

機関番号：15101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780265

研究課題名 (和文) 間葉系幹細胞の骨分化に関わるデコリン糖鎖種の同定・機能解析と骨組織再生

研究課題名 (英文) Identification and functional analysis of sugar chains involved in bone differentiation of mesenchymal stem cells, and bone regeneration

研究代表者 保坂善真 (HOSAKA YOSHINAO)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：00337023

研究成果の概要 (和文)：

骨分化に深く関わるデコリン糖鎖 CS/DS の種類を同定し、その機能を解析した。そしてその糖鎖を応用した骨組織再生を試みた。培養細胞を用いた実験で、検索した 5 種類のデコリン(CS/DS) 糖鎖 (CS-A、B、C、D および E) のうち、ALP 活性や石灰沈着量を指標に評価したところ、CS-E が最も強い骨分化誘導能を備えていた。Wistar ラット頭蓋骨に作成した骨欠損部位に CS-E 含有スポンジ(2ug/穴)を埋入したところ、骨組織の再生を確認した。なお、実験期間である 15 週間での再生率は、欠損部の約 30%に留まったが、CS-E による骨再生を誘導できたことは、新たな素材(CS-E)を用いた再生医療法を提示する一歩となった。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we identified CS/DS sugar chain, which closely related to bone differentiation, and then analyzed its functions. Experiments using cultured cells, five types CS/DS (CS-A, -B, -C, -D and -E) chain were compared the ALP activity and calcium deposition and resulted CS-E had the strongest ability to induce bone differentiation. The CS-E-containing sponges (2ug / defect) were implanted in the site of bone defects created in Wistar rat skull, the bone regeneration was confirmed. The rate of bone regeneration in a 15-week experimental period was approximately 30% of defects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・畜産学

キーワード：間葉系幹細胞、骨分化、コンドロイチン硫酸

## 1. 研究開始当初の背景

「糖鎖」は、細胞表面および細胞外マトリクスで糖鎖単独、あるいはコアタン

パクと共有結合したプロテオグリカン (PG)として多彩な機能を示す。これまで PG は間葉系組織や中枢神経系の形態形

成や恒常性の維持が主たる役割と考えられていた。しかし近年は、PG とりわけ糖鎖が間葉系幹細胞 (MSC) の増殖や分化を強力に制御する因子であることが明らかになってきた。MSC から各組織に分化する過程では、様々な因子が時間的・空間的に制御されて発現する必要があり最終的に組織が完成する。細胞増殖や分化に関わる糖鎖の発見とその機能の解明は、細胞の分化・成熟ステージの人為的制御すなわち、器官・組織の再生を容易にし、短期間で大量の MSC を得られる可能性があり、早期の創傷治癒も望める。

報告者は、先行研究となる「間葉系幹細胞から運動器へ分化する過程でのデコリンの役割と機能の解明」(若手 B; 平成 19-20 年度)で RNAi によるデコリンノックダウン MSC (siDT) を作製・応用し解析した。その結果、デコリンが非常に興味深い機能を有する PG であることを明らかにした。すなわち、siDT は細胞増殖が抑制されていること、siDT を骨分化誘導しても ALP 活性が低いこと、そして、骨芽細胞へは分化せずに脂肪細胞へと分化することなどである。

このことは、デコリン糖鎖(CS/DS)が MSC の骨芽細胞と脂肪細胞への細胞系譜の決定を制御していることを示唆する。

## 2. 研究の目的

報告者は、デコリンに対する MSC の分化・成熟過程でのデコリンの関与を明らかにしてきた。その機能が CS/DS によるものであることは確実である。しかしどの種類の CS/DS が骨分化促進能を具備しているかは明らかにできていない。また、骨の発生および再生過程で骨分化がどのような機構で進行しているのかも未解明のままである。

本研究では上記の問題点を明らかにするため、骨分化に関わるデコリン糖鎖 CS/DS の種類の同定と機能の解析を目的とする。そしてその糖鎖を応用して骨組織再生へのアプローチを試みた。

## 3. 研究の方法

### 1) MSC の骨芽細胞分化へ関与する CS/DS の決定

骨分化誘導培地に様々な種類 (CS-A, B, C, D, および E) および濃度 (0.8-100ug/mL) の CS/DS を加えてマウス MSC から骨芽細胞への分化を行った。骨分化誘導能の評価はアルカリフォスファターゼ (ALP) および AR 量の計測・比較によっておこなった。

実験結果から、CS-E の骨芽細胞誘導能が高かったので CS-E の濃度による骨

分化誘導能の違いも、あわせて検索した。

### 2) CS/DS を用いた骨組織の再生

Wistar ラットの頭頂骨にそのままでは自然治癒しないサイズ(直径5mm)の臨界骨欠損(Critical-sized bone defect: CBD)を、トレフィンバーによって作成した(図1)。欠損部には上述の実験1) で決定した糖鎖CS-E (2  $\mu$ g/穴) をコラーゲンスポンジとともに充填し、骨の再生誘導を試みた。



図1：実験に使用したトレフィンバー(左)と頭蓋に作成した欠損部(右)の写真

一定期間経過後(4および15週目)に頭蓋骨を採取した。頭蓋骨をMorse液で脱灰処理後に切片標本を作成し、新生骨組織の染色(HE、マッソントリクローム)を行った。一部の動物には、CS-Eと協働して骨再生を増強するBMP-4(1  $\mu$ g/穴)を加えたコラーゲンスポンジをCBDに埋入して骨再生を誘導し、CS-E単独での骨組織再生と比較した。

## 4. 研究成果

骨分化誘導 7 日目の ALP 活性は CS-A および E が低容量でも高い値を示した(図 2)。また、同時期に AR 量を計測すると、CS-E はいずれの濃度でも高い値を示し、石灰沈着が早期に開始されることが考えられた。

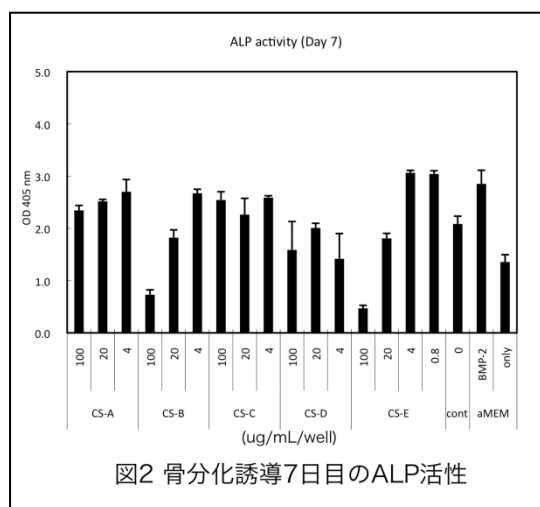


図2 骨分化誘導7日目のALP活性

各糖鎖の骨分化誘導能を確認するために誘導 16 日目に AR で染色・比較したところ、CS-E が最も強いことが明らかとなった(図 3)。

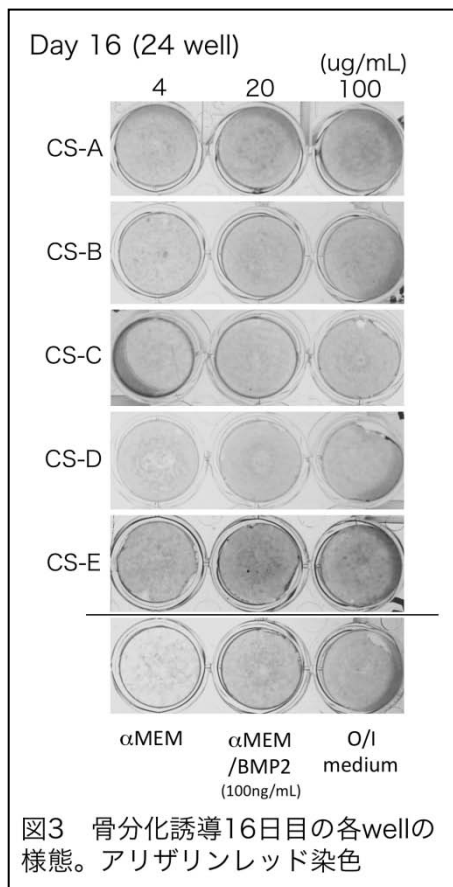


図3 骨分化誘導16日目の各wellの様態。アリザリンレッド染色

また、濃度の違いによる CS-E の骨分化誘導能を比較したところ、低量(0.8 および 4ug/mL)の CS-E で十分な骨分化誘導能を示した(図 4)。

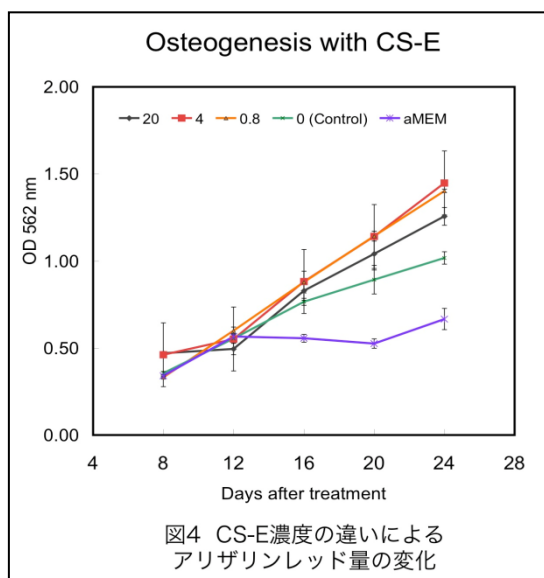


図4 CS-E濃度の違いによるアリザリンレッド量の変化

骨組織の再生実験では 4 週目では骨組織の再生量はいずれの群でもわずかであった。しかし 15 週目では、CS-E 群および C+B 群いずれでも同程度に骨の再生量が増進していた(図 5)。

過去の報告(Miyazaki *et al.*, *J Cell Physiol*, 2008)では、培養細胞を用いた実験で CS-E は BMP-4 と協働して骨形成を促進したが、今回の研究結果より CS-E 単独でも骨組織の再生を誘導可能であることが分かった。

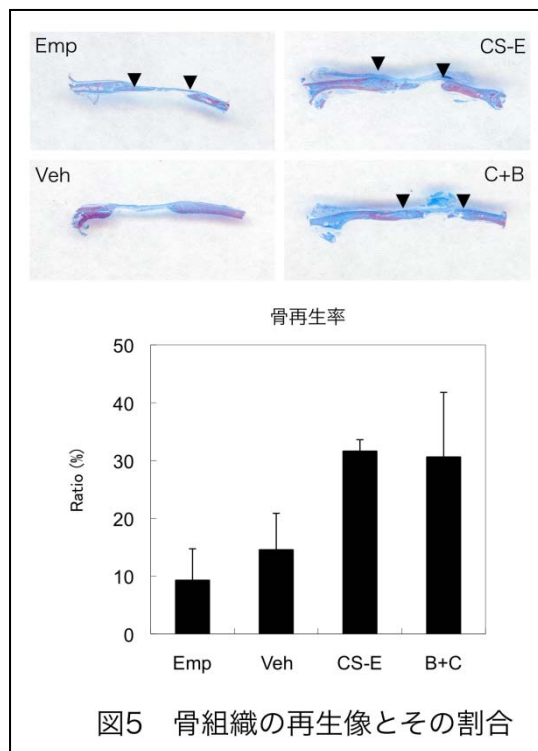


図5 骨組織の再生像とその割合

ただ、欠損部位の骨再生率は CS-E 群、C+B 群いずれの群も約 30%であり、欠損部が完全に骨組織で充填されなかった。これまで骨再生の研究に多用されてきた BMP-4 は、その活性が短期間でありかつ高価である。今回はその BMP-4 を使用することなく、同程度の骨再生を CS-E 単独で誘導できた。CS-E は以下の軟骨から大量に生産することが可能であり、長期間にわたる安定性も確認されている。この結果は、新たな素材(CS-E)を用いての再生医療法を提示する一歩となった。

今後、骨再生の割合を向上させるために、スキャフォールドとなる適切な埋入スポンジの選択や、CS-E とともに間葉系幹細胞を同時に移植するなどの工夫が必要となるだろう。

5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

コンドロイチン硫酸の骨形成能について  
岩井勇次、保坂善真、田村純一、上原正人  
第 152 回日本獣医学会学術集会  
2011 年 9 月(発表確定) 大阪府立大学

〔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

<http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/y-hosa/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

保坂 善真 (HOSAKA YOSHINAO)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号: 00337023

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: