

令和元年6月6日現在

機関番号：25302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10915

研究課題名(和文) 骨芽細胞による石灰化を制御する新規血清タンパク質の同定

研究課題名(英文) Regulatory molecular mechanism of calcification on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro

研究代表者

佐々木 順造 (Sasaki, Junzo)

新見公立大学・健康科学部・教授(移行)

研究者番号：30093686

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)：私たちはこれまでに、骨芽細胞が、死細胞をコアとして石灰化を誘導することを報告している。本研究において、私たちは、死細胞に結合する血清タンパク質の中に、石灰化を制御する分子があると仮説を立て、その検証を行った。死細胞の石灰化誘導を行い、死細胞に結合したタンパク質を質量分析法により解析した結果、死細胞にのみ結合しているタンパク質を、複数同定した。その中でもセルピンファミリー分子に着目し、石灰化能への影響を解析した。その結果、一つのセルピンファミリー分子の過剰発現が、骨芽細胞分化に伴う石灰化を促進しうることが明らかとなった。本分子が血清中に含まれる石灰化制御分子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血清中において石灰化を誘導する分子を同定することで、新たな石灰化制御タンパク質の証拠を提示する重要な意義を持つ。また、動脈硬化や軟骨内骨化における石灰化においても、本研究にて明らかになった分子の関連が予想され、骨粗鬆症や骨形成不全症の改善や、異所性石灰化の治療にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is believed that osteoblasts induced bone mineralization via release of matrix vesicle. We reported that necrotic and apoptotic cells also serve as nuclei for calcification on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC) in vitro. In this study, we investigated regulatory molecular mechanism of calcification on osteoblastic differentiation of hMSC in vitro. We identified various molecules binding to necrotic dead cells under calcification medium containing fetal bovine serum using mass spectrometry. The gene cloning of calcification related candidates was performed. Overexpression of one of the candidates promoted the calcification on osteoblastic differentiation of hMSC in vitro suggesting that the molecule in serum has a role on calcification by osteoblasts.

研究分野：組織学

キーワード：石灰化 骨芽細胞 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

交通事故などによる重度の骨折や、糖尿病や薬剤の副作用による骨壊死などで骨を欠損する患者に、骨欠損を治療できる医療が求められている。間葉系幹細胞は、加わる刺激により、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などの異なる機能を持った細胞に分化できるため、骨再生医療の分野で期待されている。

骨髄間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞は、骨形成に重要な石灰化を、基質小胞の分泌を介して誘導すると考えられている。基質小胞は、細胞膜で囲まれた小胞で、石灰化開始の場としての役割を持つ。この小胞には、アルカリホスファターゼ、Pit1、Annexin-Vなどの石灰化を促進するタンパク質が存在することが報告されている。

代謝が盛んな骨組織では、骨芽細胞が骨基質表面に単層で高密度に接着しており、骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞誘導系や単離骨芽細胞による石灰化などの *in vitro* の実験系でも、高密度細胞培養がしばしば取り入れられている。私たちは、骨形成機構において、この骨芽細胞系列の高密度状態が石灰化に何らかの役割を持つのではないかと考えた。また、通常の細胞を高密度で培養すると、しばしば細胞死が観察されることがある。長管骨における軟骨内骨化の場では細胞死が単なる骨細胞と入れ替わるためのものではなく、石灰化そのものに関与しているのではないかと考えた。これらの着想を元に、私たちは、骨芽細胞系列による石灰化機構において、死細胞が何らかの役割を持つ可能性があると考えた。

まず、ヒト骨髄間葉系幹細胞の培養細胞を骨芽細胞誘導培地にて高密度培養をした結果、石灰化に先行して、多くの死細胞の誘導が認められた。この細胞死の阻害は、石灰化を顕著に抑制した。さらに、細胞死の誘導は、石灰化を促進した。これらの結果は、骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化系における石灰化で、死細胞が重要な働きを持つ事を示している。申請者らは、死細胞が高濃度の FBS によって石灰化することを見出した。そして、加熱処理した FBS では石灰化が誘導されないことを明らかにした。これは、血清中に石灰化に関連する熱感受性の分子が存在することを示唆する。これに関して、石灰化を制御する血清タンパク質については十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

血清中に含まれる石灰化誘導タンパク質を同定するため、血清とインキュベートして石灰化する死細胞中に含まれるタンパク質の中で、量的変化を示すタンパク質を検索し、このタンパク質を、骨芽細胞系列による石灰化の系に作用させ、石灰化に対する影響を解明することを、本研究課題の目的とした。

3. 研究の方法

高濃度 FBS にて石灰化反応後の死細胞を回収し、SDS-PAGE により分離するかそのままアクリルアミドゲルに封入した。その後 *in gel digestion* し、LC-MS システムにより分離・同定をおこなった。pFLAG-CMV5.1 に、制限酵素 *SalI* および *EcoRI* にて、セミプラントエンドを作製し、標的分子を制限酵素サイトを持ったプライマーを用いた PCR にて増幅し、クローニングを行った。骨髄間葉系幹細胞株 hMSC12 へのトランスフェクトは、リポフェクション試薬 Fugene HD を用いて行った。グリセロリン酸、アスコルビン酸を含む alpha MEM を骨芽細胞分化培地として分化誘導を行った。石灰化の評価は、アリザリンレッド染色もしくはカルセイン染色にて行い、それぞれ吸光プレートリーダーもしくは蛍光プレートリーダーにて定量化した。

4. 研究成果

血清中に含まれる新規石灰化因子探索のため、ヒト間葉系幹細胞を凍結融解して死細胞を作製後、血清存在下非存在下で反応を行った。これらを SDS-PAGE により分離した結果、血清存在下で死細胞に結合したタンパク質と推測されるバンドが複数検出された。このバンドを切りだし、*in gel digestion* 後、質量分析により同定し、石灰化関連因子の候補分子とした。また、SDS-PAGE は巨大分子や 10kDa 以下の分子の分離には適さない。これらの分子の中からも候補分子を得るには、SDS-PAGE による分離ではなく、直接トリプシン消化後、液体クロマトグラフィーで分離すれば解決することを見出した。そこで、石灰化反応後の死細胞を回収し、そのままアクリルアミドゲルに封入した。その後分離をせずに *in gel digestion* し、LC-MS システムにより分離・同定をおこなった。以上より複数の石灰化候補分子を同定した。次に、複数の候補分子の遺伝子クローニングを行った。骨芽細胞の前駆細胞である骨髄間葉系幹細胞株に候補分子の遺伝子を発現させるため、それぞれの遺伝子を Mammalian FLAG Expression vector pFLAG-CMV5.1 にクローニングした。石灰化誘導候補分子 Serpin H1、Serpin A5 を、リポフェクションにて間葉系幹細胞に強制発現し、骨芽細胞に分化誘導し、石灰化を解析した結果、Empty vector をトランスフェクトした間葉系幹細胞に比べ、Serpin A5 をトランスフェクトした間葉系幹細胞では、石灰化が促進された。以上の成果により、死細胞結合タンパク質 Serpin A5 には石灰化促進能があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Fujita H, Nagakawa K, Kobuchi H, Ogino T, Kondo Y, Inoue K, Shuin T, Utsumi T, Utsumi K, Sasaki J, Ohuchi H. Phytoestrogen Suppresses Efflux of the Diagnostic Marker Protoporphyrin IX in Lung Carcinoma. *Cancer Res.* 2016;76(7):1837-46.
2. Ambe K, Watanabe H, Takahashi S, Nakagawa T, Sasaki J. Production and physiological role of NO in the oral cavity. *Jpn Dent Sci Rev.* 2016;52:14-21.
3. Abdalkader L, Oka T, Takata K, Sato H, Murakami I, Otte AP, Yoshino T. Aberrant differential expression of EZH1 and EZH2 in Polycomb repressive complex 2 among B- and T/NK-cell neoplasms. *Pathology.* 2016 Aug;48(5):467-82.
4. Washio K, Oka T, Abdalkader L, Muraoka M, Shimada A, Oda M, Sato H, Takata K, Kagami Y, Shimizu N, Kato S, Kimura H, Nishizaki K, Yoshino T, Tsukahara H. Gene expression analysis of hypersensitivity to mosquito bite, chronic active EBV infection and NK/T-lymphoma/leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2017 Nov;58(11):2683-2694.
5. Takigawa T, Tanaka M, Sugimoto Y, Tetsunaga T, Nishida K, Ozaki T. Discrimination between Malignant and Benign Vertebral Fractures Using Magnetic Resonance Imaging. *Asian Spine J.* 2017;11(3):478-483.
6. Tetsunaga T, Tetsunaga T, Nishida K, Tanaka M, Sugimoto Y, Takigawa T, Takei Y, Ozaki T. Denosumab and alendronate treatment in patients with back pain due to fresh osteoporotic vertebral fractures. *J Orthop Sci.* 2017;22(2):230-236.
7. Tetsunaga T, Tetsunaga T, Nishida K, Tanaka M, Sugimoto Y, Takigawa T, Ozaki T. Short-term outcomes of patients being treated for chronic intractable pain at a liaison clinic and exacerbating factors of prolonged pain after treatment. *J Orthop Sci.* 2017 May;22(3):554-559.
8. Oka T, Mizuno H, Sakata M, Fujita H, Yoshino T, Yamano Y, Utsumi K, Masujima T, Utsunomiya A. Metabolic abnormalities in adult T-cell leukemia/lymphoma and induction of specific leukemic cell death using photodynamic therapy. *Sci Rep.* 2018 Oct 8;8(1):14979.
9. Murakami I, Wada N, Nakashima J, Iguchi M, Toi M, Hashida Y, Higuchi T, Daibata M, Matsushita M, Iwasaki T, Kuwamoto S, Horie Y, Nagata K, Hayashi K, Oka T, Yoshino T, Imamura T, Morimoto A, Imashuku S, Gogusev J, Jaubert F. Merkel cell polyomavirus and Langerhans cell neoplasm. *Cell Commun Signal.* 2018 22;16(1):49.
10. Fujita H, Ochi M, Ono M, Aoyama E, Ogino T, Kondo Y, Ohuchi H. Glutathione accelerates osteoclast differentiation and inflammatory bone destruction. *Free Radic Res.* 2019;53(2):226-236.
11. Oda Y, Takigawa T, Ugawa R, Shiozaki Y, Misawa H, Sugimoto Y, Tanaka M, Ozaki T. Relationship between Displacement of the Psoas Major Muscle and Spinal Alignment in Patients with Adult Spinal Deformity. *Asian Spine J.* 2018;12(2):335-342.
12. Nakata E, Sugihara S, Kataoka M, Yamashita N, Furumatsu T, Takigawa T, Tetsunaga T, Ozaki T. Early response assessment of re-ossification after palliative conventional radiotherapy for vertebral bone metastases. *J Orthop Sci.* 2019;24(2):332-336.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 藤田 洋史, 永川 恵介, 小淵 浩嗣, 荻野 哲也, 近藤 洋一, 井上 啓 史, 執印 太郎, 内海 俊彦, 内海 耕慥, 佐々木 順造, 大内 淑代. ヘム代謝制御に基づく光感受性物質 protoporphyrin IX 蓄積機構の研究. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会(2016 年)
2. 安部仁晴, 中川敏浩, 佐々木順造, 渡邊弘樹. ラット顎下腺における活性酸素合成酵素の発現. 第 122 回日本解剖学会総会・学術集会(2017 年)
3. Takashi Oka, Masumi Sakata, Hajime Mizuno, Hirofumi Fujita, Tsutomu Masujima, Tadashi

Yoshino, Yoshihisa Yamano and Atae Utsunomiya. Sensitive detection of dynamic changes of metabolic abnormalities during onset and progression of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and induction of specific leukemic cell death by photodynamic action. The 18th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses HTLV. (2017, Tokyo)

4. 安部仁晴, 中川敏浩, 佐々木順造, 渡邊弘樹. ラット顎下腺における活性酸素合成酵素の発現. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2017 年)

5. 山本智恵子, 矢嶋裕樹, 大月説子, 土井英子, 佐々木順造. 感染対策チームメンバーのチームプロセスに関連する要因. 第 11 回看護教育研究発表会 (2017 年)

6. 藤田 洋史, 永川 恵介, 小淵 浩嗣, 荻野 哲也, 近藤 洋一, 井上 啓史, 執印 太郎, 内海 俊彦, 内海 耕慥, 佐々木 順造, 大内 淑代. 植物性エストロゲンはガン診断マーカープロトポルフィリン IX の排出を抑制する. 第 114 回岡山医学会総会 (2017 年)

7. 佐藤妃映, 岡 剛史, 神農陽子, 鷲尾佳奈, 村上一郎, 大内田守, 宇都宮與, 吉野 正. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) を発症した HTLV-1 キャリアにおける異常 DNA メチル化の解析. 第 57 回日本リンパ網内系学会総会 (2017 年)

8. 佐藤妃映, 岡 剛史, 神農陽子, 鷲尾佳奈, 村上一郎, 大内田守, 宇都宮與, 吉野 正. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) における DNA 異常メチル化と病態の変動との関連. 第 106 回日本病理学会総会 (2017 年)

9. 瀧川朋亨. インストゥルメンテーション後の再手術の検討. 脊椎インストゥメンテーション学会 (2017 年)

10. 瀧川朋亨. 思春期特発性側弯症患者の自己イメージ. 第 46 回日本脊椎脊髄病学会 (2017 年)

11. 藤田洋史, 佐々木順造. 石灰化誘導時における死細胞結合分子のプロテオーム解析. 第 71 回日本酸化ストレス学会 第 18 回日本 NO 学会合同学術集会 (2018 年)

12. 藤田 洋史, 大野 充昭, 青山 絵理子, 荻野哲也, 大内 淑代. マウス骨髄マクロファージにおける RANKL による破骨細胞分化に対する Glutathione の影響. 第 71 回日本酸化ストレス学会第 18 回日本 NO 学会合同学術集会 (2018 年)

13. 藤田 洋史, 長尾 僚祐, 土生田宗憲, 服部 高子, 久保田 聡, 大内 淑代. 破骨細胞におけるロイコトリエン系の機能解明: CRISPR-Cas9 を用いた alox5ap ノックアウトマウスの作製. 第 91 回日本生化学会大会 (2018 年)

14. 藤田 洋史, 土生田宗憲, 服部 高子, 久保田 聡, 大内 淑代. 破骨細胞におけるロイコトリエン系の機能解明: CRISPR-Cas9 を用いた cys1tr1 ノックアウトマウスの作製. 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2018 年)

〔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〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 藤田 洋史

ローマ字氏名: Hirofumi Fujita

所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：20423288

研究分担者氏名：瀧川 朋亨
ローマ字氏名：Tomoyuki Takigawa
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：80613166

研究分担者氏名：岡 剛史
ローマ字氏名：Takashi Oka
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：講師
研究者番号（8桁）：50160651

(2)研究協力者 なし