

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20375

研究課題名(和文) 力学的ストレスを応用した筋骨格系維持再生療法の実現化に向けた分子基盤研究

研究課題名(英文) Molecular basis of regenerative therapy for musculoskeletal system using mechanical stress

研究代表者

楠山 譲二 (KUSUYAMA, Joji)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：70596105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：力学的ストレスとは、生体内の細胞や組織に負荷される物理的、機械的刺激の総称で、筋骨格系はその影響を受ける代表的器官である。この刺激の増減は筋骨格系の恒常性と連関しており、我々はこれまでに力学的ストレスは間葉系幹細胞の分化方向を制御できることを明らかにした。本研究はこの成果を応用し、力学的ストレスを筋骨格系細胞の維持再生に応用するための分子基盤の解明を目指した。その結果、骨芽細胞は分化の段階によって力学的ストレスに対する生理応答性が変化していることが分かった。また間葉系幹細胞の骨脂肪分化の初期に関わる新規分子を同定し、その活性化を力学的ストレスによって制御できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mechanical stress is physical stimulation that applies to cells and tissues in our body. Musculoskeletal system system is one of the representative organ which are usually affected by mechanical stress. Previously, we showed that mechanical stress can regulate the multi-differentiation of mesenchymal stem cells. The goal of this study is to establish the molecular-based therapy to induce the maintenance and regeneration of musculoskeletal system by mechanical stress application. We found that physiological response to mechanical stress in osteoblasts is clearly changed in the stage of osteogenic differentiation. We also found the novel signaling molecule to control the initial stage of mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts and adipocytes.

研究分野：分子生物学、口腔生化学

キーワード：メカニカルストレス 間葉系幹細胞 骨芽細胞 脂肪細胞 オステオポンチン Syk

1. 研究開始当初の背景

(1) 間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)分化マスター転写因子とその転写活性

MSCは骨芽細胞、軟骨芽細胞、筋芽細胞、脂肪前駆細胞へと分化する多能性の幹細胞である。MSCの未分化性と各細胞への分化は、それを司るマスター転写因子によって制御され、分化形質に関わる遺伝子群の発現が調節されている。しかし、分化の前後でこれらの転写因子群の発現量を比較すると、必ずしも膨大な差が生じているとは限らない。そのため発現レベルに加え、転写因子の翻訳後修飾による転写活性の変化が重要であることが示唆される。我々はMSCの骨/脂肪分化制御において、脂肪分化マスター転写因子であるPPAR α のリン酸化による転写活性の減弱が重要であることを明らかにした(Kusuyama et al. J Biol Chem 2014)。それぞれ骨/軟骨/筋への分化誘導に関わる転写因子であるRunx2, Sox9, MyoD1についてもリン酸化部位の存在が報告されている。そのため、MSCに構成的に発現している各マスター転写因子は、何らかのシグナル伝達経路を介したリン酸化によって、包括的にその転写活性を制御されている可能性がある。

(2) 力学的ストレスによるMSC分化調節

力学的ストレス(メカニカルストレス)とは、生体内の細胞や組織に負荷される物理的、機械的刺激の総称であり、筋骨格系はその影響を受ける代表的器官である。この刺激の増減は筋骨格系の恒常性と連関しており、無重力状態での骨梁減少や寝たきりによる筋萎縮はその一例である。申請者はこれらの知見をもとに、分化誘導条件下のMSCにLIPUS(低出力超音波)と呼ばれる力学的ストレスの単独刺激を施すことで、骨分化及び筋分化を促進し、脂肪分化を抑制できることを報告した(Kusuyama et al. J Biol Chem 2014)。これらの結果から、力学的ストレス刺激を調節することによって、MSCの分化方向性を制御できることが示唆された。

2. 研究の目的

(1) 転写因子のリン酸化/脱リン酸化修飾によるMSC分化調節機構の解明

多能性を持つMSCが各細胞へと分化する際に、未分化能と分化能を司る複数のマスター転写因子群のリン酸化/脱リン酸化修飾が、各分化方向(骨/軟骨/脂肪/筋)のどの段階で、どのようなレベルで起こるのかを定量解析する。更にそのリン酸化に関わる代表的キナーゼであるMAPKs(ERK, p38, JNK)と、MAPKの脱リン酸化を行うフォスファターゼであるMKPs(MAPK phosphatases)の動態に注目し、リン酸化/脱リン酸化スイッチの分子機構を明らかにする。

(2) 力学的ストレスによるMSC分化制御に関わる細胞内分子メカニズムの解明

力学的ストレスがMSCの分化や未分化性の維持をどのように調節しているかを明らかにする。特に鍵となるリン酸化酵素に着目し、MSC細胞株を用いたin vitroの実験系と、樹立したノックアウトマウスを用いたin vivoの実験系を組み合わせ、転写因子の活性制御とそのシグナル伝達経路を同定する。

3. 研究の方法

実験に用いる力学的ストレスには、整形外科臨床領域で臨床応用されているlow intensity-pulsed ultrasound(LIPUS:低出力超音波)を用いた。LIPUSは細胞培養プレートの直下から水を介して、音波刺激を与えることで、細胞に刺激を与える装置である(帝人ファーマ社より貸与)。これまでにLIPUSは骨芽細胞、間葉系幹細胞、脂肪細胞において、ERKを初めとした細胞内シグナル伝達因子を速やかに効率的に活性化させることが分かっている(Kusuyama et al. J Biol Chem 2014)。このLIPUSをマウスおよびヒトの骨芽細胞株や間葉系幹細胞株、マウス頭蓋骨由来初代骨芽細胞に照射しながら、各分化誘導培地にて細胞培養をすることによって、力学的ストレスの細胞分化に対する影響を解析した。

シグナル伝達機構や分化レベルの詳しい解析手法については、研究成果内で逐次説明する。

4. 研究成果

(1) オステオポンチン(OPN)は骨芽細胞のLIPUSによる生理応答性の阻害因子である

LIPUSは間葉系幹細胞や骨芽細胞に対して、増殖や分化コントロールなど様々な応答を誘導するが、予備実験による検討において、細胞の分化レベルによっては、その応答性が異なることが分かった。この応答性は骨芽細胞分化マーカータンパク質であるオステオポンチン(OPN)に発現レベルに呼応する様子が観察された。

そこで発現ベクターによってOPNを高発現させたマウス骨芽細胞株MC3T3-E1を樹立したところ、LIPUSによるメカニカルストレスで誘導されるNO synthase1(Nos1)、Nos2の発現量が減弱していた。また、MC3T3-E1及びマウス頭蓋冠由来初代骨芽細胞をLIPUS刺激する際に、OPNリコンビナントタンパク質を施した場合、同様の減弱結果が得られた。逆に、OPNを多く発現するようになった分化中期の骨芽細胞に対し、OPN特異的siRNA及びOPN中和抗体を作用させた場合、LIPUSによるNos1、Nos2の発現は有意に増強した。

次にメカニカルストレスのシグナル伝達分子のうち、OPNによってそのリン酸化が変化している分子を検索したところ、OPNがfocal adhesion kinase(FAK)の活性化をブロックしていることを見出した。OPNのLIPUS誘導性Nos1、Nos2発現の抑制能は、FAK阻害剤であるdasatinibを作用させた場合と同様

の効果を認め、OPN が FAK 活性の調節分子として作用していることが分かった。また OPN は Hepatocyte growth factor (HGF:肝細胞増殖因子)、Platelet-derived growth factor (PDGF:血小板由来増殖因子)による刺激によって誘導される FAK リン酸化に対しても、同じように抑制的に作用した。機能的な作用についても、OPN は HGF で誘導される VDR(ビタミンD受容体)発現、PDGF で誘導される細胞進展促進作用をブロックした。

更にこの分子メカニズムとして、OPN が FAK の脱リン酸化酵素の1つである low molecular-weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP)の発現を上昇させていることを見出した。また通常の骨芽細胞分化による OPN の発現と LMW-PTP の発現は協調的であることが分かった。OPN の骨芽細胞応答性の抑制効果は、LMW-PTP 特異的 siRNA によって有意に妨げることができた。また骨芽細胞に発現する OPN 受容体のうち、LMW-PTP の発現は CD44 に特異的に誘導されることが分かった。

またこれらの OPN による作用は、ヒト間葉系幹細胞株 UE6E7-16 でも認められ、OPN はヒトにおいても同様の効果を持つことが分かった。

このように OPN は骨芽細胞に自己分泌、傍分泌によって作用することで、LMW-PTP の発現を上昇させ、メカニカルストレス、HGF、PDGF のような FAK 活性化シグナルを抑制していることが分かった(図1)。メカニカルストレスを骨芽細胞や間葉系幹細胞に作用させる際には、OPN の発現レベルやその効果度に影響を与えることが示唆された。

以上の研究成果は、Molecular Biology of the Cell 誌にアクセプトされた(Kusuyama et al. Mol Biol Cell, 2017)。

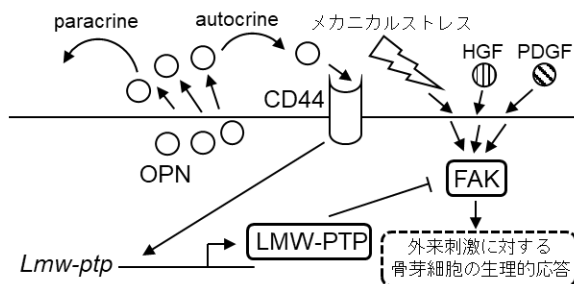


図1 OPNによる骨芽細胞の生理機能制御

(2) Spleen tyrosine kinase (Syk)は間葉系幹細胞の骨/脂肪分化バランスを調節する新規キナーゼである。

骨芽細胞の分化は、分化に伴う各種キナーゼ活性の変化による骨分化関連転写因子の発現レベルによって制御されている。我々は間葉系幹細胞の骨分化および脂肪分化の初期段階における多くのキナーゼ活性レベルを細かく追ひ、分化における役割を検討することで、新規の骨芽細胞分化/細胞細胞分化制御キナーゼの同定を目指した。

そこで、マウス未分化間葉系幹細胞株である ST2 細胞、10T1/2 細胞、ヒト未分化間葉系幹細胞株である UE6E7-16 を骨分化誘導培地および脂肪分化誘導培地で培養し、リン酸化チロシンおよびリン酸化セリン/スレオニンの細胞内レベルを経時的にウェスタンブロット法で解析した。

その結果、全ての細胞株における骨芽細胞分化の初期(1~3日)において、Syk とよばれるキナーゼのリン酸化が著明に誘導されていることを見出した。また Syk の総タンパク発現レベルは分化が進むにつれて強く減弱していった。そこで分化初期において、Syk の特異的阻害剤である piceatannol や Syk 特異的 siRNA を作用させ、骨分化をアリザリンレッド染色、アルカリフォスファターゼ活性、骨分化マーカー遺伝子の発現レベルで評価したところ、Syk の機能阻害によって骨分化が促進することが分かった。

一方、間葉系幹細胞株を脂肪分化誘導培地で培養した際にも、分化初期において Syk のリン酸化増強と Syk の総タンパク発現の減弱が誘導され、Syk が骨分化の際と同じ挙動を示していることが分かった。しかし興味深いことに、脂肪分化時において Syk を機能阻害すると、脂肪滴形成や脂肪分化マーカー遺伝子の発現レベルの上昇を抑制し、脂肪分化は阻害された。このように脂肪分化の場合、骨分化の場合とは Syk が全く逆の異なった機能を持つことが示唆された。

そこで次に間葉系幹細胞の骨/脂肪分化における Syk 活性化シグナルの下流分子を探索したところ、phospholipase C gamma (PLC) のアイソフォームが Syk の機能差を担うことが分かった。骨分化誘導において、Syk は PLC 1 を活性化することで骨分化に対し抑制的に働き、脂肪分化誘導においては、Syk は PLC 2 を活性化し脂肪分化を促進した。

更に我々はこの分子メカニズムとして、PLC

のアダプター分子である B-cell linker protein (BLNK) と growth factor receptor-binding protein 2 (Grb2)が、Syk 活性化シグナルを異なった PLC アイソフォームに伝達させていることを見出した。BLNK の発現レベルは骨分化時には著明に減少したが、脂肪分化時には一定であった。一方で Grb2 の発現レベルは骨/脂肪分化時、共に一定であった。BLNK および Grb2 特異的 siRNA を用いた解析により、骨分化時には Grb2 が Syk-PLC 1 シグナルを仲介し、脂肪分化時には BLNK が Syk-PLC 2 シグナルを伝達することが分かった(図2)。

メカニカルストレスのシグナル伝達経路でも、この Syk シグナル経路の活性が変化するデータを得ており、Syk はメカニカルストレスが間葉系幹細胞の骨/脂肪分化バランスを調節する際のキーとなる分子である可能性がある。

以上の研究成果は、Journal of Cellular Physiology 誌にアクセプトされた(Kusuyama

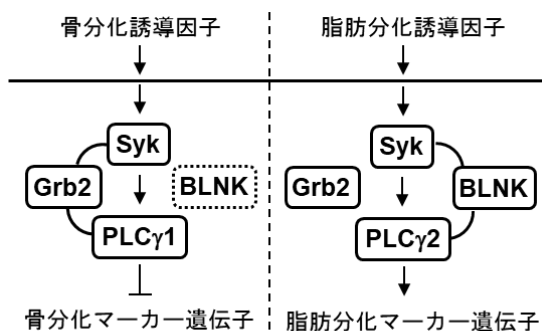


図2 Sykによる骨/脂肪分化シグナル経路

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Spleen tyrosine kinase influences the early stages of multilineage differentiation of bone marrow stromal cell lines by regulating phospholipase C gamma activities. Kusuyama J, Kamisono A, ChangHwan S, Amir MS, Bandow K, Eiraku N, Ohnishi T, Matsuguchi T. Journal of cellular physiology 233(3) 2549-2559, 2018年、査読有

DOI: 10.1002/jcp.26130

Constitutive activation of p46JNK2 is indispensable for C/EBP induction in the initial stage of adipogenic differentiation. Kusuyama J, Ohnishi T, Bandow K, Amir MS, Shima K, Semba I, Matsuguchi T. The Biochemical journal 474(20) 3421-3437 2017年、査読有

DOI: 10.1042/BCJ20170332

Lymphomatoid granulomatosis initially presenting as ulcerated subcutaneous and muscle lesions without pulmonary involvement. Higashi Y, Yoshioka T, Kawai K, Fujii K, Yoshimitsu M, Kusuyama J, Shima K, Tanimoto A, Kanekura T. The Journal of dermatology 44(5) e107-e108 2017年、査読有

DOI: 10.1111/1346-8138.13712.

Osteopontin inhibits osteoblast responsiveness through the down-regulation of focal adhesion kinase mediated by the induction of low-molecular weight protein tyrosine phosphatase. Kusuyama J, Bandow K, Ohnishi T, Hisadome M, Shima K, Semba I, Matsuguchi T. Molecular biology of the cell 28(10) 1326-1336 2017年、査読有

DOI: 10.1091/mbc.E16-10-0716.

CXCL3 positively regulates adipogenic differentiation. Kusuyama J, Komorizono A, Bandow K, Ohnishi T, Matsuguchi T. Journal of lipid research 57(10) 1820 2016年、査読有

DOI: 10.1194/jlr.M067207

Hepatocyte growth factor reduces CXCL10 expression in keratinocytes. Hisadome M, Ohnishi T, Kakimoto K, Kusuyama J, Bandow K, Kanekura T, Matsuguchi T. FEBS letters 590(20) 3595-3605 2016年、査読有

DOI: 10.1002/1873-3468.12452.

[学会発表](計11件)

低出力超音波(LIPUS)による幹細胞の分化制御と組織再生能の向上、楠山譲二、第90回超音波医学会学術集会、2017年
低出力超音波(LIPUS)による歯根膜由来幹細胞のBMP9誘導性骨分化及び炎症性応答の制御、楠山譲二、中村利明、大西智和、榮樂菜保子、野口和行、松口徹也、第20回超音波骨折治療研究会、2017年

低出力超音波(LIPUS)による歯根膜由来幹細胞のBMP9誘導性骨分化及び炎症性応答の制御、楠山譲二、中村利明、大西智和、榮樂菜保子、野口和行、松口徹也、第15回日本超音波治療研究会、2016年

JNKシグナリングは骨芽細胞の多様性分化を制御する、楠山譲二、大西智和、松口徹也、第58回歯科基礎医学会、2016年

低出力超音波(LIPUS)は歯根膜由来幹細胞のBMP9誘導性骨分化を促進し、炎症応答を防ぐ、楠山譲二、中村利明、大西智和、榮樂菜保子、野口和行、松口徹也、第25回硬組織再生生物学会、2016年

JNKシグナリングは骨芽細胞の多様性分化を制御する、楠山譲二、大西智和、松口徹也、第34回日本骨代謝学会、2016年

ケモカインCXCL3は脂肪分化を促進する、楠山譲二、小森園杏奈、坂東健二郎、大西智和、松口徹也、平成28年度日本生化学会九州支部例会、2016年

LIPUS刺激はNanogの発現誘導とリン酸化によって間葉系幹細胞の分化能を維持する、楠山譲二、成昌ファン、大西智和、坂東健二郎、松口徹也、第19回超音波骨折治療研究会、2016年

低出力超音波刺激(LIPUS)は間葉系幹細胞の多継代培養による分化能喪失を防ぐ、楠山譲二、成昌ファン、仙波伊知郎、松口徹也、第14回日本超音波治療研究会、2015年

p46JNK2の構成的活性は脂肪分化前期におけるC/EBPの発現に必須である、楠山譲二、坂東健二郎、大西智和、仙波伊知郎、松口徹也、第57回歯科基礎医学会、2015年

LIPUS(低出力超音波)による間葉系幹細胞の分化能維持、楠山譲二、仙波伊知郎、松口徹也、第24回硬組織再生生物

学会、2015年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠山 譲二 (KUSUYAMA, Joji)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号： 70596105

(2) 研究協力者

松口 徹也 (MATSUGUCHI, Tetsuya)
大西 智和 (OHNISHI, Tomokazu)
坂東 健二郎 (BANDOW, Kenjiro)
仙波 伊知郎 (SEMBA, Ichiro)
嶋 香織 (SHIMA, Kaori)
加治屋 由佳 (KAJIYA, Yuka)