

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462259

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞に発現する骨形成抑制因子の探求-再生医療への応用を目指して

研究課題名(英文) Clarification of inhibitory factor for osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells (MSCs) expressed in the MSCs themselves

研究代表者

早乙女 進一 (Sotome, Shinichi)

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：20401391

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)：骨髄間葉系細胞(MSC)は分裂増殖を繰り返すと分化能が低下するだけでなく骨形成を抑制する因子を発現する。我々は、不死化したヒトMSCを使用し、抑制因子候補の過剰発現細胞、ノックアウト細胞の作製を行った。その結果、候補因子の一つであるSERPINB2に関してノックアウトに成功した。このSERPINB2のノックアウト細胞を培養して得られたconditioned mediumを用いてヒトMSCの骨芽細胞分化に対する影響を検討した結果、SERPINB2はBMP-2による骨分化に対しては促進的に働き、デキサメタゾンによる骨分化に対しては抑制的に働いていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：After repeated cell division, not only differentiation capabilities of MSCs decrease but also the cells express inhibitory factor for their own differentiation capabilities. We compared gene expression of P1-MSCs with P5-MSCs and narrowed down the candidates of the inhibitory factors to five genes: SERPINB2, EPHA5, SCN9A, NTF3 and SCIN. We tried to clarify the effects of each gene on osteoblastic differentiation using over expressing cells and knockout cells of each gene. Among the genes, we successfully established SERPINB2 knockout cells using an immortalized human cell-line, and further, we evaluated effects of SERPINB2 on osteogenic differentiation using a conditioned medium harvested from the culture of the knock out cells. The results indicated SERPINB2 had facilitative effects on osteoblastic differentiation of MSCs by BMP-2 and had inhibitory effects on osteogenic differentiation by dexamethasone.

研究分野：骨再生、人工骨

キーワード：骨髄間葉系細胞 骨再生 骨形成抑制因子

### 1. 研究開始当初の背景

【骨髄間葉系幹細胞に発現する骨形成抑制因子】骨髄間葉系幹細胞(MSC)は多分化能・増殖能を有し、骨・軟骨、脂肪細胞など、様々な細胞に分化することができ、組織再生治療への応用が期待されている。しかし、臨床応用に十分な数になるまで培養を続けると、MSCの分化能は低下してしまい、十分な成績が得られなくなる。実際に我々は、ヒトとサル MSC を用いて、MSCの分化能や骨形成能は、増殖とともに例外なく低下することを確認している。

そこで、増殖に伴う MSC の分化能低下のメカニズムを解明するために以下の実験を行った。サル MSC の継代培養を行い、継代1回のP1および継代5回のP5のMSCを得た。これを足場材に導入して筋肉内に移植し、5週間後に摘出して骨形成量を定量した。その結果、P5のMSCは、P1のMSCに比較して量は少ないものの骨形成を認め、P5のMSCsが骨形成能を有していることを確認した。また、P1の細胞数を2倍にしたP1(200)はP1(100)よりも骨形成量が増加し、移植細胞数の増加による骨形成促進効果を認めた。ところが、P5のMSCをP1に追加した場合(P1(100)+P5(100))(総細胞数は2倍)、骨形成量はP1単独(P1(100))より増加するどころか50%程度にまで減少した。(4例実施し、全例とも同様の結果)即ち、継代を重ねたP5細胞は骨形成能を有しているにも関わらず、同時に「骨形成を抑制する因子を発現」しており、その因子は継代と共に発現が亢進すると考えられた。そこで、手術症例より骨髄液を採取しヒトMSCを培養し、8例のMSCのP1細胞とP5細胞の遺伝子発現の比較をマイクロアレイで行い、継代培養を続けることによって発現が亢進する因子を同定し、この中に骨形成抑制因子が含まれると仮説を立てた。

【骨形成抑制因子の発現抑制実験】これらの中で、P5のMSCで最も発現が亢進している因子のひとつであるEPHA5に注目し骨形成抑制因子であるかを検証した。(EPHA5はレセプターチロシンキナーゼのひとつ)その結果、siRNAを用いてEPHA5をノックダウンすると、siRNA導入後3日間目頃まではEPHA5のmRNAの発現が70-80%までノックダウンされ、骨芽細胞の初期分化マーカーでありアルカリフォスファターゼ(ALP)の発現が約2倍に亢進することを確認し、EPHA5が骨形成の抑制因子として有力であることを確認した。しかしながら、培養を7日目まで維持するとsiRNAのノックダウンの効果は殆ど無くなり、ALPの発現も有意差が無くなってしまっていた。従って、MSCの骨芽細胞への最終分化段階にEPHA5が影響するかを確認するには至らなかった。ノックダウン効果の延長のためにレンチウイルスベクターを用いてshRNAによるノックダウンも試みたが、MSCへの導入

効率が低く、評価に値するほどのノックダウン効果は得られなかった。また siRNA、shRNAには、ターゲットに対する特異性が低く、完全には off target effect を否定できないという問題もある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、骨形成抑制因子の候補遺伝子の発現を抑制、もしくは過剰発現させることで、候補因子が実際にMSCの骨分化を抑制するか確認することである。特に候補遺伝子の発現抑制には、目的とする遺伝子を特異的にノックアウトできるゲノム編集技術を用いることとした。

### 3. 研究の方法

まず初めに、候補因子の絞り込みを行った。継代数の少ないMSCと多いMSCを比較したマイクロアレイの結果から、継代とともに発現が亢進する遺伝子上位5つ(SERPINB2, EPHA5, SCN9A, NTF3, SCIN)を検討対象として選択した。

【レンチウイルスベクターの作製】293細胞のcDNAから、上記遺伝子をクローニングする。続いて各遺伝子をDonor vectorに組み込みEntry cloneを作成する。これをレンチウイルス作製用vector plasmid(CSII-CMV-RfA-IRES2-Venus)に組み込み、他のpackaging plasmidとともに、293細胞に遺伝子導入し、各遺伝子を過剰発現させるためのレンチウイルスベクターを作成した。

#### 【過剰発現細胞の作製】

ヒト骨髄液から初代培養で得たMSCに上記レンチウイルスベクターを用いて各遺伝子の過剰発現を試みた。さらにレンチウイルスベクターによるヒトMSCへの遺伝子導入効率は著しく低いと報告されていることから、不死化したヒトMSCのクローン3種類を細胞バンクより入手し、目的遺伝子が導入されたMSCのクローニングを行った。

#### 【ノックアウト細胞の作製】

CRISPR-Cas9システムを用いて各遺伝子をノックアウトするため、各遺伝子の第一エクソンをターゲットとしたgRNA配列を設計しpSpCas9 BB-2A-GFPにクローニングした。

#### 【ノックアウト細胞のクローニング】

各ベクターをリポフェクションにて不死化ヒトMSCに導入し、翌日に薄い細胞密度で播種しGFPの蛍光を確認できるコロニーをクローニングリングで分離培養し、単一細胞由来の細胞を得た。複数得られた細胞の中で、目的遺伝子の発現が抑制されているものをノックアウト細胞として、以降の検討に使用することとした。

【過剰発現細胞、ノックアウト細胞の分化誘導】過剰発現およびノックアウト細胞を培養し、アスコルビン酸、グリセロリン酸、デキサメタゾン、BMP-2などを添加して骨芽細胞への分化誘導を行った。ALP染色、Von

Kossa 染色、PCR などで分化能を評価した。  
【コンディションドメディウムを用いた評価】SERPINB2 は分泌因子であるため、SERPINB2 ノックアウト細胞と、ノックアウトしていないコントロールの細胞を培養した培養液を保存し、手術検体の骨髓液を培養することで得られた MSC の骨芽細胞分化に与える影響を検討した。骨髓液を培養して得られた第 2 継代めの MSC を培養し、サブコンフルエントになったところで、骨芽細胞分化誘導を行った。(EPHA5 は膜タンパク質であるため、本方法での評価はできなかった)

【MSC に対するデキサメタゾン添加の影響】我々は、デキサメタゾン存在下に骨髓液を培養して得られる MSC は、デキサメタゾン非存在下で培養して得られる MSC よりも分化能が高いことを確認していた。そこで、デキサメタゾン添加により発現に影響を受ける因子も分化能に関与する子補として検討するために、マイクロアレイによる検討を行った。骨髓液を培養してえられた MSC にデキサメタゾンを添加し、6 時間後に RNA を分離精製し、デキサメタゾンを添加していない MSC と比較した。(n=6)

#### 4. 研究成果

【ヒト初代培養 MSC におけるレンチウイルスベクターによる過剰発現】股関節手術時に採取した骨髓液をばいようして得られた MSC に、レンチウイルスベクターを感染させたが、どの遺伝子に関しても、GFP の蛍光を発する MSC はごくわずかであり、また、増殖とともにその蛍光は弱くなり、PCR でも目的遺伝子の過剰発現を確認できるレベルにはならなかった。(なお、アデノウイルスを用いても同様の検討を行ったところ、導入効率は高いものの、GFP のみのコントロールでもアルカリフォスファターゼなど、骨分化に関する遺伝子発現が著しく影響を受け、本研究には使用することはできないと判断された)

【不死化 MSC による安定過剰発現細胞の確立】不死化ヒト MSC を 3 種類入手し安定発現クローンの確立を試みた。24well plate に播種した不死化 MSC にレンチウイルスベクターを感染させ、単一細胞由来のコロニーを得るために超低密度で継代した。約 1 週間の培養で単離可能なレベルまで単一細胞由来のコロニーが増大したところで、venus の蛍光を発しているコロニーを選択して単離し慶大培養し増殖をさせた。しかしながらほとんどのコロニーは、増殖とともに venus の蛍光を発しなくなってしまった。候補遺伝子 5 種類、不死化 MSC3 系統の計 15 パターンで試みたが、結局、EPHA5 の過剰発現株 1 つが得られただけであった。

【ノックアウト MSC の確立】5 種類の候補遺伝子に関して CRISPR-Cas9 システム用のベクターを作成した。ノックアウトの効果を検証するために、まずは 293 細胞にリポフェクシ

ョンによりベクターを導入し、各遺伝子に関して発現抑制の効果を確認した。SCIN 以外の遺伝子に関して発現抑制が確認され、設計した CRISPR-Cas9 システムが機能していることが確認された。そこで、SCIN 以外の 4 種類に関して、過剰発現の時と同様、24well plate でリポフェクションによりベクターを細胞内に導入し、翌日に超低密度で継代した。GFP による蛍光が確認された時点で、その部位にマーキングをしてコロニーが増大するのを待って単離した。しかしながら、リポフェクションのため導入効率が著しく低い上に、レンチウイルスの場合とは異なり、増殖とともに急激に蛍光が減衰してしまうため、この方法ではノックアウト細胞を単離することはできなかった。そこで 24well plate でのリポフェクション後に、限界希釈法による単一細胞由来クローンの採取を行った。4 遺伝子 x3 不死化細胞の 12 通りの組み合わせにおいて、それぞれ数 10~20 数個のコロニーを得て、全検体に対して目的遺伝子の発現をリアルタイム PCR にて確認した。その結果、1 種類の不死化 MSC において SERPINB2 遺伝子がノックアウトされた 2 コロニーが得られた。

【過剰発現細胞、ノックアウト細胞の分化能】入手できた 3 種類の不死化 MSC は、それぞれが性格の異なる細胞で、ひとつは増殖が極端に早くかつレンチウイルスでもリポフェクションでも遺伝子導入がほとんど不可能であり、もうひとつはある程度遺伝子導入は可能であるものの増殖が極端に遅く、これら 2 種類の MSC に関しては、過剰発現、ノックアウトともにコロニーは得られなかった。残りひとつの不死化 MSC に関しては EPHA5 の過剰発現クローンと SERPINB2 のノックアウトクローンが得られた。これらのコロニーに関して分化誘導を試みたところ、目的の遺伝子に関しては過剰発現、ノックアウトを達成しているものの、骨芽細胞への分化能が著しく低く、EPHA5、SERPINB2 の骨芽細胞分化への影響を検討することができなかった。

【コンディションドメディウムでの検討】SERPINB2 のノックアウト細胞を培養した際に保存したコンディションドメディウム(コントロールと比較して、SERPINB2 の含有量が低い)を骨髓液から培養して得られたヒト MSC3 種類(hMSC1, 2, 3)の分化誘導時に用い、分化能に与える影響を評価した。定量的 PCR の結果、hMSC1 と hMSC2 はコンディションドメディウムを用いてデキサメタゾンで分化誘導した場合、コントロールのメディウムと比較して ALP の発現が 1.5 倍程度に亢進し、BMP-2 で分化誘導した場合は ALP の発現は、逆に 1/2 程度に低下することが確認された。hMSC3 に関しては、分化誘導の方法に関わらず前記 2 つの hMSC に比較して ALP 活性が低かったが、デキサメタゾンによる分化誘導ではコンディションドメディウムを使用することにより ALP の発現は亢進した。また、これら 3 種類の hMSC のうち、hMSC1 と 2 は自

身の SERPINB2 の発現レベルが低かったのに対し、hMSC3 は、それ自身が SERPINB2 を高いレベルで発現していたことから、コンディションドメディウムとコントロールに含まれる SERPINB2 の差が相殺されてしまったものと考えられた。詳細なメカニズムは明らかにすることはできなかったが、SERPINB2 は BMP-2 による骨芽細胞分化は促進し、DEX による骨芽細胞分化は抑制している可能性が示唆された。

【MSC に対するデキサメタゾン添加の影響】MSC にデキサメタゾンを添加することにより、FKBP5 および CYP19A1 などが約 16 倍に、HEYL、BMP6、DKK1 が約 8 倍に発現が亢進していた。また、EGR2、CXCL1、EGR1、CXCL2 などが 1/16 程度にまで発現が低下していた。これらの因子には骨芽細胞分化に関与する因子が含まれており、今後はこれらの因子に関しても検討を進めていく。

#### 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 3 件)

Masaoka T, Yoshii T, Yuasa M, Yamada T, Taniyama T, Torigoe I, Shinomiya K, Okawa A, Morita S, Sotome S. Bone Defect Regeneration by a Combination of a  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Scaffold and Bone Marrow Stromal Cells in a Non-Human Primate Model. *Open Biomed Eng J*.(査読あり) 2016 Mar 18;10:2-11.

Yamada T, Yoshii T, Yasuda H, Okawa A, Sotome S. Dexamethasone Regulates EphA5, a Potential Inhibitory Factor with Osteogenic Capability of Human Bone Marrow Stromal Cells. *Stem Cells Int*. (査読あり) 2016;2016:1301608.

Yuasa M, Yamada T, Taniyama T, Masaoka T, Xuetao W, Yoshii T, Horie M, Yasuda H, Uemura T, Okawa A, Sotome S. Dexamethasone enhances osteogenic differentiation of bone marrow- and muscle-derived stromal cells and augments ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *PLoS One*. (査読あり) 2015 Feb 6;10(2):e0116462.

〔学会発表〕(計 3 件)

山田 剛史, 早乙女 進一, 安田 裕亮, 松本 連平, 吉井 俊貴, 大川 淳. 骨髄由来間葉系細胞(BMSCs)の質 骨形成抑制

因子候補 EphA5 が果たす役割と発現のメカニズム. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 2015.10.22 富山国際会議場(富山県富山市)

Yamada T, Yuasa M, Taniyama T, Yoshii T, Okawa A, Sotome S. After repeated division bone marrow stromal cells express inhibitory factors with osteogenic capabilities and EphA5 is a primary candidate.. 61th Annual meeting of the orthopaedic research society 2015.03.28 Las Vegas (USA)

山田剛史, 早乙女進一, 安田裕亮, 谷山 崇, 吉井俊貴, 大川淳. 骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)の質-骨形成抑制因子候補 EphA5 が果たす役割-. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014.10.09 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

〔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〕

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

早乙女 進一(SOTOME, Shinichi)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄付講座准教授  
研究者番号: 20401391

##### (2)研究分担者

大川 淳(OKAWA, Atsushi)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 30251507

吉井 俊貴(YOSHII, Toshitaka)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号: 50583754