H, Okada T, Katoh Y.	4. 巻 266
2. 論文標題 LPS enhances expression of CD204 through the MAPK/ERK pathway in murine bone marrow macrophages.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 167-175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.005. Epub 2017 Oct 6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto R, Katoh Y, Miyamoto Y, Nakamura K, Itoh S, Daida H, Nakazato Y, Okada T.	4. 巻 67
2. 論文標題 High extracellular Ca <sup>2+</sup> enhances the adipocyte accumulation of bone marrow stromal cells through a decrease in cAMP.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 74-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.ceca.2017.08.006. Epub 2017 Aug 24.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	橋本 良太  (Hashimoto Ryota)		