

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15657

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の増殖と可塑性に関わるシグナルの解析

研究課題名(英文) PDGF-induced proliferation and differentiation of synovial mesenchymal stem cells is mediated by the PI3K-PKB/Akt pathway

研究代表者

辻 邦和 (TSUJI, Kunikazu)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授

研究者番号：20323694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：血小板由来成長因子(PDGFs)による、滑膜由来間葉系幹細胞の増殖の分子メカニズムについて解析を行った。PDGFによる増殖促進効果は、PI3K阻害剤であるLY290042により有意に抑制された。軟骨凝集塊の形成はPDGF存在下で増大したが、PI3K阻害剤存在下では、軟骨基質の産生は有意に抑制された。また、PI3K阻害剤は細胞外基質の石灰化を有意に抑制した。

本研究で、PDGFsによるPI3K情報伝達経路の活性化が、滑膜MSCsの増殖及び骨軟骨分化に対して必須であることが示された。この結果が、滑膜MSCsの臨床応用においてより効率的かつ安全な培養方法の構築に寄与することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDGFシグナルは種々の体性幹細胞(間葉系幹細胞)の増殖や分化に関与することが示されている。本研究では、膝滑膜由来間葉系幹細胞の増殖および軟骨、骨分化の両方においてもPDGFシグナルが必須の機能を有していることを示した。また、その細胞内シグナル伝達経路の解析から、PDGFが滑膜MSCsの増殖および分化を促進させる際にPI3Kシグナルが非常に重要な機能を果たしていることを示した。滑膜由来間葉系幹細胞は、自己細胞移植による関節軟骨や半月板再生への臨床応用研究が期待されている細胞である。本研究結果は、滑膜間葉系幹細胞のin vitro培養条件の最適化に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：PDGFs have been reported to enhance proliferation of synovial mesenchymal stem cells (MSCs) without reducing their multi-lineage differentiation potential in vitro. This study was aimed to elucidate the intracellular molecular pathways activated by PDGFs. For the purpose of this study, proliferation and differentiation assays were performed in the presence of small inhibitor molecules specific for intracellular kinases. Both PDGF-AA and -BB enhanced cell proliferation. These effects were significantly reduced by a PI3K inhibitor, LY290042 (LY). During chondrogenic spheroid formation in vitro, LY significantly reduced the size of spheroids enhanced by PDGF-AA. LY also inhibited chondrogenic and osteoblastic differentiation of synovial MSCs. These indicated that activation of the PI3K plays an important role in both proliferation and differentiation of synovial MSCs. Hence, these data could be beneficial for optimizing the in vitro culture conditions of synovial MSCs for clinical use.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：間葉系幹細胞 滑膜 PDGF PI3K 細胞増殖 軟骨分化

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

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(MSC)は、生体組織中に存在し、主に中胚葉由来組織の恒常性や損傷後の組織修復に必須の機能を有すると考えられている細胞である。In vitroにおいて限定された増殖能と分化能を有しており、比較的容易に骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞等の中胚葉由来組織に分化誘導できるため、硬組織再生医療の分野で臨床応用に向けた試みが始まっている。私たちは、関節内組織(軟骨や半月板)の再生医療の実現を最終目標として、膝滑膜組織中に存在するMSCの増殖分化と欠損組織の再生能力の検証を行ってきた。これまでに、滑膜MSCが、骨髄由来MSCよりも高い増殖能を持つこと、PDGF(Platelet-derived growth factor; 血小板由来増殖因子)受容体を発現していること、PDGFに対する中和抗体が、血清刺激による滑膜MSCの増殖を有意に抑制することを示してきた(Nimura et al., *Arthritis Rheum.*58:501-510,2008)。また、PDGF刺激による滑膜MSCの増殖がPI3K-Akt経路の阻害により特異的に抑制されることを示した。一方、近年複数のグループから、骨髄由来MSCがin vitroにおいて肝細胞やグリア細胞に分化誘導できることが示されたことから、MSCもES細胞やiPS細胞と同様に非常に高い可塑性を持ち、全能性を有する細胞に誘導できる可能性が示唆された(Schwartz et al., *J. Clin. Invest.*109:1291-1302,2002. Parivar et al., *Cell J.* 17:27-36,2015)。2012年の報告では、PDGF受容体の細胞内チロシンリン酸化酵素ドメインに対する阻害剤及びPI3K-Akt経路の阻害剤が、骨髄MSCの細胞形態を変化させると同時にOct4とNanogの発現を上昇させ、未分化性並びに肝細胞やグリア細胞への分化能を促進することが示されている(Ball et al., *Stem Cells.*30:548-560,2012)。以上から、PDGF及びPDGFにより活性化されるPI3K-Akt経路は、MSCの可塑性と分化のCommitmentに関わっていることが強く示唆される。

滑膜由来MSCは、in vitroにおいて三胚葉性の分化誘導が観察されるにも関わらず、ES細胞やiPS細胞と異なりin vivoにおける全能性は検証されていない。ES細胞は将来全ての体組織へと分化する胚盤胞の内部細胞塊より樹立した細胞であり、非常に高い多分化能を有する細胞である。2009年に米国FDAにより初の臨床治験の許可があり、再生医療分野においても先駆的な役割を果たしている。しかしながら、テラトーマの形成や移植対象の患者本人由来の細胞を樹立不可能である点が不利な点として挙げられる。iPS細胞は、ES細胞と同等の性質を有する全能性細胞であるが、細胞のリプログラミングに関わる遺伝子を体細胞に導入することにより作成した細胞であり、癌化並びに染色体異常の危険性を完全に排除することが困難である。これに対しMSCは、骨髄、脂肪、骨格筋や膝滑膜等から分離される増殖性の高い線維芽細胞であり、樹立に外来遺伝子の導入等の特別な操作を必要としない。2006年に発表された国際細胞移植学会(ISCT)の指針では、MSCはin vitroで骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞に分化誘導できる細胞と定義されており、三胚葉性の多分化能は考慮されていないが、近年複数のグループから骨髄由来MSCがin vitroにおいて肝細胞やグリア細胞に分化誘導できることが示されたことから、MSCも非常に高い可塑性を持ち、全能性を有する細胞になり得る可能性が示唆された。加えて、これまでの動物実験、現在本学で進行中の再生医療治験において細胞移植後の癌組織の形成等の有害事象は確認されておらず、臨床応用に際して、MSCの安全性は非常に高いと考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究は、MSCの増殖性及び可塑性の高さを規定する情報伝達経路(Commitment Factor)としてPDGF刺激により活性化されるPI3K-Akt経路の詳細な解析を行うことを目的とし、そのシグナルのmodificationがin vitro並びにin vivoにおけるMSCの多分化能に及ぼす影響を明らかとすることを試みる。その知見に基づいて、最終的にはMSCから(遺伝子導入等の特別な操作をせずに)生殖細胞系統に分化誘導できるか、すなわち全能性を持つ細胞になり得るかを検証することを最終的な目標とする。

本研究により、MSCの可塑性の高さの証明とそれを規定する因子としてのPDGF/PI3K-Akt経路の解析が進むことにより、体細胞の可塑性(Commitment Factor)を定義する分子メカニズムの解明に貢献できると考えている。その知見は、現在の幹細胞移植治療の発展に貢献することが期待でき、また、MSCから生殖細胞系統の分化を誘導できた場合、ES、iPS細胞に変わる新たな全能性細胞の樹立に貢献できると考える

### 3. 研究の方法

PDGFにより活性化される細胞内シグナル伝達経路の解析: 組換えヒト PDGF-AA および PDGF-BB は R&D Systems より購入した。LY290042 (PI3K 阻害剤) 及び GF10923X (Protein Kinase C 阻害剤) は、和光純薬より購入した。PD98059 (Erk1/2 阻害剤) は CST 社より、SB203580(p38/MAPK 阻害剤) は Upstate Biotech 社より購入した。

滑膜 MSCs の分離培養: 本研究は、本学倫理委員会 (承認番号 2121 号) の承認及び、人工膝関節全置換術を受けた患者の同意の下、術中に廃棄された滑膜組織から分離、培養した細胞(6 継代以内)を用いて行なった。

細胞増殖アッセイ: 滑膜 MSCs は、 $5.7 \times 10^2$  cells /  $\text{cm}^2$  で播種した。翌日、0.1%FBS を含む培地に交換し、ED<sub>50</sub> の 3 倍量の PDGF-AA および-BB を添加した。0 日目、2 日目、5 日目および 8 日目に細胞を採取し、細胞カウンター (BioRad 社製 TC20) により細胞数を測定した。

PDGF シグナル伝達経路の阻害による滑膜 MSCs 増殖の阻害: 滑膜 MSCs を、96 well plate に  $5.0 \times 10^3$  cells / well で播種した。翌日、培地を 0.1%FBS、PDGFs および/または各シグナル経路阻害剤 (IC<sub>50</sub> の 3 倍量) を添加した培地に交換した。MTT アッセイにより細胞増殖率を測定した。

タンパク発現解析: 滑膜 MSCs の表面抗原は、フローサイトメーター (FACS Verse, BD) を用いて行なった。PDGFR / CD140b の細胞質アミノ酸残基のリン酸化は、特異的ホスホチロシン (PY) 抗体染色により測定した。PDGF による細胞内 Erk1/Erk2 及び Akt/PKB のリン酸化は western blotting 法を用いて検討した。

### 分化アッセイ

分化アッセイは、Colter による方法に従って行なった (Colter et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:7841-7845, 2001)。各軟骨ペレットに含まれる GAG (グリコサミノグリカン) の量は、Blyscan アッセイキット (Sigma Aldrich) を用いて測定した。

統計: Kruskal-Wallis 検定 (Steel Dwass 法) または Mann-Whitney U 検定を統計分析に用いた。P 値が 0.05 未満の場合、統計学的に有意な差であると判断した。

### 4. 研究成果

滑膜組織より分離した細胞は、培養とともに PDGFR の陽性率が上昇するとともに線維芽細胞様の形態を示した。培養 14 日目の細胞は MSC の表面抗原を発現していたことから、MSC の増殖に PDGF シグナルの関与が示唆された (Uomizu et al., *J Med Dent Sci*. 65:73-82, 2018: Figure1)。

細胞内情報伝達分子に対するリン酸化の解析から、PDGF は滑膜 MSC において、PI3K、Erk1/2、及び PLC の経路の活性化を行うことが確認された (Uomizu et al., *J Med Dent Sci*. 65:73-82, 2018: Figure2)。特異的阻害剤を用いた実験では、PI3K 及び Erk1/2 のリン酸化を抑制した場合、細胞増殖は有意に阻害されたことから、この 2 つの情報伝達経路の活性化が、滑膜 MSC の増殖に重要であることが示唆された (Uomizu et al., *J Med Dent Sci*. 65:73-82, 2018: Figure3)。

In vitro 軟骨分化培養系において、PDGF-AA、-BB ともに、滑膜 MSC 由来の軟骨ペレットの湿重量及び GAG 量を有意に増加させた。組織学的解析では Type II コラーゲンの発現は、PDGF-AA 添加群で更新していた。これらの効果は、PI3K 阻害により完全にキャンセルされた (Uomizu et al., *J Med Dent Sci.* 65:73-82, 2018: Figure4)。

骨、脂肪分化の過程で PI3K を抑制したところ、石灰化骨基質の産生は有意に抑制された。一方、脂肪細胞の形成に PI3K 阻害剤は影響を及ぼさなかった (Uomizu et al., *J Med Dent Sci.* 65:73-82, 2018: Figure4)。

これまでに我々は血清 PDGF が滑膜 MSCs の多分化能に影響することなく増殖を促進すると報告してきた。本研究では、PDGFR を発現した線維芽細胞が滑膜 MSCs の培養中に増殖したことを示した。これは、PDGF シグナル伝達が滑膜 MSCs の増殖において中心的な役割を果たすことを示唆している。また本研究では、PDGF-AA、-BB の両方が滑膜 MSCs の増殖を促進し、PKB/Akt と Erk1 / 2 リン酸化の阻害が増殖を抑制することが示されたが、リン酸化のパターンは異なっていた。MSC 増殖に及ぼす PDGF-AA と -BB の生理機能の差に関しては、さらなる解析が必要である。

PI3K 経路の役割は、他の組織由来の MSC においても報告されている。Gharibi らは、PI3K の阻害が、ヒト骨髄由来 MSC の PDGF-BB による DNA 合成を有意に抑制すること、PDGF-BB がサイクリン D1 の発現を促進し、またこの作用は LY290042 によって抑制されることを報告した (Gharibi et al., *J Cell Mol Med.* 16:2789-2801, 2012)。Qiu らは、ヒト臍帯血由来 MSC を用いて同様の知見を報告している (Qiu et al., *Cell Biochem Func.* 31:159-165, 2013)。本研究では、滑膜 MSCs でのサイクリン D1 の発現については分析を行っていないが、同様の分子機構が存在すると仮定することは可能である。本研究は、滑膜 MSC における細胞周期の進行を担う細胞内シグナル伝達経路を報告した最初の研究である。

本研究で明らかとなったもう一つの新たな知見は、PI3K 活性が滑膜 MSCs の骨、軟骨分化能に重要な機能を果たすことがあげられる。PDGF-AA は軟骨ペレット形成を有意に促進したが、PI3K 阻害剤 LY290042 はそれを有意に抑制した。また PDGF の作用により、Type II コラーゲンといった細胞外マトリックスタンパク質の発現を促進することも示した。PDGF 存在下でペレットあたりの GAG 量も有意に増加したが、これはペレットあたりの細胞数増加によると考えられた。また、LY290042 の存在下では、CFU-OB はほぼ完全に消失した。コロニー数の変化はなかったが、各コロニーのサイズは減少しており、PI3K 活性は滑膜 MSCs の骨分化にも必要であることが示された。一方この結果とは対照的に、Gharibi らは、PDGF-BB が骨髄由来 MSC の骨分化を阻害し、I 型コラーゲンやアルカリホスファターゼなどの骨芽細胞関連マーカーの発現の阻害が原因になっていると示した。この不一致の理由は現在不明であり、異なる組織由来の MSC の特徴についてさらなる分析が必要である。

本研究により、PDGF が滑膜 MSCs の増殖および分化を促進させる際に PI3K シグナルが非常に重要な機能を果たしていることを示した。滑膜 MSCs の *in vitro* 培養条件の最適化に寄与することが期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) Inomata K., Tsuji K., Onuma H., Hoshino T., Udo M., Akiyama M., Nakagawa Y., Katagiri H., Miyatake K., Sekiya I., Muneta T., Koga H. (2019) Time course analyses of

structural changes in the infrapatellar fat pad and synovial membrane during inflammation-induced persistent pain development in rat knee joint. *BMC Musculoskelet Disord.* 20(1): 8.

- (2) Sasaki A, Mizuno M, Ozeki N, Katano H, Otabe K, Tsuji K, Koga H, Mochizuki M, Sekiya I. (2018) Canine mesenchymal stem cells from synovium have a higher chondrogenic potential than those from infrapatellar fat pad, adipose tissue, and bone marrow. *PLoS One.* 13(8): e0202922.
- (3) Hoshino, T., Tsuji, K., Onuma, H., Udo, M., Ueki, H., Akiyama, M., Abula, K., Katagiri, H., Miyatake, K., Watanabe, T., Sekiya, H., Koga, H., and Muneta, T. (2018). Persistent synovial inflammation plays important roles in persistent pain development in the rat knee before cartilage degradation reaches the subchondral bone. *BMC Musculoskelet Disord.* 19(1):291.
- (4) Uomizu, M., Muneta, T., Ojima, M., Sekiya, I., Koga, H., and Tsuji, K. (2018) PDGF-induced proliferation and differentiation of synovial mesenchymal stem cells is mediated by the PI3K-PKB/Akt pathway. *J Med Dent Sci.* 65:73-82
- (5) Nakamura, K., Tsuji, K., Mizuno, M., Koga, H., Muneta, T., and Sekiya, I. (2019). Initial cell plating density affects properties of human primary synovial mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* in press
- (6) Naritomi, M., Mizuno, M., Katano, H., Ozeki, N., Otabe, K., Komori, K., Fujii, S., Ichinose, S., Tsuji, K., Koga, H., Muneta, T., and Sekiya, I. (2018). Petaloid recombinant peptide enhances in vitro cartilage formation by synovial mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* in press
- (7) Mizuno, M., Katano, H., Mabuchi, Y., Ogata, Y., Ichinose, S., Fujii, S., Otabe, K., Komori, K., Ozeki, N., Koga, H., Tsuji, K., Akazawa, C., Muneta, T., and Sekiya, I. (2018). Specific markers and properties of synovial mesenchymal stem cells in the surface, stromal, and perivascular regions. *Stem Cell Res Ther.* 9(1):123.

〔学会発表〕(計 10件)

- (1) Tsuji K, Muneta T, Sekiya I, Koga H. Synovial fibroblasts have high plasticity and form mesenchymal stem cell (MSC) antigen-positive cells during the two-dimensional culture. Osteoarthritis Research Society International. Toronto, Ontario. Canada. May 2-5, 2019
- (2) 辻 邦和, 関矢 一郎, 宗田大, 古賀英之. 膝滑膜由来線維芽細胞の初代培養過程における表面抗原発現解析. 第32回日本軟骨代謝学会. 2019年3月1日~2日. 大阪, 千里ライフサイエンスセンター
- (3) 辻 邦和, 関矢 一郎, 宗田大, 古賀英之. 膝滑膜由来線維芽細胞の初代培養過程における表面抗原発現解析. 第18回日本再生医療学会. 2019年3月21日~23日. 神戸, 神戸国際会議場
- (4) 辻 邦和, 関矢 一郎, 大川 淳, 宗田大, 古賀 英之. 膝滑膜由来線維芽細胞の初代培養過程における表面抗原発現解析. 第33回日本整形外科学会基礎学術集会. 2018年10月11日~12日. 奈良, 奈良春日野国際フォーラム. 日本整形外科学会雑誌(0021-5325)92巻8号 Page S1971(2018.08)
- (5) 辻 邦和, 尾島美代子, 古賀英之, 関矢一郎, 宗田大. 関節液中に存在し、間葉系幹細胞の増殖を促進する新規因子(FA)は、半月板の再生を著名に促進する. 第17回日本再生医療学会. 2018年3月21日~23日. 横浜, パシフィコ横浜
- (6) 尾島 美代子, 辻 邦和, 宮武 和正, 片桐 洋樹, 堀江 雅史, 古賀 英之, 大川 淳, 関矢

一郎, 宗田 大. 関節液中に存在しヒト間葉系幹細胞の増殖を促進する生理活性物質 (Factor A) の同定と生理機能解析. 第 3 2 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2017 年 10 月 26 日~27 日. 沖縄, 沖縄コンベンションセンター. 日本整形外科学会雑誌 (0021-5325)91 巻 8 号 Page S1729(2017.08)

- (7) 松村 恵津子, 辻 邦和, 塩田 幹夫, 大川 淳, 古賀 英之, 関矢 一郎, 宗田 大. IL-1b は, IL1b 受容体を介さずに滑膜幹細胞の増殖を亢進する. 第 3 2 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2017 年 10 月 26 日~27 日. 沖縄, 沖縄コンベンションセンター. 日本整形外科学会雑誌 (0021-5325)91 巻 8 号 Page S1624(2017.08)
- (8) 辻 邦和, 尾島 美代子, 小田邊 浩二, 堀江 雅文, 古賀 英之, 関矢 一郎, 宗田 大. 関節液中に存在し, 間葉系幹細胞の増殖を支持する分子の検索. 第 16 回日本再生医療学会. 宮城. 仙台国際会議場. 2017 年 3 月 7-9 日
- (9) 魚水 麻里, 宗田 大, 尾島美代子, 宮澤真毅, 関矢 一郎, 辻 邦和. PI3K 阻害剤は, 血小板由来増殖因子(PDGF)により活性化される滑膜間葉系幹細胞の増殖と分化の両方を抑制する. 第 30 回日本軟骨代謝学会. 2017 年 3 月 3 日~4 日. 京都, 京都市勤業館みやこめっせ
- (10) 魚水 麻里, 辻 邦和, 関矢 一郎, 大川 淳, 宗田 大. PDGF により活性化される細胞内 PI3K-PDK1-Akt シグナル経路は, 滑膜由来間葉系幹細胞の増殖と分化を共に促進する. 第 3 1 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2016 年 10 月 13 日~14 日. 福岡, 福岡国際会議場. 日本整形外科学会雑誌 (0021-5325)90 巻 8 号 Page S1601(2016.08)

〔図書〕(計 1 件)

Tsuji, K., (2018). [Emerging drugs for osteoarthritis]. *Clin Calcium* 28, 817-824.

〔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 該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 宗田大

ローマ字氏名: MUNETA Takeshi

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 医歯学総合研究科

職名: 非常勤講師

研究者番号 (8 桁): 50190864

研究分担者氏名: 関矢一郎

ローマ字氏名: SEKIYA Ichiro

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 再生医療研究センター

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 10345291

### (2) 研究協力者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。