

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592912

研究課題名(和文) 間葉系細胞 Selective Pluripotency Modulator の探索

研究課題名(英文) Identification of Selective Pluripotency Modulator of mesenchymal cells

研究代表者

瀬戸 一郎 (Seto, Ichiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30582390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療における最も有力な細胞源である間葉系細胞の欠点、すなわち継代による分化能の低下という欠点は未だ解消されていない。そこで、本研究では、間葉系細胞分化多能性維持に重要かつ臨床応用にあたって安全な因子を同定することにより細胞数の限界という問題を解消し、骨・軟骨再生医学の適応範囲を広げることを目的に研究を行った。その結果、Nfatc1、Runx1、Runx3が間葉系細胞分化多能性に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We conducted this study to identify factors, which are important for the maintenance of pluripotency of mesenchymal cells and are safe in clinical application. In conclusion, results of this study revealed that Nfatc1, Runx1 and Runx3 are important for the maintenance of pluripotency of mesenchymal cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：間葉系細胞 分化 遺伝子導入 転写因子 遺伝子ノックダウン

1. 研究開始当初の背景

口腔外科臨床において、腫瘍・外傷・先天異常などによる高度の骨欠損の再建を行う場合は、従来、自家骨移植が主要な治療法として選択されてきた。この方法は、多くの治療実績を有する優れた治療法ではあるが、自家骨移植のためには、必ず外科的侵襲が必要となるため、患者の負担は決して軽くはないという欠点がある。この欠点を解消するために再生医療分野に於いて様々な研究が行われるようになり、その成果の一部は口腔外科臨床に応用され始めている。また、研究代表者もライフワークとして、臨床に還元しうる骨再生医療を目指した研究を精力的に行ってきた (Seto et al. J Oral Maxillofac Surg 2001, Plast Reconstr Surg 2006 など)。ところで、再生医療を考える際に明確にすべき重要な課題のひとつとして、「どの細胞を使って再生医療を実現するのか」という細胞源の問題が挙げられる。言い換えると、iPS/ES細胞を用いるべきか、間葉系幹細胞を用いるべきかという論点に関して結論を出しておく必要がある。確かにヒト iPS/ES 細胞は、あらゆる組織へと分化可能な分化多能性を有し、臨床応用へ向けて環境が整備されつつある夢の細胞ではある。しかし、奇形腫発生の危険性など主に安全面で解決しなければいけない問題が未だ多く残されており、将来的な臨床導入が大いに期待されるものの、現時点においては、ごく限られた症例に対して iPS 細胞が応用可能となったにすぎない。一方、骨髄由来の間葉系細胞は、iPS/ES 細胞には及ばないが、分化多能性があり、採取が容易である、自己細胞を使用できるため安全性に優れる (抗原性や感染症といった問題がない) 等の点で実用的な細胞源と認識され、すでに複数の領域で臨床応用が行われている。つまり、自己組織から間葉系幹細胞を採取し、生体外で増殖・分化させることで得られた再生組織を再生医療に用いるという手法が現時点では最も合理的である。ただし、この間葉系細胞は骨髄液中に含まれる接着細胞の総称で、様々な subpopulation を含んでおり、全体の約 0.1%程度が分化多能性を有する間葉系幹細胞であるに過ぎず、通常の増殖培養ですぐに分化細胞に希釈され、全体としての分化特性が低下してしまうという欠点が指摘されている。このため、臨床応用で使用可能な細胞数には限界があり、それに応じて修復可能な欠損の大きさが制限されてしまうために、間葉系細胞を用いた骨軟骨再生医療の適用範囲は、依然として小欠損の回復にとどまっている。こうした事実を踏まえ、間葉系細胞の分化多能性維持を可能にする因子を探索し、骨軟骨再生医療における細胞数の限界という問題を解消することが重要であると考えた。そして、この課題を解決するために、われわれは「間葉系細胞の分化多能性維持機構の解明」に関する研究を精

力的に推進し、本研究に先立ち、複数の間葉系細胞分化多能性維持因子 (以下、多能性維持因子) を同定していた。しかしながら、それらの多くはターゲット選択性が低く安全性に不安を残す因子でもあったため、成果を臨床応用につなげるには、多能性維持因子の下流に存在し、特定のターゲットに選択的に作用する安全な因子の同定が必要であることを強く認識するようになった。そして、われわれは、それらの因子を Selective Pluripotency Modulator:(SPM) と名づけ、SPM を同定し、細胞数の限界という問題を解消して、骨・軟骨再生医学の適応範囲を広げべく本研究を着想した。

2. 研究の目的

以前から口腔外科臨床における患者の負担軽減ならびに移植成績向上を目指して、人工材料である -TCP や自己血由来の PRP を腸骨などの自家骨に混ぜて移植する治療などが行われてきたが、必ずしも十分満足のいく成績が得られていない。そのため、必要最小限の組織採取で移植を可能とする再生医療技術の導入に向けてさまざまな研究が行われるようになってきた。しかし、再生医療における最も有力な細胞源と想定される間葉系細胞の欠点、すなわち継代による分化能の低下という欠点は未だ解消されていない。そこで、本研究では間葉系細胞分化多能性維持に重要かつ臨床応用にあたって安全な因子を同定することにより細胞数の限界という問題を解消し、骨・軟骨再生医学の適応範囲を広げることを目的とした。

3. 研究の方法

われわれの研究グループでは、過去の研究において、ヒト骨髄由来間葉系細胞およびマウス未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 に対して、各種ベクターを用いて間葉系細胞分化多能性維持因子を導入することで、間葉系細胞分化多能性維持因子導入細胞 (分化多能性維持因子導入細胞) と非導入細胞を樹立していた。これらの分化多能性維持因子導入細胞は、非導入細胞と比較して、その分化能が向上していることは確認済みであった。本研究では、まず、これらの細胞を用いて、間葉系細胞分化多能性維持因子の下流遺伝子を網羅的に検索した。具体的方法としては、分化多能性維持因子導入細胞と非導入細胞との間で発現変化が起こる遺伝子を検索するために、マイクロアレイ法を行った。

次いで、マイクロアレイ法によって著明な変動を示した遺伝子群の中から、既知のシグナルネットワークとの関連を考慮しながら臨床応用における安全性が高いと想定された遺伝子をピックアップした。また、それらの遺伝子に関して実際の細胞内発現を確認するために、リアルタイム PCR 法を行った。

さらに、リアルタイム PCR 法で細胞内遺伝子発現の上昇が確認された遺伝子のいくつかに関して、分化多能性維持因子導入細胞に対して、遺伝子ノックダウンを行い、それら遺伝子の細胞内機能解析を行った。

4. 研究成果

マイクロアレイの結果から、分化多能性維持因子導入細胞においては数千を超える遺伝子の発現が誘導あるいは抑制される可能性があることが示された。このマイクロアレイの結果をもとにデータベース検索、文献検索を行い、SPM 候補遺伝子の絞込みを行った。次に、SPM 候補として挙げた遺伝子についてリアルタイム PCR による解析によって、実際の細胞で発現が誘導されるものを選択したところ、分化多能性が維持されている細胞では Runt-related family に属する転写因子 Runx1、Runx3 の発現が誘導されることが明らかとなった。その一方で、Runx1 と Runx3 と同じ Runt-related family に属する Runx2 の発現誘導パターンは Runx1 と Runx3 とは異なっていた。さらに、間葉系細胞分化多能性維持機構における Runx1、Runx3 の機能的意義を検討する目的で siRNA を用いて分化多能性維持因子導入細胞の Runx1 あるいは Runx3 をノックダウンしたところ、初期の骨分化マーカーである type I collagen の発現が抑制された。また、免疫系に関わる因子である Nfatc1 についても Runx1、Runx3 と同様の結果が得られた。これらの実験結果から、間葉系細胞の分化多能性維持には Runx1、Runx3、Nfatc1 が重要である可能性が示唆された。なお、その他にもいくつかの SPM 候補分子を同定しており、それらの候補分子に関する解析を継続中であり、一部の候補分子については現在論文投稿中である。

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)

Ogasawara T, Ohba S, Yano F, Kawaguchi H, Chung UI, Saito T, Yonehara Y, Nakatsuka T, Mori Y, Takato T, Hoshi K. Nanog promotes osteogenic differentiation of the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. J Cell Physiol. 2013 Jan;228(1):163-71.

〔学会発表〕(計 6 件)

Ogasawara T, Ohba S, Yano F, Kawaguchi H, Abe T, Takato T, Hoshi K. : Nanog promotes osteogenic differentiation of

mesenchymal cells by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. 2011 annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 16-20, 2011, San Diego, California, USA, San Diego Convention Center

瀬戸一郎, 森良之, 西條英人, 古賀陽子, 安部貴大, 末永英之, 阿部雅修, 菅野勇樹, 杉山円, 星和人, 高戸毅: 当科における生体内吸収性 PLLA/HA 骨接合プレート (Super Fixsorb MX) 治療成績とその合併症. 第 57 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術集会 2012 年 10 月 19 - 21 日 パシフィコ横浜会議センター, 神奈川県横浜市

小笠原徹, 大庭伸介, 矢野文子, 齋藤忠仁, 瀬戸一郎, 米原啓之, 森良之, 星和人, 高戸毅: Nanog の間葉系細胞骨分化能促進効果は BMP シグナルとの相互作用と NFATc1 の誘導を介する. 第 57 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術集会 2012 年 10 月 19 - 21 日 パシフィコ横浜会議センター, 神奈川県横浜市

小笠原徹, 齋藤忠仁, 大庭伸介, 米原啓之, 星和人, 高戸毅: Nanog の間葉系細胞骨分化能促進効果に關与する下流分子の網羅的探索. 第 12 回 日本再生医療学会総会 2013 年 3 月 21 - 23 日 パシフィコ横浜会議センター, 神奈川

Ogasawara T, Saito T, Ohba S, Abe T, Yonehara Y, Takato T. :Runx1 and Runx3 are downstream effectors of Nanog in the promoted osteogenic differentiation of mesenchymal cells. 2013 annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, October 4-7, 2013, Baltimore, Maryland, USA, Baltimore Convention Center.

瀬戸一郎, 小松紀子, 佐藤稔久, 末永英之, 杉山円, 安部貴大, 阿部雅修, 菅野勇樹, 古賀陽子, 西條英人, 森良之, 高戸毅. 有病者に対するインプラント埋入の適応と合併症の考察, 第 4 回日本バイオインテグレーション学会 2014 年 2 月 23 日 東京大学, 東京

〔図書〕(計 1 件)

瀬戸一郎: 高齢患者の骨の処置補綴臨床別冊 エイジング・インプラントロジー - 超高齢社会の全身管理・補綴設計・口腔ケア, 医歯薬出版 (印刷中)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬戸 一郎 (SETO ICHIRO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30582390

(2) 研究分担者

小笠原 徹 (OGASAWARA TORU)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20359623

阿部 雅修 (ABE MASANOBU)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：10392333

古賀 陽子 (KOGA YOKO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10392408

小川 卓也 (OGAWA TAKUYA)
東京医科歯科大学・医歯（薬）学総合研究
科・講師
研究者番号：50401360

(3) 連携研究者

なし