

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463224

研究課題名(和文)炎症性骨吸収に対する間葉系幹細胞由来破骨細胞分化抑制ペプチドの作用機序の解明

研究課題名(英文)Elucidating the molecular mechanism of a peptide, SCRG1, derived from mesenchymal stem cells to suppress the osteoclast differentiation.

研究代表者

高橋 典子 (Takahashi, Noriko)

岩手医科大学・歯学部・研究員

研究者番号：60405777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)は間葉組織構成細胞への多分化能を有した体性幹細胞である。炎症やそれに引き続く組織修復に伴い骨髄由来MSCがケモカインの誘導にしたがって歯周組織を含む様々な組織へとホーミングする。我々は歯周炎等において歯肉線維芽細胞から分泌される炎症性サイトカインが歯根膜由来MSC様細胞に作用することで、ケモカインSDF-1やMCP-1を分泌することを明らかにした。興味深いことに、これらのケモカインは骨髄由来MSCに対してのみ遊走促進効果を示した。これら様々な性質や能力を有したMSCを効果的に利用することによって、より効率的な再生医療や細胞治療へと発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) retain the ability to self-renew and differentiate into mesenchymal cells. Therefore, MSCs are strong candidates for use in regenerative medicine and cell therapy. Bone marrow-derived MSCs migrated to various tissues including periodontal tissue by chemotaxis, which plays important roles in anti-inflammatory response and tissue repair. We demonstrated that stimulation of inflammatory cytokines, IL-1, IL-6 and TNF- α , to increase the production and secretion of SDF-1 and MCP-1 in periodontal ligament-derived MSC-like cells. Interestingly, these chemokines specifically increased the migration of bone marrow-derived MSCs, but did not increase that of the periodontal ligament-derived MSC-like cells. In summary, our studies suggested that efficient regenerative medicine could be implemented by effective use of distinct MSCs obtained from various tissues.

研究分野：口腔生化学

キーワード：歯周組織再生 炎症抑制 炎症性サイトカイン 炎症性骨吸収 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSC) は自己複製能に加え骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞といった間葉組織構成細胞への多分化能を有した体性幹細胞である。歯周組織においても歯髄や歯根膜における MSC の存在が報告されている。我々は乳歯ならびに永久歯歯髄由来 MSC を比較解析した結果から、永久歯歯髄由来 MSC で細胞間接着因子 R-cadherin が特異的に発現していることを報告した。R-cadherin は網膜の血管新生、筋分化、脈管ならびに神経形成において重要な役割を担っている。我々は R-cadherin の発現増強が歯髄由来 MSC の骨芽細胞分化や脂肪細胞分化を抑制することを明らかにした。加えて骨髄由来 MSC との比較検討から、R-cadherin の発現が神経細胞マーカー遺伝子の発現と相関することを見出している。

炎症やそれに引き続く組織修復に伴い骨髄由来 MSC がケモカインの誘導にしたがって歯周組織を含む様々な組織へとホーミングする。加えて、歯周炎や慢性関節リウマチなどの炎症性骨疾患では、局所に浸潤したマクロファージから分泌される炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、TNF- など) の作用によって破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への過剰な分化誘導が促進され、過度の骨吸収が起こる。一方、骨髄由来 MSC は血行性に全身に運ばれて炎症部位に集積し、組織修復に働くこととされているが、炎症性骨吸収の場でのような働きをしているのかは明らかとされていない。特に、局所の骨吸収抑制作用発現のために、この細胞が分子レベルでどのように関わるかについては不明である。

2. 研究の目的

主として骨髄に存在する MSC はケモカインの作用により炎症部位に遊走・集積し、抗炎症作用や組織修復に働くこととされている。しかしながら、周囲組織構成細胞への炎症性サイトカインの影響や歯周組織修復におけるケモカインの影響などの詳細は明らかではない。本研究では MSC とその他の細胞間相互作用を解明することで、炎症部位における MSC の役割を検討した。

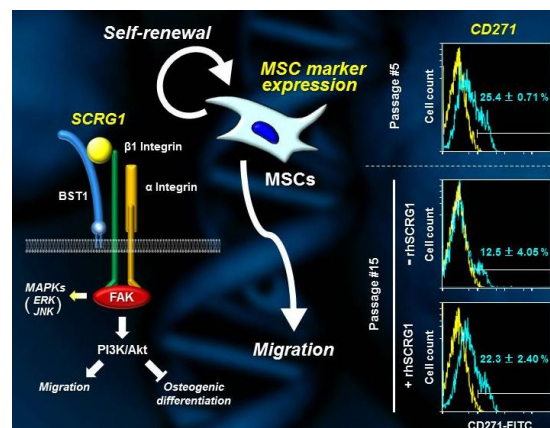
3. 研究の方法

本研究では、ヒト骨髄由来 MSC ならびに我々が樹立したラット歯根膜由来線維芽細胞 (SCDC2) 及び GFP マウス骨髄由来 MSC 株の SG2 を使用した。MSC が分泌する破骨細胞分化抑制因子 SCRG1 の性状を解析した。また、SCDC2 を IL-1 β 、IL-6、TNF- でそれぞれ処理し、ケモカインの発現細胞遊走促進効果を評価した。さらに SG2 と SCDC2 を直接共培養

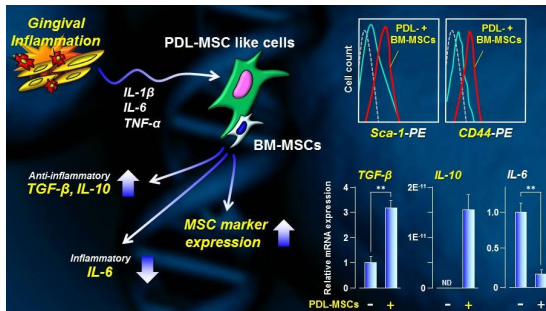
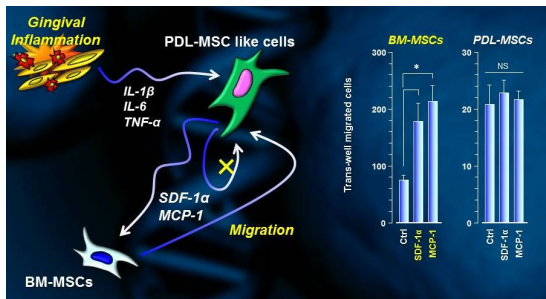
したものと、trans-well system を用いて細胞間接触しないように共培養 (間接共培養) したものをそれぞれ 48 時間培養後、SG2 の MSC マーカー (Sca-1、CD44、CD90) 発現をフローサイトメトリーで、各種サイトカインの mRNA 発現を RT-PCR で、また培養上清中に含まれる各種サイトカインの発現を ELISA 法にてそれぞれ検討した。

4. 研究成果

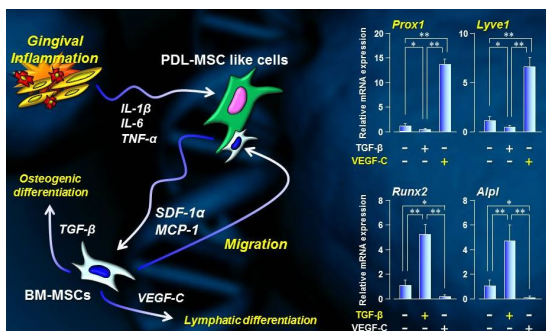
1) DNA マイクロアレイを用いて MSC が骨芽細胞へと分化する過程で発現量が変動する遺伝子を調査した結果、サイトカイン様ペプチド SCRG1 が同定された。シグナルペプチドを有した SCRG1 が細胞外へと分泌されることに着目し、SCRG1 の細胞膜受容体を探索した。架橋剤を用いた共免疫沈降法で解析した結果、SCRG1 は BST-1 ならびに integrin 1 と複合体を形成すること、さらにはこの複合体形成が FAK のリン酸化を誘導することを明らかにした。また、SCRG1 は MSC にオートクリン・パラクリンに作用することで FAK/PI3K/Akt 経路を活性化し、MSC の遊走を促進することが示された。興味深いことに、SCRG1 を添加して長期培養されたヒト骨髄由来初代培養 MSC は、主要な MSC マーカーである CD271 の発現、自己複製能ともに長期培養前と比較して遜色なく維持された。この事実は、SCRG1 が MSC の自己複製能や多分化能の維持を正に調節する可能性を示唆している。



2) SCDC2 を IL-1 β 、IL-6、TNF- で処理したところ、MCP-1 の発現が増強された。興味深いことに SDF-1 ならびに MCP-1 は SG2 の遊走能を促進する一方、SCDC2 の遊走能は促進しなかった。また SG2 を SCDC2 と直接共培養することで、SG2 において MSC マーカー Sca-1、CD44 の発現が上昇すると共に、炎症性サイトカイン IL-6 の発現が抑制され、抗炎症作用を有する IL-10 及び TGF- β の発現が促進された。一方で間接共培養では IL-6 の発現抑制及び IL-10、TGF- β の発現促進は確認されなかった。



3) TGF- 高感受性 MSC である SG2 は VEGFR3 を特異的に発現していた。リガンド VEGF-C は SG2 の増殖や遊走を促進されるとともに、ERK1/2 のリン酸化を増強した。TGF- ならびに VEGF-C の分化に与える影響を調べた結果、VEGF-C がリンパ管内皮細胞マーカー Prox1、Lyve1 の発現を促進するとともに骨芽細胞マーカー Runx2、Alpl、Ibsp、Bglap の発現を抑制したのに対し、TGF- は骨芽細胞の分化初期に発現する Runx2 と Alpl の発現を促進した。したがって、MSC の骨芽細胞ならびにリンパ管内皮細胞への分化は VEGF-C と TGF- によって相互に調節されることが示された。加えて、VEGF-C は MSC の特徴としての増殖や遊走を促進することから、VEGF-C は、MSC の特性を決定する上で重要な役割を果たしていることが示唆された。



我々の研究成果は、MSC とそれを取り巻く周囲細胞との相互作用が重要であることを強く示唆している。これら様々な性質や能力を有した MSC や周囲組織由来細胞を効果的に利用することによって、より効率的な再生医療や細胞治療へと発展することが期待される。

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 7件)

1) Igarashi Y., Chosa N., Sawada S., Kondo H., Yaegashi T., Ishisaki A. "VEGF-C and TGF- reciprocally regulate mesenchymal stem cell commitment to differentiation into lymphatic endothelial or osteoblastic phenotypes". International Journal of Molecular Medicine, 37:1005-1013, 2016.

2) Sawada S., Chosa N., Takizawa N., Yokota J., Igarashi Y., Tomoda K., Kondo H., Yaegashi T., Ishisaki A. "Establishment of mesenchymal stem cell lines derived from the bone marrow of GFP-transgenic mice exhibiting diversity in intracellular TGF- and BMP signaling". Molecular Medicine Reports, 13:2023-2031, 2016.

3) Aomatsu E., Takahashi N., Sawada S., Okubo N., Hasegawa T., Taira M., Miura H., Ishisaki A., Chosa N. "Novel SCRG1/BST1 axis regulates self-renewal, migration, and osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells". Scientific Reports, 4:3652, 2014.

4) Aomatsu E., Chosa N., Nishihira S., Sugiyama Y., Miura H., Ishisaki A. "Cell-cell adhesion through N-cadherin enhances VCAM-1 expression via PDGFR in a ligand-independent manner in mesenchymal stem cells". International Journal of Molecular Medicine, 33:565-572, 2014.

5) Yokota J., Chosa N., Sawada S., Okubo N., Takahashi N., Hasegawa T., Kondo H., Ishisaki A. "PDGF-induced PI3K-mediated signal enhances TGF- -induced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in the TGF- -activated MEK-dependent manner". International Journal of Molecular Medicine, 33:534-542, 2014.

6) 帖佐直幸, 菊池-青松恵美子, 西平宗功, 横田潤, 高橋典子, 近藤尚知, 杉山芳樹, 三浦廣行, 石崎明. "間葉系幹細胞の stemness を維持するシグナル伝達経路(総説)". 岩手医科大学歯学雑誌, 39:56-65, 2014.

7) Saito D., Kyakumoto S., Chosa N., Ibi M., Takahashi N., Okubo N., Sawada S.,

Ishisaki A., Kamo M. "Transforming growth factor- 1 induces epithelial-mesenchymal transition and integrin 3 1-mediated cell migration of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells through Slug". Journal of Biochemistry, 153:303-315, 2013.

〔学会発表〕(計 1 1 件)

1) 菊池(青松)恵美子 帖佐直幸 横田聖司 佐藤和朗 石崎明 “間葉系幹細胞由来ペプチド SCRG1 は RANKL 誘導性破骨細胞分化を抑制する” 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015.12.

2) 横田聖司 帖佐直幸 衣斐美歩 菊池(青松)恵美子 木村仁迪 客本斉子 加茂政晴 三浦廣行 佐藤和朗 石崎明 “顎関節組織由来細胞における TGF- 誘導性炎症性作用発現の調節機構を明らかにする研究” 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015.12.

3) 鈴木啓太 滝沢尚希 帖佐直幸 客本斉子 加茂政晴 八重柏隆 石崎明 “歯根膜線維芽細胞との細胞間相互作用は間葉系幹細胞の抗炎症作用を増強する” 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015.12.

4) 五十嵐靖之 帖佐直幸 客本斉子 加茂政晴 近藤尚知 石崎明 “VEGF-C は骨髄由来間葉系幹細胞の増殖や遊走を促進する” 第 57 回歯科基礎医学学会学術大会・総会, 2015.9.

5) 菊池-青松恵美子 帖佐直幸 横田聖司 南順子 佐藤和朗 三浦廣行 石崎明 “SCRG1 は受容体 BST1 を介して間葉系幹細胞の stemness 維持を調節する” 第 87 回日本生化学会大会, 2014.10.

6) 横田潤 五十嵐靖之 帖佐直幸 鬼原英道 近藤尚知 石崎明 “VEGF は TGF- によって誘導される間葉系幹細胞の骨分化を増強する” 第 87 回日本生化学会大会, 2014.10.

7) 澤田俊輔 佐々木大輔 伊東俊太郎 大川義人 帖佐直幸 石崎明 八重柏隆 “GFP マウス骨髄由来間葉系幹細胞の株化とサイトカイン関連遺伝子群の発現解析” 第 140 回日本歯科保存学会学術大会春季大会, 2014.6.

8) 滝沢尚希 澤田俊輔 伊東俊太郎 佐々木大輔 帖佐直幸 石崎明 八重柏隆 “GFP マウス骨髄由来間葉系幹細胞の分化能とサイトカイン受容体の発現” 第 140 回日本歯科保存学会学術大会春季大会, 2014.6.

9) 青松恵美子 帖佐直幸 大久保直登 高橋

典子 客本斉子 加茂政晴 佐藤和朗 三浦廣行 石崎明 “間葉系幹細胞が分泌する SCRG1 は骨分化を抑制する” 第 55 回歯科基礎医学学会学術大会, 2013.9.

10) 横田潤 帖佐直幸 鬼原英道 近藤尚知 石崎明 “複数サイトカインによる同時刺激は間葉系幹細胞の骨分化誘導能を促進する” 第 55 回歯科基礎医学学会学術大会, 2013.9.

11) 青松恵美子 帖佐直幸 大久保直登 高橋典子 客本斉子 加茂政晴 佐藤和朗 三浦廣行 石崎明 “サイトカイン様ペプチド SCRG1 は間葉系幹細胞の骨ならびに脂肪分化を抑制する” 第 86 回日本生化学会大会, 2013.9.

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織
- (1)研究代表者
高橋 典子 (Takahashi Noriko)
岩手医科大学・歯学部・研究員
研究者番号：60405777
- (2)研究分担者
帖佐 直幸 (Chosa Naoyuki)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号：80326694
- (3)連携研究者
石崎 明 (Ishisaki Akira)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：20356439