

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15708

研究課題名(和文) ステムセルエイジングの制御に向けたアミノ酸による間葉系幹細胞未分化性維持

研究課題名(英文) Maintenance of undifferentiated state of mesenchymal stem cells using amino acids for the regulation of stem cell aging

研究代表者

窪木 拓男 (Kuboki, Takuo)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00225195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、骨髄由来間葉系幹細胞(BMSCs)の未分化維持に特定のアミノ酸が関わっていると考え、スクリーニングを行い、トリプトファンがBMSCsの幹細胞性維持に関与している事を突き止めた。実際、*in vitro*において、トリプトファン処理により、BMSCsのコロニー形成能や細胞遊走能が上昇することが明らかとなった。また、マウスにトリプトファンを腹腔内投与すると、骨髄内の間葉系幹細胞数が増加し、骨髄内の海綿骨量が増加すること、また、骨欠損部の骨再生が促進される事が明らかとなった。本結果は、骨再生の新たな治療法の開発や、幹細胞老化により生じる骨疾患の新たな治療に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：Amino acids are essential for life and cell metabolism. We hypothesized that amino acids can regulate the stem cell phenotype and we performed a screening and found tryptophan as stemness regulator of BMSCs. Indeed, migration and colony forming ability of BMSCs was enhanced by tryptophan treatment. *In vivo* mice bone defect model, Tryptophan accelerated bone healing, and increased bone volume and trabecular number compared to PBS-injected group. In summary, L-tryptophan enhances the stemness and osteoblastic differentiation of BMSCs, and may be used as an essential factor to accelerate bone healing and/or prevent bone loss, such as in the case of ageing and osteoporosis.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：アミノ酸 骨髄由来間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

我が国は、超高齢社会に突入し、老化に伴う加齢性疾患の増加が社会問題となっている。老化とは、時間の経過とともに生体に起こる生物学的な変化であり、テロメア、DNA 損傷、酸化ストレス、栄養、代謝などの老化シグナルが寿命に関わる事が知られている。近年、加齢変化による老化の特性の中で、本質的なものとして、幹細胞老化（ステムセルエイジング）の重要性が叫ばれるようになった。実際、骨髓内に数百個存在する造血幹細胞も 100 歳を過ぎると数個程度になることが報告されており、ステムセルエイジングを回避することは過剰な老化を防止し、健康寿命の延伸に繋がると考えられている。

一方、アミノ酸は体の様々な組織を構成しているタンパク質の構成要素としてだけでなく、細胞内や血漿などに遊離した形で存在し、アミノ酸自体がアミノ酸トランスポーターを介し、直接細胞の増殖や代謝を調整することで、生体内でさまざまな役割を担っていることが知られている。また、生体内に存在する主要 20 種類のアミノ酸のうち 9 種類は必須アミノ酸と呼ばれ、生体内で合成されず、食事から摂取しなければ欠乏するため、健康人や有病者の栄養状態や健康状態に、少なからず影響を及ぼすことが知られている。

そこで我々は、特定のアミノ酸の量をコントロールすることで、若年者においては組織中に多く存在する間葉系幹細胞の未分化性維持が達成できないかと考えた。そして、22 種類のアミノ酸を用いてスクリーニングを行なった結果、Tryptophan が間葉系幹細胞の未分化性維持に関わっていることを突き詰めた。

2. 研究の目的

本研究では、間葉系幹細胞の未分化維持因子として同定した Tryptophan の間葉系幹細胞および骨代謝に与える影響を *in vitro*, *in vivo* にて詳細に検討することとした。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨髓由来間葉系幹細胞の培養

ヒト骨髓由来間葉系幹細胞 (human Bone Marrow Stem Cell; hBMSC) は Lonza 社 (Basel, Switzerland) より購入し、これらの細胞を 15% ウシ胎仔血清, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin sulfate 含有 Alpha-modified Minimum Essential Medium (α -MEM) 培地 (ヒト通常培地) を用いて、37 °C, 5% CO₂ 気相下で培養を行った。アミノ酸前処理実験では、hBMSCs をサブコンフルエントまで培養後、10 μ M の各種アミノ酸を加え 48 時間培養した細胞を後述の解析に用いた。

(2) マウス骨髓由来間葉系幹細胞の単離、培養および動物実験モデル

L-Tryptophan (50 mg/kg) を 3 週間毎日腹腔内投与した 8 週齢雌性 C57BL/6 を頸椎脱臼により屠殺し、大腿骨から骨髓液を採取し、マウス骨髓由来間葉系幹細胞 (mouse Bone Marrow Stem Cell; mBMSC) を、Colony Forming Unit-fibroblasts (CFU-Fs) を指標にて分離した。これらの細胞を 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, 55 μ M β -Mercapto-ethanol (Life technologies™) 含有 α -MEM 培地 (マウス通常培地) を用いて、37 °C, 5% CO₂ 気相下で培養を行った。また、3 週間 L-Tryptophan を投与したマウスより大腿骨を採取し、海綿骨の形態学的解析を行った。

L-Tryptophan (50 mg/kg) を 7 日間毎日腹腔内投与した 5 週齢雌性 C57BL/6 マウスをイソフル®にて全身麻酔を行った後、下肢周囲を 70% エタノールで消毒、剃毛した後、皮膚を切開し膝関節を露出させた。そして、大腿骨に付着している筋肉を剥離し大腿骨を明示し、膝関節から中枢側に 5 mm の位置に歯科用ラウンドバーを用いて骨髓腔内に達する直径 1 mm の窩洞を形成し、術野を縫合閉鎖した。その後、14 日間毎日 L-Tryptophan の腹腔内投与を行った。

(3) 骨芽細胞、脂肪細胞分化誘導

hBMSCs, または mBMSCs をコンフルエントになるまでそれぞれの通常培地で培養後、10 nM dexamethasone, 2 mM β -glycerophosphate, 10 nM L-ascorbic acid phosphate 含有通常培地 (骨芽細胞分化誘導培地) に交換し、14 日間培養した。4% paraformaldehyde (PFA) にて固定し、1% アリザリンレッド S 染色液を用いて石灰化結節を染色した。

上記の骨芽細胞分化実験と同様に、hBMSCs, または mBMSCs をコンフルエントになるまで通常培地で培養後、10 μ g/mL insulin, 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine, 60 μ M indomethacin 含有通常培地に交換し、14 日間培養した。4% PFA にて固定し、0.5% オイルレッド O 染色液を用いて脂肪滴を染色した。

(4) フローサイトメトリー解析

hBMSCs を Accutase® で剥離した後、1% FBS 含有 PBS に懸濁した。抗体染色は、細胞懸濁液に蛍光標識された anti-SSEA-4 antibody を添加し、氷上にて 30 分反応させることを行なった。染色した細胞は、Accuri™ C6 (BD Biosciences) を用いて解析した。死細胞は前方、側方散乱光上でのゲーティングによって除外した。

(5) 定量性 RT-PCR

細胞から Purelink™ RNA mini kit を用いて mRNA サンプルを抽出・精製した。サンプルは iScript™ cDNA Synthesis Kit を用いて逆転写を行い、cDNA を得た。定量性 RT-PCR は Chromo4 (Bio-Rad Laboratories) を用いて、増幅反応には Kappa™ SYBR® FAST qPCR Kit を使用し、95 °C 3 秒、65 °C 25 秒のステップを 40 サイクル繰り返した。内部標準として 29s リボソーム RNA (s29) を使用した。

(6) 免疫細胞化学染色

hBMSCs を 96 well プレートに播種し、アミノ酸を加えて 48 時間通常培地で培養した。それらの細胞を 4 %PFA で 15 分間固定し、0.25 % Triton X-100 含有 PBS で透過処理をした。次に 5 %ヤギ血清を用いてブロッキングし、一次抗体の anti-CD146 mouse antibody, あるいは, anti-IgG mouse antibody を加えて 4 °C で一晩反応させた。次に、二次抗体の Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG [H+L] と核染色のために DAPI を同時に加えて 60 分間室温で反応させた。その後、蛍光顕微鏡を用いて観察し、陽性細胞の割合を算出した。

(7) 細胞遊走能の検討

細胞遊走能は、ボイデンチャンバーを用いて検討した。すなわち、24well プレートにボイデンチャンバーをセットし、上部チャンバーには、 5.0×10^3 個/well の濃度になるよう 1 %FBS 含有 α -MEM 培地で懸濁した細胞を播種した。下部チャンバーには 1 %FBS 含有培地を加え、37 °C、5 % CO₂ 気相下で培養を行った。培養 24 時間後にフィルター下面に遊走した細胞を 4 % PFA で固定し、Alexa Fluor® 546 Phalloidin にて室温で 60 分間反応させた。蛍光顕微鏡を用いて観察を行い、ランダムに 4 箇所を選択し細胞数をカウントした。

(8) コロニー形成能の検討

21 日間 L-Tryptophan を腹腔内投与したマウスならびに対照群のマウスの大腿骨より採取した 2.0×10^6 個のマウス単核球細胞を 6 cm² 培養皿に播種し、L-Tryptophan 非存在下で培養した。培養 21 日後に、1 % PFA 含有 0.1 % トルイジンブルー液にて固定、染色を行い、顕微鏡下にて、50 個以上の細胞数から形成されたコロニー数を計測した。

(9) 骨形態計測学的評価

回収したマウスの大腿骨は、SkyScan-1174 micro-computed tomography (micro-CT) を用いて解像度を 6.4 μ m に設定して撮影し、SkyScan 社製ソフトウェアを用いて解析した。解析対象は、大腿骨頸部成長板から 1 mm 近位の位置を遠位端とした、皮質骨より内部の範囲で約 2 mm 四方の立方体の計測部位として、海綿骨の骨塩量

(Bone Mineral Density; BMD)、海綿骨体積率 (Bone Volume/Tissue Volume; BV/TV) を測定した。

(10) 組織学的解析

大腿骨のサンプルは 4 % PFA にて固定した後、ギ酸・クエン酸ナトリウム水溶液 (22.5 %ギ酸, 10 % (W/V) クエン酸ナトリウム) を用いて室温で約 5 日間脱灰した。脱灰されたサンプルは通常法に従いパラフィン包埋し、5 μ m の厚みで切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行い、顕微鏡下で観察した。

(11) 統計解析

各データの統計学的有意性は、各条件に対して試料の数値を測定し、対応のない t 検定を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) L-Tryptophan が培養 hBMSCs の幹細胞性に与える影響

hBMSCs を L-Tryptophan (10 μ M) で刺激し、L-Tryptophan が間葉系幹細胞の幹細胞性に与える影響を間葉系幹細胞の未分化マーカーである CD146 の免疫細胞化学染色、コロニー形成能、細胞遊走能を指標に評価した。免疫細胞化学染色の結果、L-Tryptophan 処理により対照群と比較して CD146 陽性細胞の割合が有意に増加した (1.2 倍, $p < 0.001$)。また、L-Tryptophan にて 2 日間処理した hBMSCs を用い、ボイデンチャンバー法にて細胞遊走能を評価した。その結果、L-Tryptophan 処理した hBMSCs において有意に細胞遊走能が亢進していた (1.5 倍, $p < 0.01$)。

次に、L-Tryptophan 処理が hBMSCs の脂肪細胞分化ならびに骨芽細胞分化に与える影響を検討するため、L-Tryptophan 存在または非存在下にて hBMSCs を 2 日間培養した後、それらの細胞を L-Tryptophan 非存在下で脂肪細胞分化誘導培地または骨芽細胞分化誘導培地にて培養を行った。培養 21 日後に脂肪細胞分化への影響を検討した。その結果、脂肪滴の形成は L-Tryptophan 処理群において抑制され、また、脂肪細胞分化マーカーの一つである Lipoprotein lipase (LPL) の遺伝子発現には差は認めなかったが、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR- γ) の遺伝子発現量は対照群と比較し有意に減少した (0.63 倍, $p < 0.05$)。また、骨芽細胞分化誘導培地にて 21 日間培養した結果、L-Tryptophan 処理した細胞群において、対照群と比較し、カルシウム沈着を多く認め、骨芽細胞分化マーカーである Osteopontin (OPN) (2.4 倍, $p < 0.01$)、Osteocalcin (OCN) (1.3 倍, $p < 0.05$) の遺伝子発現量は有意に増加した。

(2) L-Tryptophan 全身投与が骨髄内 hBMSCs

の幹細胞性に与える影響

L-Tryptophan の全身投与が骨髄内 mBMSCs の幹細胞性に与える影響を検討するため、21 日間マウス腹腔内に L-Tryptophan を投与したマウスより、mBMSCs を採取し、コロニー形成能、SSEA-4 陽性細胞数、Oct-4、Nanog、Sox2 の遺伝子発現量を指標に評価した。CFU-Fs アッセイの結果、L-Tryptophan を投与したマウスから採取した骨髄には、対照群のマウスと比較し、コロニー形成能が高い mBMSCs が多数存在していた (1.5 倍, $p < 0.05$)。また、フローサイトメトリーを用いた解析の結果、L-Tryptophan 投与マウス由来 mBMSCs の SSEA-4 陽性率は、対照群の mBMSCs と比較して有意に高く (1.6 倍, $p < 0.05$)、未分化マーカーである Sox2 の遺伝子発現量に差を認めなかったが、Oct4 (3.9 倍, $p < 0.05$)、Nanog (8.5 倍, $p < 0.001$) の遺伝子発現量は L-Tryptophan 投与マウス由来 mBMSCs において有意に高かった。

次に、mBMSCs の脂肪細胞分化ならびに骨芽細胞分化に与える影響を確認するため、同様の細胞を用い、それぞれ脂肪細胞分化誘導培地および骨芽細胞分化誘導培地にて培養した。培養 21 日後に mBMSCs の脂肪細胞分化への影響をオイルレッド O 染色および脂肪細胞分化マーカーの一つである Ppar- γ 、Lpl の遺伝子発現量を定量性 RT-PCR 法にて検討した。その結果、脂肪滴の形成および Ppar- γ 、Lpl の遺伝子発現量には差を認めなかった。一方、骨芽細胞分化に与える影響を検討した結果、L-Tryptophan 投与マウス由来 mBMSCs において、対照群と比較し、カルシウム沈着を多く認め、骨芽細胞分化マーカーである Opn (2.6 倍, $p < 0.05$)、Ocn (10.2 倍, $p < 0.001$) の遺伝子発現量は有意に高かった。

(3) L-Tryptophan 全身投与がマウス大腿骨海綿骨量に与える影響

L-Tryptophan の全身投与が大腿骨海綿骨量に与える影響を検討するため、上記の実験同様、21 日間マウス腹腔内に L-Tryptophan (50 mg/kg) を投与したマウスより大腿骨を回収し、micro-CT を用い骨形態計測学的に評価した。その結果、L-Tryptophan 投与群は対照群と比較して、大腿骨の海綿骨量の増加を認め、定量的解析の結果、海綿骨骨塩量 (1.4 倍, $p < 0.001$)、海綿骨体積率 (2.1 倍, $p < 0.01$) が有意に増大していた。

(4) L-Tryptophan 全身投与が実験的骨欠損の創傷治癒に与える影響

マウス大腿骨骨欠損モデルを用いて、L-Tryptophan が骨再生に与える影響を検討した。Micro-CT 解析の結果、L-Tryptophan 投与群は骨欠損作製部位に、対照群と比較して著名な X 線不透過像が観

察され、定量的解析の結果、L-Tryptophan 投与群において有意に骨が再生していた (1.8 倍, $p < 0.05$)。また、組織学的解析の結果、L-Tryptophan 投与群では対照群と比較して、より厚い皮質骨が再生されている像が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

該当なし

〔学会発表〕(計 4 件)

① Pham HT, Ono M, Hara ES, Oida Y, Nguyen HT, Akiyama K, Kuboki T. Tryptophan Enhances the Stem Cell Phenotype and Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells in vitro and in vivo. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会. 東京, 日本. 2015. 7. 23-25. 発表日 2015. 7. 24.

② Pham HT, Ono M, Hara ES, Oida Y, Nguyen HT, Akiyama K, Kuboki T. Effect of Tryptophan to Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cells on the Stemness and Osteogenesis in vitro and in vivo. The 36th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Seattle, USA. 2015. 10. 9-12. 発表日 2015. 10. 12.

③ Pham HT, Ono M, Hara ES, Oida Y, Nguyen HT, Akiyama K, Kuboki T. Tryptophan Enhances Stemness and Osteogenesis of Bone Marrow Stromal Cells. The 63rd Annual Meeting of JADR. Fukuoka, Japan. 2015. 10. 30-31. 発表日 2015. 10. 30.

④ Pham HT, 大野充昭, Hara ES, Nguyen HT, 吉岡裕也, 笈田育尚, 秋山謙太郎, 大橋俊孝, 窪木拓男. 必須アミノ酸トリプトファンは骨形成を促進する. ブレインストーミング 2016 at カリヨンハウス in 瀬戸内市. 瀬戸内, 日本. 2016. 9. 21-22. 発表日 2016. 9. 21.

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪木 拓男 (KUBOKI Takuo)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00225195

(2) 研究分担者

大野 充昭 (ONO Mitsuaki)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：60613156

前川 賢治 (MAEKAWA Kenji)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：20304313

秋山 謙太郎 (AKIYAMA Kentaro)
岡山大学病院・講師
研究者番号：70423291

大島 正充 (OSHIMA Masamitsu)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：00548307

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし