

令和元年5月25日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06880

研究課題名(和文) 個体レベルにおける生体内間葉系幹細胞のメカノセンシング機序解明

研究課題名(英文) Mechanosensing mechanism of mesenchymal stem cells in vivo

研究代表者

河邊 憲司 (Kawabe, Kenji)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60803856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：メカニカルストレス(MS)による骨形成促進のメカニズム解明を目的として、取り出したマウス頭頂骨に対してバネによる張力MSを負荷した。頭頂骨縫合部は時間依存的な伸長および骨芽細胞マーカーの発現上昇が観察され、MSにより膜性骨形成が促進することが明らかとなった。また、その機序として核の変形、YAP/TAZの核内移行が関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機械的ストレスにより骨形成が促進するとは古くから知られていたが、その詳細な機序は明らかとなっていない。本研究により、膜性骨化部位である頭頂骨では縫合部に存在する細胞がMSに反応し、骨芽細胞へ分化することが示唆された。これまでに内軟骨性骨化部位では骨細胞がMSを受容すると報告されていたが、膜性骨化部位では骨細胞ではなく未分化幹細胞がMSの受容細胞である可能性があり、今後の骨発生に関する研究や創薬を考える上で重要な結果であると思われる。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the mechanism of bone formation promotion by mechanical stress, tensile stress was applied to the extracted mouse parietal bone. In the parietal suture, time-dependent elongation and expression of osteoblast marker were observed, and tensile stress induced membranous bone formation. In addition, it was thought that nuclear deformation and nuclear translocation of YAP/TAZ might be involved as the mechanism.

研究分野：発生学

キーワード：間葉系幹細胞 メカニカルストレス YAP/TAZ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内では常に機械的・力学的ストレス(メカニカルストレス:MS)が働いている。近年、細胞は基質の牽引(内力)によって周囲の情報を得ることで増殖・分化が変化することや、外部からの力(外力)に対する内力の変化によって、変形・遊走を行うことが報告され(Shirakawa *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 2014; Lo *et al.*, *Biophys. J.*, 2000), 生体をより深く理解するためにはMSの研究は不可欠である。骨においても、MSによって骨形成が増加することが知られている。しかしながら、現在は骨細胞や骨芽細胞、破骨細胞を用いた単独培養系や、尾部懸垂や卵巣摘出などの骨粗鬆症モデルでの実験系が主であり、細胞で得られた結果と個体の変化を橋渡しする研究は少なく、生体内で、どのような細胞集団がMSに反応し、どのような分子がメカノセンサーとなっているかは不明な点が多く、MSの機序は解明されていない。

骨は圧電性を持ち、骨細胞が緻密なネットワークを形成していることから、従来、骨細胞がMSを感知し、他の細胞にシグナルを伝達することで骨が成長すると考えられてきた。しかしながら、新生児の頭蓋骨の成長では、重力などによる圧刺激ではなく、成長に伴う牽引刺激が与えられており、間葉系幹細胞(MSC)が骨芽細胞へ分化して直接骨細胞となる膜性骨化により縫合部が骨に置換される。したがって、長管骨とは異なるMSの機序が働いている可能性がある。これまでに、MSCや骨芽細胞も他の細胞と同様にストレスファイバーや接着因子をメカノセンサーとして利用し、分化や増殖を変化させることが報告されている(Shung *et al.*, *Cell. Signal.*, 2016; Engler *et al.*, *Cell*, 2006)。したがって、生体内においてもこれらの細胞がMSに反応することで骨形成が促進されていると考えられる。しかしながらこれまで以下の問題があり、骨形成における生体内のMS応答性細胞は同定されてこなかった(図1)。

問題1: 細胞レベルでのMS応答性の知見と個体レベルでの骨形成変化を結びつける報告が少なく、生体内において、最初に応答性を示す細胞は同定されていなかった。また、MSにより誘導される生体内の骨特異的なシグナル伝達は不明であった。

問題2: これまで生体内で機能するMSCの各分化細胞への階層性/系譜を区別できる分化マーカーが同定されていなかったため、骨形成において、どのような系譜のどのような分化レベルの細胞が時空間的に集積しているのかを検討できなかった。

これに対し申請者らは、以下の策を準備した。

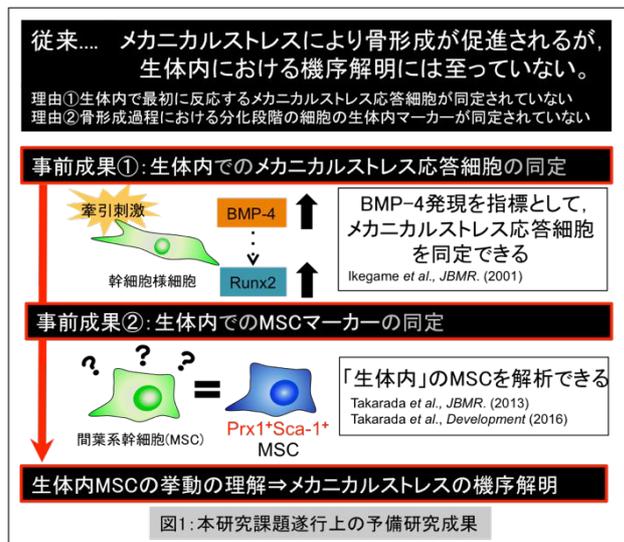
問題1に対し: マウスから取り出した頭頂骨をパネにより牽引し培養することで、より生体に近い状態のMSによる骨形成の観察を可能にした。この結果、MSによって縫合部に存在する幹細胞様細胞が最初に骨形成因子4(BMP-4)発現を上昇させ、それに続いてMSCでの骨芽細胞分化の必須因子であるRunx2発現が上昇した(Ikegame *et al.*, *JBMR*. 2001)。したがって、MSCと推定される細胞集団がメカノセンサー細胞であり、BMP-4が骨特異的なMS応答因子であることを発見した(図1)。

問題2に対し: Runx2を特定の細胞・時期に欠損可能なマウスを開発し、同マウスでのフローサイトメトリー解析

により、未分化マーカーであるPrx1⁺Sca-1⁺のMSCは未分化度が高く、Sca-1⁻となり、Prx1⁻となることで骨芽細胞へ分化することを発見した(Takarada *et al.*, *Development*. 2016)。したがって、どのような目印を持つMSCが、どのような細胞となり、骨形成に重要であるかを生体内で明示することに成功した(図1)。さらに、CD抗原の発現解析によりPrx1⁺Sca-1⁻の細胞はさらなる集団に分割できることを発見しており、BMP-4発現が高い集団を確認している(未発表)。

2. 研究の目的

これまでの事前研究知見を基にMSによる骨形成過程における生体内MSCの動態を検討し、メカノセンサー分子やシグナル伝達を同定することでMSCによる骨形成機序(どのような性質を持つMSCがMSを感知し、どのようにして骨形成を行うのか?)を理解することができる。本研究では以下の2点を行う。



MS 応答性細胞の同定：どのような性質(表面抗原，発現遺伝子)を持つ細胞が MS に応答するのか。

メカノセンサー分子・細胞内シグナルの探索：メカノセンサーにより検出した力をどのような生化学的情報に変換し，骨特異的なシグナル伝達としているのか。

3．研究の方法

蛍光蛋白質を導入した遺伝子改変マウスを用いて，時空間的に MS による細胞の動態を追跡し，生体内における応答細胞を同定する。同定された細胞がどのような性質を有した細胞集団であるかを免疫染色により明らかにする。

4．研究成果

新生仔 5 日齢のマウスから取り出した頭頂骨を用いてバネによる伸展 MS を負荷し，縫合部と alkaline phosphatase (ALP) 染色領域の変化を経時的に観察した。伸展 0.2 g のバネを負荷した頭頂骨に対して alizarin red 染色を行い，骨を可視化したところ，経時的な縫合部の伸長が観察された。alizarin red 非染色部位を縫合部として，両端の染色部位からの直径が最も短くなる部分を縫合部サイズとして計測すると，MS 負荷前は 180 μm であった縫合部サイズは，MS 負荷 6 時間後から有意に伸長し，48 時間目まで増加し続けた。次に，MS 負荷を行った頭頂骨に対して ALP 染色を行うことにより，MS 負荷による ALP 染色領域の拡大を観察した。MS 負荷前では頭頂骨近傍に ALP 陽性領域は存在し，縫合部は ALP 陰性であった。MS を負荷することにより 6 時間目から縫合部とともに ALP 陽性領域も伸長を開始し，24 時間目まで増加し続けた。しかしながら，両端の ALP 陽性領域が癒合することではなく，陰性領域のサイズはほぼ一定であった。

次に，伸展が 0 g, 0.08 g, 0.1 g, 0.2 g のバネを用いて，強度の異なる MS を頭頂骨縫合部に 48 時間負荷し，ALP 染色陽性/陰性領域の変化を薄切切片により細胞レベルで観察した。0 g のコントロール群と比較し，0.08 g の MS では ALP 染色陽性部位進展は観察されなかった。一方，0.1 g の MS では縫合部に ALP 染色陽性領域が出現し，0.2 g では ALP 染色陽性領域が縫合中心部へ向かって進展していることが観察された。この結果から，頭頂骨の骨形成を促進する伸展刺激は 0.2 g が適していると考えられたため，以降の実験は伸展 0.2 g のバネを用いた。

これまでの結果より，MS によって頭頂骨縫合部が伸長するとともに，ALP 染色陽性領域は縫合部中央にむけて進展していくことが示された。しかしながら，伸展刺激により縫合部自体も伸長することから正確な ALP 染色陽性領域の伸長は不明であった。そこで，頭頂骨の連続薄切切片を用いて，カルシウムを染色する von Kossa 染色により骨の位置を特定するとともに ALP 染色を行い，MS による ALP 染色陽性領域の伸長の経時変化を観察した。伸展刺激 6 時間目からすでに縫合部内において ALP 染色陽性領域の進展が開始しており，経時的に縫合部中央にむけて伸長することが分かった。さらに，von Kossa 染色の結果より，伸展刺激により縫合部は伸長するが，頭頂骨には著明な変化はないことが確認された。以上のことから頭頂骨に対する MS によって縫合部の伸長とともに頭頂骨末端部から ALP 染色陽性領域が中心部へ向けて経時的に進展することが明らかとなった。

当研究室はこれまでに，頭頂骨縫合部に存在する Prrx1 陽性な MSC から骨芽細胞が分化し，頭頂骨の膜性骨化に関与することを報告している(Takarada *et al.*, *Development*, 2016)。したがって，縫合部に存在する Prrx1 陽性な MSC が MS を受容することで骨芽細胞へ分化し，ALP 陽性領域が伸長していくと予想を立てた。そこで，Prrx1 陽性細胞に EGFP を導入した *PCEG* マウスを用いることで，頭頂骨縫合部に存在する Prrx1 陽性細胞を可視化し観察を行った。まず，伸展 0.2 g の MS を負荷した頭頂骨を経時的に蛍光顕微鏡を用いて観察した。MS 負荷 0 時間の縫合部において GFP の蛍光が観察され，骨部分では蛍光は観察されなかった。MS の負荷により縫合部が伸長し，それに伴い，蛍光が観察される面積が増加した。さらに，MS を経時的に負荷した頭頂骨の切片を作製し，GFP に対する免疫染色を行った。MS を負荷していない頭頂骨では，Prrx1 陽性細胞は縫合中心部や骨膜に存在していた。MS を 6 時間負荷した頭頂骨においても，縫合中心部や骨膜に Prrx1 陽性細胞が存在し，大きな変化は観察されなかった。一方，MS を 12 時間以上負荷した頭頂骨では，Prrx1 陽性細胞の数が増加する傾向が見られ，また，縫合部や骨膜以外にも骨の周辺部に陽性細胞が観察された。両骨端間の縫合部に存在する GFP 陽性細胞数と Hoechst 陽性数を計測し，その割合を GFP 陽性細胞率としたところ，MS 時間依存的な GFP 陽性細胞数の増加が観察された。

次に，連続薄切切片を用いて，ALP 染色，GFP に対する免疫染色を行い，ALP 陽性/陰性領域における Prrx1 陽性細胞の動態を検討した。ALP 陽性領域では Prrx1 陽性細胞は存在しなかったが，ALP 陰性領域や ALP 陽性領域を取り囲むように Prrx1 陽性細胞が観察された。以上の結果より，MS に反応した Prrx1 陽性な MSC が細胞数を増加させるとともに，骨芽細胞へ分化することにより ALP 陽性領域が伸長される可能性があった。

当研究室では MSC から骨芽細胞への分化の系譜/階層性を明らかにしており，Prrx1 陽性な MSC が Prrx1 陰性となるとともに Runx2 発現を上昇させ，前骨芽細胞マーカーである Osterix 陽性となり，type I collagen 陽性な骨芽細胞へと分化し膜性骨形成に関与することを報告している。MS によって惹起される頭頂骨の形成においても，同様の細胞系譜/階層性を有

する可能性があることから、連続薄切切片を用いて、ALP 染色および、Runx2, Osterix の免疫染色を行った。MS を負荷していない頭頂骨の切片において、Runx2 陽性細胞は縫合部中心や骨を取り囲むように存在し、MS 負荷 6 時間目から Runx2 強陽性細胞は増加する傾向が観察された。ALP 染色像と Runx2 免疫染色像を比較すると、Runx2 強陽性細胞は ALP 陽性領域に存在し、特に ALP 陽性領域先端に密集しており、ALP 陰性領域(縫合部中心や ALP 陽性領域周囲)には Runx2 弱陽性細胞や陰性細胞が存在していた。また、ALP 陽性領域の中心部には細胞自体が存在していなかった。一方、MS を負荷することにより新規に形成された ALP 陽性領域では、細胞が密に存在しており、その細胞のほとんどは Runx2 強陽性であった。

次に、Osterix に対する免疫染色を行った。Runx2 陽性細胞と同様に Osterix 陽性細胞も、骨の周囲や縫合部の ALP 陽性領域に存在しており、特に ALP 陽性領域先端に密集していた。また、MS の負荷 6 時間目から、陽性細胞は増加する傾向が見られた。さらに、新規に形成された ALP 陽性領域において、ほとんどの細胞は Osterix 陽性であり、ALP 陽性領域の周囲や ALP 陰性領域には Osterix 陽性細胞は存在しなかった。したがって、伸展 MS の負荷により進展した ALP 陽性領域は Runx2 および Osterix 陽性細胞によって形成されており、頭頂骨に対する MS は膜性骨化を誘導することが明らかとなった。

MSC がどのような機序で MS を感知するかは明らかとなっていないが、接着力の強弱により分化指向性が異なることから、接着斑に結合するストレスファイバーに力が負荷されることにより、MS に対して応答すると予想される。また、ストレスファイバーは核と強固に結合しており、ストレスファイバーの伸展変化により核が変形して核内 DNA の分布が変化することや、核の変形が増殖活性に影響を与えることが報告されており(Nagayama et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2008; Nagayama et al., *FEBS Lett.*, 2011; 長山・松本, 人工臓器, 2013), MS による核の変形はメカノセンサーの一種である可能性がある。そこで、伸展 MS を負荷した頭頂骨における核の変形率を定量し、MS による変化および、ALP 陽性/陰性領域との比較を行った。ALP 陽性領域は Osterix 陽性細胞領域と一致するため、頭頂骨切片に対して抗 Osterix 抗体による免疫染色を行い、対物レンズ 100 倍で撮影した画像から Osterix 陽性/陰性細胞の核の長軸・短軸を計測して短軸に対する長軸の割合を計算し、核の変形率とした。一枚の画像中の Osterix 陽性細胞の核はすべて計測し、Osterix 陰性細胞は、Osterix 陽性細胞と Y 軸がほぼ等しい ALP 陰性領域の細胞をすべて計測した。計測の結果、MS が負荷されていない頭頂骨においても、Osterix 陰性細胞は陽性細胞に比べ核が変形していた。さらに MS を負荷することによって Osterix 陰性細胞は陽性細胞に比べ 2 倍以上細長く変形していた。しかしながら、MS を負荷しても Osterix 陽性細胞の核の変形率には変化がなかった。以上のことから、未分化な MSC は核を変形することによって MS を受容し、骨芽細胞へ分化することが示唆された。また、分化した細胞は核が強固であるために MS を受容せず、このことが正常な組織構造の形成に関与している可能性がある。

転写補助因子である YAP/TAZ は MS に反応し核内移行することが報告されている(Varelas, *Development*, 2014)。そこで、YAP/TAZ の免疫染色を行い、MS による核内移行変化を検討した。予想に反して、MS を負荷していない頭頂骨においても、ALP 染色陰性領域である縫合部の中央では、YAP/TAZ が核内移行していた。一方、ALP 染色陽性領域では、YAP/TAZ は核内と細胞質の両方に存在していた。MS 負荷によって YAP/TAZ の核内移行に変化はなく、ALP 染色陰性領域では核内移行し、ALP 染色陽性領域では細胞質と核内に存在していた。

ALP 染色陽性領域には Prrx1 陽性細胞は存在しない一方で、ALP 染色陰性領域には Prrx1 陽性細胞が豊富に存在していた。また、3-7 の結果より、ALP 染色陽性領域では YAP/TAZ は細胞質および核内に存在していたが、ALP 染色陰性領域では主に核内に存在していた。これらのことから、Prrx1 を発現する未分化な MSC は YAP/TAZ が核内移行しており、MS に反応して YAP/TAZ が細胞質に移行することで ALP 染色陽性な細胞へ分化する可能性が考えられた。そこで MS を負荷した頭頂骨の連続薄切切片を用いて、ALP 染色および、YAP/TAZ と GFP の免疫染色を行い、Prrx1 陽性細胞の動態と YAP/TAZ の細胞内局在を検討した。YAP/TAZ, GFP 免疫染色の結果、Prrx1 陽性細胞が存在する ALP 陰性領域では YAP/TAZ は核内移行しており、ALP 染色陽性領域では Prrx1 陽性細胞は存在せず、YAP/TAZ は核内、細胞質内共に染色された。

MS により頭頂骨縫合部中央に向けて ALP 染色陽性領域が伸長する。また、増殖が盛んな Prrx1 陽性細胞が ALP 染色陰性領域に豊富に存在することから、MS によって Prrx1 陽性細胞が増殖し、分化することで ALP 染色陽性領域が伸長すると仮定した。そこで G1 期, S 期, G2 期, M 期に存在する、細胞増殖のマーカーである Ki-67 の免疫染色を行い、連続薄切切片に対する ALP 染色像と比較した。その結果、MS を負荷していない頭頂骨では、ALP 陽性領域の先端部分において、Ki-67 陽性細胞が存在し、細胞分裂が盛んに行われていることが明らかとなった。さらに、MS 負荷 12 時間目までは Ki-67 の染色像に大きな変化は見られないが、24 時間目では ALP 陽性領域先端のみならず、縫合部全体や骨膜においても Ki-67 陽性細胞が出現した。しかしながら、ALP 陽性領域には Ki-67 陽性細胞がほとんど存在せず、主に ALP 陰性領域で細胞増殖が行われていた。両骨端間の Hoechst 陽性数と Ki-67 陽性細胞数を計測し、Ki-67 陽性細胞率を算出したところ MS 負荷 24 時間目において Ki-67 陽性細胞率が増加した。

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Daisuke Yamada, Koichi Fujikawa, Kenji Kawabe, Takuya Furuta, Mitsutoshi Nakada, Takeshi Takarada (2018) RUNX2 promotes malignant progression in glioma. *Neurochem. Res.*, 43, 2047-2054. 査読あり

Yukako Shirai, Kenji Kawabe, Ikue Tosa, Shunpei Tsukamoto, Daisuke Yamada and Takeshi Takarada (2019) Runx2 function in cells of neural crest origin during intramembranous ossification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 509, 1028-1033. 査読あり

河邊 憲司, 宝田 剛志 (2019) 間葉系幹細胞の階層性・系譜の分子理解. 日本薬理学雑誌, 153, 67-72. 査読なし

〔学会発表〕(計 2 件)

Kenji Kawabe, Ryota Nakazato, Takeshi Takarada (2018) Blood brain barrier integrity is regulated by clock genes. 第41回日本神経科学会, 神戸, 7月26~7月29日

土佐 郁恵, 山田 大祐, 塚本 俊平, 河邊 憲司, 大野 充昭, 大橋 俊孝, 窪木 拓男, 宝田 剛志, 骨髄内加齢変化の runx2 コンディショナル欠損による模倣, 第41回日本分子生物学会年会, 横浜, 2018年11月28~30日

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者:なし

(2)研究協力者:なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。