

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791939

研究課題名（和文） 間葉系幹細胞の骨分化能判定キット開発のための基礎的研究

研究課題名（英文） Basic study for development of osteogenic differentiation potential determination kit of mesenchymal stem cells

研究代表者

末廣 史雄 (SUEHIRO FUMIO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40524781

研究成果の概要(和文):本研究において11個の新規骨分化関連転写因子が選定された。また、間葉系幹細胞の骨分化の初期からこれらの転写因子が相互作用してネガティブフィードバック機構が働いていることが示唆された。選定された中で特に2個の転写因子は、間葉系幹細胞の骨分化能判定マーカーとして有用であり、間葉系幹細胞を用いた骨再生医療の際の品質チェック用マーカーとして将来の医療に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): I had identified eleven novel transcription factors that involves in human Mesenchymal stem cells (MSC) osteogenesis. Interaction of these factors might progress MSC osteogenic differentiation. Especially, factors which suppress osteogenic differentiation might show negative feedback toward osteogenic differentiation. Clinical application of these transcription factors, especially two factors, might be used for prognostic marker for osteogenic potential of MSC and may be useful for quality check before MSC transplantation in the future medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学/歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生医療、幹細胞、骨再生、遺伝子、細胞移植

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初の日本では他人からの他家移植は受け入れられにくく、免疫反応や感染等の危険性が少ない自己細胞のニーズが高まっていた。しかし、間葉系幹細胞の分化能は個人差が大きく、間葉系幹細胞を用いた骨再生治療の失敗の原因の1つに、細胞株によっては骨分化能を有さない、あるいは骨分化能が低いことが挙げられる。各細胞株の骨分化能を判断するための幾つかの方法がある

が、いずれも最終的な判断を下すには長期間の培養が必要である。

また、間葉系幹細胞の骨分化に関連する遺伝子の報告は数多くされているが、いまだそのメカニズムは完全には解析されておらず、再生医療に科学的根拠を与えるためにもメカニズムの解析が必要である。

2. 研究の目的

本研究は骨分化初期に特異的に発現が亢

進する転写因子を骨分化マーカーとして使用し、骨分化能判定のための期間を短縮させるキットの開発を目的としている。

また、これまでに骨分化の正の制御因子として RUNX2 やその下流に存在する Osterix といった遺伝子が報告されているが、これらは骨分化だけでなく軟骨分化や脂肪分化においても発現が亢進する遺伝子であり、骨分化特異的に発現が亢進する遺伝子に関する報告は未だなされていない。本研究は骨分化特異的に発現が亢進する遺伝子を明らかにし、間葉系幹細胞の骨分化メカニズムを解析することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 間葉系幹細胞を未分化状態、あるいは骨・軟骨・脂肪、各分化誘導培地にて培養し、分化 24 時間後に回収した相補的 DNA、さらに対照群としての線維芽細胞より回収した相補的 DNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行う。

(2) DNA マイクロアレイの結果に以下の 5 つの条件を適用し、間葉系幹細胞の骨分化初期に特異的に発現する転写因子の探索を行う。

①骨分化誘導 24 時間後の間葉系幹細胞で、全ての株における発現レベルが Present あるいは Marginal である遺伝子

②線維芽細胞での遺伝子発現レベルが未分化間葉系幹細胞と比較して 2 倍未満である遺伝子

③骨分化誘導 24 時間後の間葉系幹細胞での遺伝子発現レベルが、未分化間葉系幹細胞と比較して 2 倍以上の遺伝子

④軟骨および脂肪分化誘導 24 時間後の間葉系幹細胞での遺伝子発現レベルが、未分化間葉系幹細胞と比較して 2 倍未満である遺伝子

⑤Ingenuity Pathway Analysis (IPA) および Database for annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) のデータベース検索により転写を調節する事が示唆された遺伝子

(3) 選定した転写因子に対する Small Interfering RNA (siRNA) をリポフェクション法を用いて間葉系幹細胞に導入し、各遺伝子の発現抑制が細胞に与える影響を以下の項目に関して検討する。

①リアルタイム PCR を用いた siRNA の効果判

定 (ターゲット遺伝子のノックダウン効率の検討)

②DNA 定量を用いた細胞数のカウント (細胞増殖への影響)

③リアルタイム RT-PCR を用いたアルカリフォスファターゼ (ALP) mRNA 発現レベルの変化 (ALP mRNA レベル)

④ALP 酵素活性の定量 (ALP 活性定量)

⑤視覚的な石灰化度の確認 (アリザリンレッド染色)

⑥細胞層中のカルシウム量の定量 (カルシウム定量)

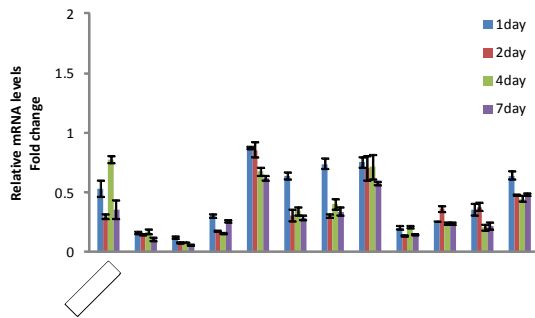
(4) 選定した転写因子の骨・脂肪・軟骨分化誘導時の遺伝子発現レベルの経時的変化を、リアルタイム RT-PCR を用いて確認を行う。

4. 研究成果

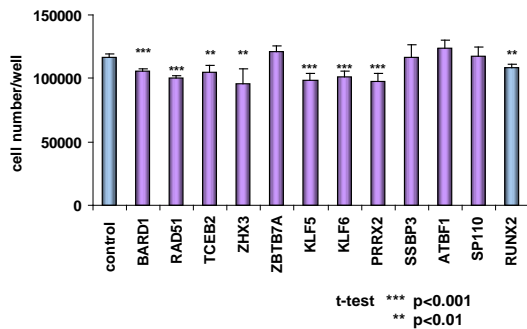
(1) DNA マイクロアレイの結果に研究の方法(2)で示した 5 つの条件を適用した結果、BRCA1 associated RING domain 1 (BARD1)、RAD51 homolog (RAD51)、transcription elongation factor B (TCEB2)、zinc fingers and homeoboxes 3 (ZHX3)、AT-binding transcription factor 1 (ATBF1)、zinc finger and BTB domain containing 7A (ABTB7A)、Kruppel-like factor 5 (KLF5)、Kruppel-like factor 6 (KLF6)、GLI-Kruppel family member GLI2 (GLI2)、paired related homeobox 2 (PRRX2)、single stranded DNA binding protein 3 (SSBP3)、SP110 nuclear body protein (SP110) 以上の合計 12 個の転写因子を選定した。その中で GLI2 は既に間葉系幹細胞の骨分化に関与するとの報告があったが、他の 11 個の転写因子に関しては間葉系幹細胞の骨分化との関連は報告されていなかった。

(2) (1) で選定した 12 個の転写因子の中から、既に報告がされている GLI2 を除いた 11 個の転写因子に、間葉系幹細胞の骨分化に重要な働きをするとの報告がある RUNX2 を加えた、合計 12 個の転写因子に対する siRNA を用いて研究の方法(3)の検討を行った。

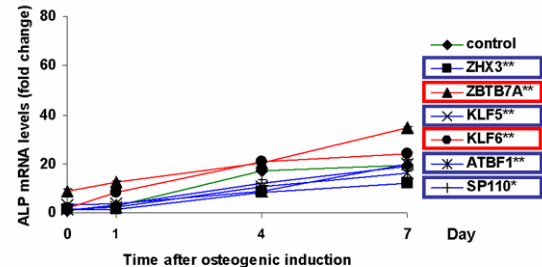
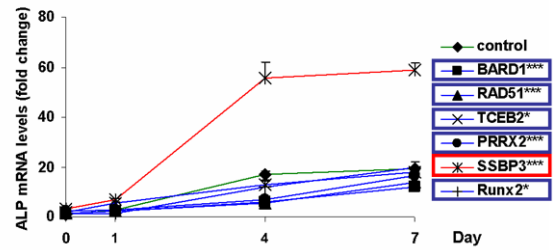
①各転写因子に対して 2-3 種類の siRNA を作製してリアルタイム RT-PCR を用いて抑制効率を検討した。最も抑制効率の高い siRNA を以下の実験に用いた。



②各転写因子に対する siRNA が細胞増殖に及ぼす影響を検討した。Negative control と比較して細胞増殖能が抑えられている実験群があるが、細胞増殖がみられない実験群はなかった。本研究で選定した転写因子は細胞の増殖、および生存に必須ではないことが示された。

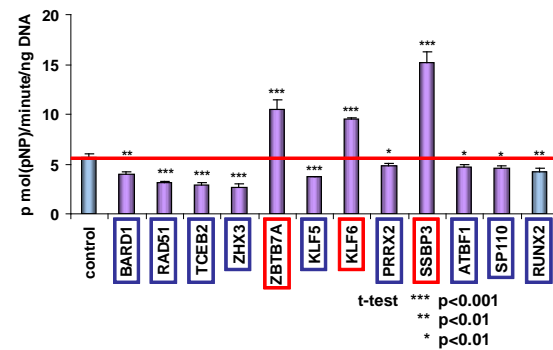


③アルカリフォスファターゼ (ALP) の mRNA レベルでの発現の変化をリアルタイム RT-PCR を用いて比較検討した。コントロールと比較して、赤で示す SSBP3、ZBTB7A、KLF6 に対する siRNA は ALP mRNA の発現を亢進し、青で示す BARD1、RAD51、TCEB2、PRRX2、Runx2、ZHX3、KLF5、ATBF1、SP110 に対する siRNA は ALP mRNA の発現を抑制した。

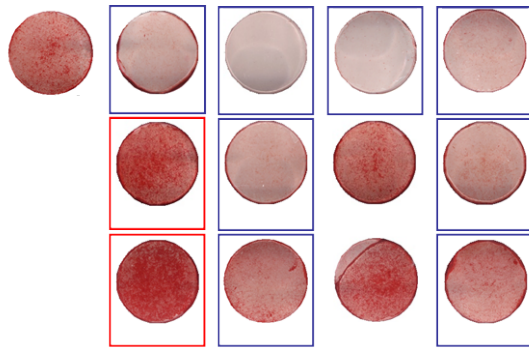


significant difference
on Day 4 or Day 7
t-test *** p<0.001
** p<0.01
* p<0.05

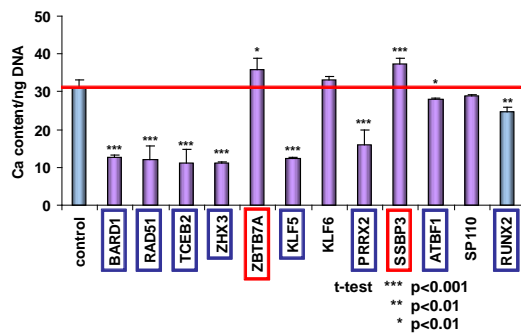
④ALP 酵素活性の変化を比較検討した。コントロールと比較して、赤で示す SSBP3、ZBTB7A、KLF6 に対する siRNA は ALP 酵素活性を亢進し、青で示す BARD1、RAD51、TCEB2、PRRX2、Runx2、ZHX3、KLF5、ATBF1、SP110 に対する siRNA は ALP 酵素活性を抑制した。



⑤細胞層中のカルシウム沈着をアリザリンレッド染色した。コントロールと比較して、赤で示す SSBP3、ZBTB7A に対する siRNA は染色性が増加し、青で示す BARD1、RAD51、TCEB2、PRRX2、Runx2、ZHX3、KLF5、ATBF1 に対する siRNA は染色性が低下した。KLF6 と SP110 に対する siRNA はコントロールとの差がみられなかった。



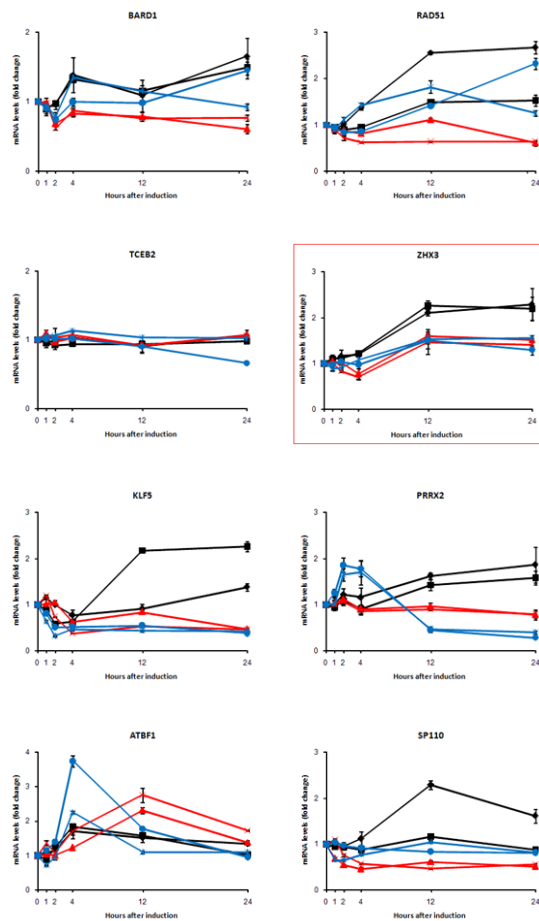
⑥細胞層中のカルシウム沈着量をカルシウム定量法で比較検討した。コントロールと比較して、赤で示す SSBP3、ZBTB7A に対する siRNA は細胞層中のカルシウム量を増加させ、青で示す BARD1、RAD51、TCEB2、PRRX2、Runx2、ZHX3、KLF5、ATBF1 に対する siRNA は細胞層中のカルシウム量を減少させた。KLF6 と SP110 に対する siRNA はコントロールとの差がみられなかった。

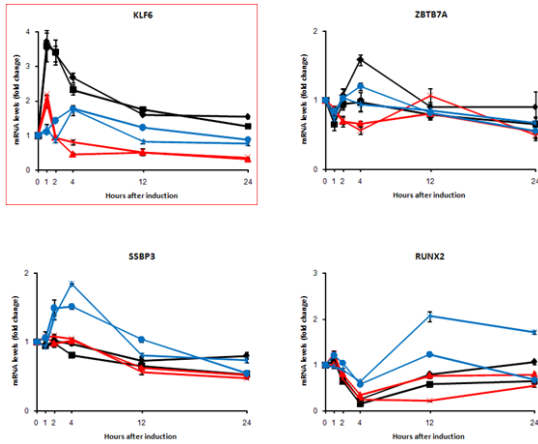


⑦研究成果(2)の②から⑥までの結果をまとめた表を以下に示す。青枠で囲まれた siRNA によって間葉系幹細胞の石灰化が阻害された、つまり生理的には石灰化に促進的に作用していると考えられる転写因子と、赤枠で囲まれた siRNA によって間葉系幹細胞の石灰化が促進された、つまり生理的には石灰化に抑制的に作用していると考えられる転写因子に分類可能であった。このことは間葉系幹細胞の骨分化の初期からネガティブフィードバック機構が働いていることを示唆した。

Gene	The effect of siRNA				
	Cell proliferation	ALP mRNA levels	ALP activity	Alizarin-red staining	Calcium content
BARD1	↓	↓	↓	↓	↓
RAD51	↓	↓	↓	↓	↓
TCEB2	↓	↓	↓	↓	↓
ZHX3	↓	↓	↓	↓	↓
KLF5	↓	↓	↓	↓	↓
PRRX2	↓	↓	↓	↓	↓
ATBF1	→	↓	↓	↓	↓
SP110	→	↓	↓	→	→
KLF6	↓	↑	↑	→	→
ZBTB7A	→	↑	↑	↑	↑
SSBP3	→	↑	↑	↑	↑
RUNX2	↓	↓	↓	↓	↓

⑧選定した転写因子が複数の細胞株において、骨・脂肪・軟骨分化誘導時の実際の発現量の変化をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。グラフの黒は骨分化誘導、青は軟骨分化誘導、赤は脂肪分化誘導時の各転写因子の発現量の変化を示す。赤枠で囲まれた ZHX3 と KLF6 は骨分化誘導時に特異的に発現が亢進しており、この2個の転写因子が間葉系幹細胞の骨分化能判定マーカーとして特に有用であることが示唆された。





5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Suehiro F., Nishimura M., Yoshizawa Y., Kawamoto T., Kanawa M., Murata H., Kato Y. Impact of Zinc Fingers and Homeoboxes 3 (ZHX3) on the Regulation of Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation. Stem cells and Development(査読あり), in press.

[学会発表] (計3件)

- ① Suehiro F. Novel osteogenic specific transcription factors on mesenchymal stem cells (MSC) for alveolar ridge augmentation. 3rd International Workshop on BioDental Education & Research Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences 2011, 2011. 1. 28-30. Hiroshima.
- ② 末廣史雄. 間葉系幹細胞における骨分化特異的転写因子の解析. 第40回日本口腔インプラント学会学術大会, 2010. 9. 18. 札幌.
- ③ 末廣史雄. 間葉系幹細胞の骨分化に関わる新規転写因子 ZHX3 の機能解析. 第9回日本再生医療学会, 2010. 3. 19. 広島.

[図書] (計1件)

- ① Nishimura M., Sakai Y., Suehiro F., Tsuboi M., Kamada K., Hori T., Sakai M., Takeda M., Tsuji K., Hamada T. Interface, implant, regenerated bone and recipient alveolar bone. Interface Oral Health Science 2009, 119-22, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末廣 史雄 (SUEHIRO FUMIO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40524781