

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04414

研究課題名(和文)細胞外圧による間葉系幹細胞の分化運命制御機構の解明

研究課題名(英文)Cell fate determination of mesenchymal stem cells by extracellular mechanical stress

研究代表者

岩本 勉 (IWAMOTO, Tsutomu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授

研究者番号：90346916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、再生医療の細胞ソースとして期待をされている間葉系幹細胞の分化運命決定機構と細胞外圧との関係を明らかにすることが目的である。細胞は様々な細胞外環境と相互作用をすることによって、その分化運命が決定される。そのうち細胞は自身の周りを細胞外液に囲まれて存在しており、これらのシグナルはすべて細胞外液を介して細胞内へ伝達されると考えられる。そこで、われわれは静水圧に着目し、骨髄由来間葉系幹細胞および脱落乳歯由来幹細胞の分化における静水圧の影響を解析した。その結果、骨芽細胞や象牙芽細胞の分化に静水圧の圧受容体としてPIEZO1が存在し、そのシグナルを介した重要な分化制御機構があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療に有効な細胞供給源として、それぞれの組織に存在する多能性を有した間葉系幹細胞の応用法の開発が期待されている。しかし、一般にそれらの幹細胞を再生医療に用いる目的の細胞へと分化誘導する際には、高額なサイトカイン等を用いる必要がある。そこで本研究において、細胞外圧に着目し、細胞外圧の強さを変動させることによって、細胞分化を誘導する方法を見出した。つまり細胞外圧をコントロールすることによって、細胞自身が持つ分化誘導能を賦活化させることが可能となることを明らかにした。このことは細胞分化に高額な費用をかけずに細胞を分化誘導させる手法として、再生医療へ応用できる技術になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：There are many unclear points regarding the mechanism of the fate determination of tissue-derived mesenchymal stem cells (MSCs), which is a candidate as a cell source for regenerative medicine. The interactions of the Cell-cell or cell-extracellular environment would regulate the cell fate determination of MSCs. Because cells are surrounded by extracellular fluid, and it is thought that all of these signals are transmitted into the cell via the extracellular fluid. Therefore, among them, we focused on hydrostatic pressure and analyzed the effect of hydrostatic pressure on the differentiation of bone marrow-derived MSCs and stem cells from human exfoliated deciduous teeth. As the result, hydrostatic pressure promoted differentiation into osteoblasts or odontoblasts. We found that PIEZO1 has an important role in cell fate determination through its mechanotransduction.

研究分野：小児歯科

キーワード：間葉系幹細胞 細胞外圧 静水圧 細胞分化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

宇宙に長期滞在した場合に起きる様々な体への変化は、われわれ地球上の生命体において、「圧」が如何に大切であるか教えてくれる。とくに無重力環境での骨への影響は深刻で急激な骨密度の低下がみられる。このことは骨量を維持するためには、骨の材料となるカルシウムやビタミン D3 等の栄養以外に適度な負荷が必要不可欠な要素であることを示した代表的な事象である。これは筋肉も同様であり、そのうち心筋機能への影響は生命にも関わってくる。また、眼球内もある一定の圧が負荷されているが、そこにも異常が生じると、眼球形態の変化から機能異常まで生じる。歯においても同様に圧の変化が痛みと関連する。また、哺乳類では受精卵の成長に異常が生じることが報告され、哺乳類の正常な胚発生の過程においては圧が必須の要素であると考えられている。これらから考えると個々の細胞が分化する、あるいは機能する上で細胞外圧は非常に重要な要素である。

iPS 細胞の発見は再生医療の切り札として期待されているが、ガン化に関する問題やエピジェネティクスに関する問題、目的細胞までの分化誘導の問題、樹立までの時間に関する問題などまだまだ解決すべき課題は多い。それに対して間葉系幹細胞は自身の体のあらゆるところに存在し、比較的採取が容易であることや可能性を秘めた多能性を有していること、局所における免疫抑制機能、内因性幹細胞の賦活化など再生医療における有効性が様々な角度から再認識されてきている。

胎児期から成人期までを対象とする小児歯科は、歯の発生過程や顎骨の成長を念頭においた診療を行っており、幹細胞や組織発生を意識しやすい診療科のひとつである。さらには交換期の乳歯や過剰歯を抜去する機会も多く、通常の診療の範囲内で容易に抜去歯の歯髄から間葉系幹細胞を採取できる環境にある。乳歯から永久歯への交換はすべての人が必ず経験するため、乳歯由来の間葉系幹細胞の利用は再生医療にとって有効な手法となる。

本研究の応用方法の開発は、歯が生まれつきない児への歯再生や口唇口蓋裂児の上顎骨顎裂部の骨再生、骨延長への応用、軟骨細胞シートによる顎関節軟骨損傷への治療等が期待される。また、これら幹細胞の採取から応用方法の開発は、歯科に留まらず全身の医療への貢献にも展開でき、国民の健康へ寄与する貢献度は極めて高く、新たな治療戦略の創出を目指す。

### 2. 研究の目的

細胞にとって細胞外環境は重要な因子であり細胞の運命決定において重要な役割があると考え、本研究では間葉系幹細胞の分化メカニズムにおいて、細胞外環境因子として「圧」に着目し、細胞外圧が間葉系幹細胞の分化および維持に関わるメカニズムを独自に開発した加圧培養装置を用いて明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 間葉系幹細胞から各種細胞への誘導と至適圧の検討

骨髄由来間葉系幹細胞として UE7T-13 細胞、歯髄由来間葉系幹細胞として脱落乳歯歯髄由来細胞 (SHED) を用いて、それぞれの分化マーカーを指標に、誘導培地下培養後の遺伝子発現を Real time PCR 法にて、遺伝発現に働く有利な最適圧の検索を行う。

#### (2) 細胞内シグナル伝達経路の解析

それぞれの至適圧で刺激した際に、どのシグナル伝達経路が活性化するのか Western blotting 法を用いて解析する。また、それぞれ分化にとって重要な master gene となる転写因子の核移行を免疫組織学的に観察する。

#### (3) 圧受容体の同定

主として TRPV family, ASIC family, P2Y/P2X family, Piezo family についての検討を行う。Real time PCR 法および免疫組織学的検討を行う。

#### (4) シグナル伝達経路遮断による影響解析

加圧によって誘導された分子については、その機能と加圧との関連を明らかにするために、siRNA 法や阻害ペプチドを用いて加圧との関連を明らかにする。

#### (5) 細胞増殖に関する解析

圧を細胞にかけた時に細胞の増殖がどのように影響を受けるのか、Cell count 法、BrdU 取り込み試験を用いて細胞増殖能について検討を行う。

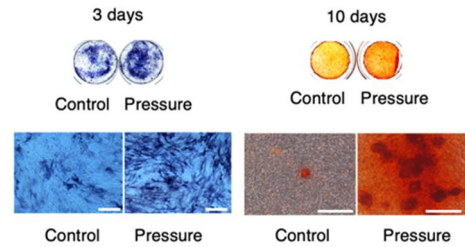
#### (6) メダカを用いた加圧環境の in vivo への影響解析

われわれが開発した加圧培養装置はその装置の中で、メダカを飼育することができる。そこで、

メダカヒレ骨の成長に圧が及ぼす影響と圧受容体からのシグナル関連分子の阻害が及ぼす影響について解析を行う。

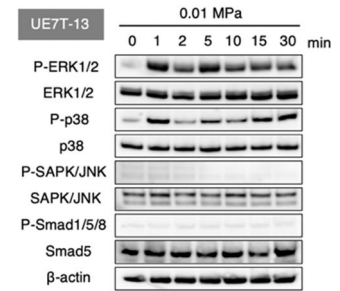
#### 4. 研究成果

1) 0.01MPa の加圧は間葉系幹細胞 UE7T-13 細胞の骨芽細胞へ分化に重要な BMP-2, RUNX2, OSX, ALP の遺伝子発現を強く誘導をした。同圧力を負荷し、骨誘導培地にて、10 日間培養したところ、通常、3 週間以上かかるアリザリンレッド染色が極めて短時間で染色されることを見出した。



#### 2) 細胞内シグナル伝達経路の解析

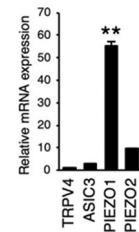
0.01MPa の静水圧負荷は UE7T-13 細胞の骨芽細胞への分化を促進した。そこで、どのような細胞内シグナル分子が活性化されるのか、30 分間で活性化される細胞内シグナル分子を検討したところ、ERK1/2 や p38MAPK が活性化されることがわかった。



また、SHED の石灰化に重要な役割をする転写因子の RUNX2 の静水圧負荷によりその核への移行が促進されることを免疫組織学的に明らかにした。

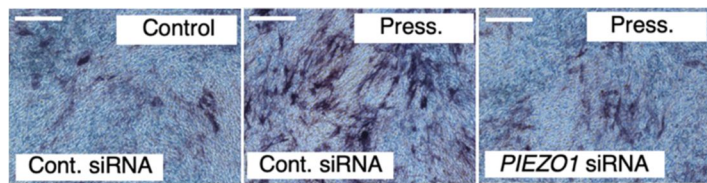
#### 3) 圧受容体の同定

間葉系幹細胞 UE7T-13 細胞および SHED に発現している圧受容体を real time PCR 法にて解析をしたところ、PIEZO1 が極めて強く発現していることを見出した。また、その発現は細胞膜に強いシグナルとして検出されることを免疫組織学的に明らかにした。



#### 4) シグナル伝達経路遮断による影響解析

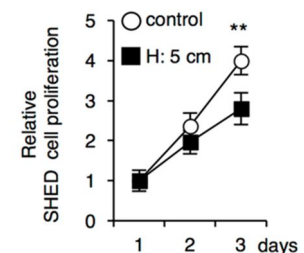
間葉系幹細胞に非常に強く PIEZO1 遺伝子が発現していることが明らかとなり、本遺伝子が圧受容体として機能していることが示唆された。そこで、PIEZO1 遺伝子を siRNA 法にて、発現をノックダウンし、骨芽細胞の分化マーカーである



ALP の発現を ALP 染色および real time PCR 法にて、検討をしたところ、静水圧負荷によって誘導された ALP の発現が Piezo1 siRNA によって抑制されることが明らかになった。このことは、静水圧によって誘導される骨芽細胞系への分化に PIEZO1 が不可欠な分子であることを示唆するものである。

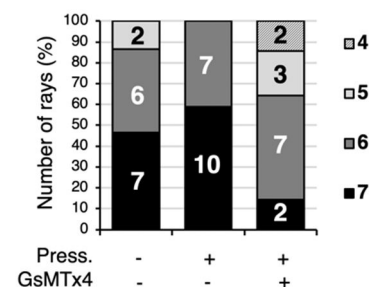
#### 5) 細胞増殖に関する解析

静水圧を細胞 SHED に負荷した際に細胞の増殖へ及ぼす影響を解析をしたところ Cell count 法および BrdU 取り込み試験にて、細胞の増殖が抑制されることが明らかになった。このことは静水圧の負荷によって、間葉系幹細胞の細胞増殖が抑制されることを示唆するものである。



#### 6) メダカを用いた加圧環境の in vivo への影響解析

加圧培養装置中にメダカを飼育し、ヒレ骨の成長についてカウントを行ったところ、非加圧群に比較し、加圧群でその骨化の速度が促進されることを見出した。さらにその促進された骨化が PIEZO1 の阻害剤 GsMTx4 で抑制されることが見出した。



以上の結果より、本研究によって、間葉系幹細胞の骨芽細胞系細胞への分化促進に静水圧の負荷は極めて有効な手段であることが明らかとなった。また、その機構に PIEZO1 圧受容体が関与していることを明らかにすることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Asuna Sugimoto, Aya Miyazaki, Keita Kawarabayashi, Masayuki Shono, Yuki Akazawa, Tomokazu Hasegawa, Kimiko Ueda Yamaguchi, Takamasa Kitamura, Yoshizaki keigo, Fukumoto Satoshi and Tsutomu Iwamoto	4. 巻 7
2. 論文標題 Piezo type mechanosensitive ion channel component 1 functions as a regulator of the cell fate determination of mesenchymal stem cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18089-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsutomu Iwamoto, Nakamura Takashi, Ishikawa Masayuki, Yoshizaki Keigo, Yamada Aya, Fukumoto Emiko, Sugimoto Asuna, Ida-Yonemochi Hiroko, Saito Masahiro, Yamada Yoshihiko and Fukumoto Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Pannexin 3 regulates proliferation and differentiation of odontoblasts via its hemichannel activities	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0177557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0177557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi-Ueda Kimiko, Akazawa Yuki, Kawarabayashi Keita, Sugimoto Asuna, Nakagawa Hiroshi, Miyazaki Aya, Kurogoushi Rika, Iwata Kokoro, Kitamura Takamasa, Yamada Aya, Hasegawa Tomokazu, Fukumoto Satoshi, Iwamoto Tsutomu	4. 巻 19
2. 論文標題 Combination of ions promotes cell migration via extracellular signal?regulated kinase 1/2 signaling pathway in human gingival fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 5039 ~ 5045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2019.10141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chiba Yuta, He Bing, Yoshizaki Keigo, Rhodes Craig, Ishijima Muneaki, Bleck Christopher K. E., Stempinski Erin, Chu Emily Y., Nakamura Takashi, Iwamoto Tsutomu, de Vega Susana, Saito Kan, Fukumoto Satoshi, Yamada Yoshihiko	4. 巻 294
2. 論文標題 The transcription factor AmeloD stimulates epithelial cell motility essential for tooth morphology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 3406 ~ 3418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakatomi Chihiro, Nakatomi Mitsushiro, Matsubara Takuma, Komori Toshihisa, Doi-Inoue Takahiro, Ishimaru Naozumi, Weih Falk, Iwamoto Tsutomu, Matsuda Miho, Kokabu Shoichiro, Jimi Eijiro	4. 巻 121
2. 論文標題 Constitutive activation of the alternative NF- B pathway disturbs endochondral ossification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 29 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 杉本 明日菜, 宮崎 彩, 河原林 啓太, 岩田 こころ, 黒厚子 璃佳, 赤澤 友基, 長谷川 智一, 上田(山口) 公子, 北村 尚正, 中川 弘, 岩本 勉
2. 発表標題 象牙芽細胞におけるピエゾ型イオンチャネル1(PIEZ01)の発現とその役割
3. 学会等名 第37回日本小児歯科学会中四国地方会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉本明日菜, 赤澤友基, 長谷川智一, 宮崎 彩, 河原林啓太, 岩本 勉
2. 発表標題 PIEZ01は歯髓細胞の分化運命決定に関与し, 象牙芽細胞への分化を促進させる
3. 学会等名 第55回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮崎 彩, 杉本 明日菜, 岩本 勉
2. 発表標題 静水圧負荷刺激により誘導される象牙質形成機転の解明
3. 学会等名 第57回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	山本 朗仁  (YAMAMOTO Akihito)  (50244083)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授   (16101)	
研究 分担者	長谷川 智一  (HASEGAWA Tomokazu)  (50274668)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・講師   (16101)	