

令和元年6月20日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17351

研究課題名(和文) 立体培養間葉系幹細胞集塊の細胞分化を制御するメカノトランスダクション機構の解析

研究課題名(英文) Role of YAP/TAZ mechanotransduction in 3D culture clumps of MSCs/ECM complexes

研究代表者

加治屋 幹人 (Kajiya, Mikihiro)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：00633041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はこれまでに、新規の細胞移植技術として、間葉系幹細胞(MSCs)と細胞外基質(ECM)を利用して細胞集塊(Clumps of MSCs/ECM complexes(C-MSCs))を樹立していた。本研究では、C-MSCsの細胞性質の理解を深めるために、YAP/TAZメカノトランスダクション機構に注目して実験を行った。その結果、C-MSCsは浮遊状態にあるため場の硬さを感知できずYAP/TAZ活性が低下し、軟骨・脂肪分化に導かれやすいことを見出した。さらに、骨分化誘導を施されたC-MSCsではECMの産生が増加することで硬さを感知し、YAP/TAZ活性が向上することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに骨分化誘導を施したC-MSCsの移植が、人工材料を用いたMSCsの移植と比較して効果的に歯周組織再生を促進することが示されていた。本研究の成果によって、C-MSCsの細胞性質がメカノトランスダクションの観点から明らかになったことは、臨床応用のための科学的根拠の取得につながると期待できる。さらに、本研究で発見されたC-MSCsにおけるYAP/TAZメカノトランスダクションの意義を応用し、in vitroでC-MSCsから骨様組織を作製できる可能性が示されたことは、より効果的な骨再生医療の開発に貢献できる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：Floating culture clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs) consist of cells and self-produced ECM. Previous studies have demonstrated that C-MSCs can be transplanted into bony lesions without an artificial scaffold to induce bone regeneration. Moreover, osteoinductive medium (OIM)-treated C-MSCs (OIM-C-MSCs) have shown rapid and increased new bone formation in vivo. To apply C-MSCs for novel cell therapy, their cellular properties at the molecular level must be elucidated. This study investigated the role of YAP/TAZ mechanotransduction in C-MSCs/OIM-C-MSCs. C-MSCs cultured in floating conditions lost their actin cytoskeleton to down-regulate YAP/TAZ activity, which directed cells to undergo adipogenesis/chondrogenesis. OIM treatment induced abundant COL1 deposition, which facilitated Int 1-dependent actin fiber formation and YAP/TAZ activity in C-MSCs. Importantly, elevation of YAP/TAZ activity via OIM was associated with COL1 deposition, suggesting a positive feedback loop in OIM-C-MSCs.

研究分野：歯周治療

キーワード：間葉系幹細胞 C-MSCs YAP/TAZ メカノトランスダクション

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

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、細菌感染と宿主の免疫応答の結果生じる炎症性組織破壊疾患である。特に、侵襲性歯周炎や重度歯周炎といった広範囲におよぶ組織破壊を示す状態では、残存組織中の細胞機能のコントロールのみでは組織再生は得難い。そこで、生体外から多分化能を有する幹細胞を供給する細胞治療法の開発が進められており、間葉系幹細胞(MSCs)を利用した研究が注目を集めている。

申請者はこれまでに、その MSCs をもちいた効果的な歯周組織再生治療法開発のために、MSCs と細胞自身が産生する細胞外基質(ECM)を利用して 3 次元細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs)を作成することに成功していた。この C-MSCs は細胞自身が産生した I 型コラーゲンで形作られた直径 1mm ほどの細胞集塊であり、多分化能を保持しており、in vitro にて骨分化誘導を施すことが可能で、更には足場材料を必要とせずに欠損組織に直接移植でき、従来の人工担体を用いた MSCs 移植方法と比較してより効果的に骨再生・歯周組織再生を誘導する(Kittaka et al., Cytotherapy, 2015 ; Takewaki et al., J Dent Res, 2017)。

この C-MSCs を歯周組織再生療法として臨床応用するためには、その細胞性質を明らかにしておく必要がある。しかし、従来の二次元培養とは異なる三次元的培養法が、C-MSCs におけるシグナル伝達経路や細胞分化能にどのような影響を与えるかは不明なままであった。

2. 研究の目的

近年、細胞外基質の硬さ・細胞密度・張力・浮遊状態などの力学的因子を細胞が感知し、生化学的信号へと変換するメカニズムであるメカノトランスダクションが、細胞増殖や分化などの生命現象に深く関わるということが明らかとなりつつある。特に、MSCs においては、硬い足場や低い細胞密度(細胞が大きく伸展できる場)で生じるメカノトランスダクションが F-actin の伸展を介して転写共役制御因子 YAP/TAZ の活性を上昇させ、その結果、骨・筋・靭帯への分化傾向に誘導する。逆に、柔らかい足場や高い細胞密度(細胞が大きく伸展できない状態)では、F-actin の脱重合から YAP/TAZ 活性が低下し、脂肪・軟骨・神経への分化傾向に導かれることが報告されていた(Dupont, et al., Nature, 2011)。

3 次元細胞集塊 C-MSCs は、豊富な細胞外基質高密度な細胞で構築される細胞集塊であり、さらには浮遊状態で培養されるため、従来の二次元培養とは異なった独特なメカノトランスダクションが生じていると予想された。そこで、C-MSCs および骨分化誘導 C-MSCs 内の F-actin および YAP/TAZ を中心としたメカノトランスダクションと細胞分化の関連を明らかにすることで、将来 C-MSCs を臨床応用するにあたり必須となる C-MSCs 内の細胞性質の理解を深めることを目的として本研究を実施した。

3. 研究の方法

理研から提供されたヒト骨髄由来 MSCs を、24well プレートに播種し、50 µg/ml のアスコルビン酸含有の増殖培地にて 4 日間培養した。これをマイクロピペットチップにてこそぎ、細胞シートの状態で剥離させ、この浮遊した MSCs/ECM 複合体をさらに増殖培地にて培養することによって、細胞集塊 C-MSCs を得た。骨分化誘導 C-MSCs は、細胞シート状態に浮遊させた時点から、デキサメタゾン、アスコルビン酸、グリセロフォスフェート含有の骨分化誘導培地を用いることで作成した。本研究ではこれら C-MSCs および骨分化誘導 C-MSCs をもちいて以下の実験を行った。

実験 1) C-MSCs の YAP/TAZ 活性の確認と細胞分化との関係の解析

浮遊状態にある C-MSCs の YAP/TAZ の局在と F-actin の形態を共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫染色で観察した。また YAP/TAZ の発現量を Western blotting にて確認し、転写活性としてその標的遺伝子 CTGF、CYR61 mRNA 発現の変化を qPCR にて定量した。また、細胞分化について、核外移行シグナルを受けずに定常的に YAP/TAZ 活性を維持できる S89A 変異 TAZ を強制発現させた状態で、骨・脂肪・軟骨分化誘導を施し、YAP/TAZ と細胞分化の関係を調べた。

実験 2) 骨分化誘導 C-MSCs の細胞外基質と YAP/TAZ メカノトランスダクションの関連

骨分化誘導 C-MSCs は細胞外基質である COL1 の発現が上昇することが予備的検討から示されていた。つまり、細胞外基質が豊富になることで YAP/TAZ メカノトランスダクションの活性が通常の C-MSCs より高くなることが予想された。そこで、実験 2) では、骨分化誘導 C-MSCs の YAP/TAZ の局在、発現量、転写活性と F-actin の形態を実験 1) と同様の方法で検討した。さらに、COL1 から誘導される Integrin シグナルと YAP/TAZ メカノトランスダクション活性との関係を調べるために、Integrin β1 siRNA、Y27632(ROCK 阻害剤)、Blebbistatin(アクチン重合阻害剤)を用いた阻害実験を行った。また、骨分化誘導 C-MSCs において活性化する YAP/TAZ の役割を調べるために、YAP/TAZ siRNAs の導入による阻害実験も行った。

4. 研究成果

実験 1)では、C-MSCs が浮遊状態にあることで、場の硬さを感知できず、F-actin の脱重合が生じ、YAP/TAZ の劇的な分解が生じ、その活性が低下することが示された。さらに、YAP/TAZ 活性が極めて低い C-MSCs は骨分化誘導がかかりにくく、軟骨・脂肪誘導がかかりやすいことが示された。更に興味深いことに、定常的にその活性を維持できる S89A 変異 TAZ を強制発現させた C-MSCs は反対に、軟骨・脂肪誘導が抑制され、骨分化傾向に誘導されることが示された。以上の結果から、浮遊状態にある C-MSCs では、YAP/TAZ メカノトランスダクション活性が著しく低下し、骨分化抑制傾向にあることが示された。

実験 2)では、骨分化誘導 C-MSCs が経時的に COL1 発現を増加させ、これに伴って、F-actin の伸展と YAP/TAZ の活性が向上することが示された。さらに、Integrin β 1 siRNA、Y27632(ROCK 阻害剤)、Blebbistatin(アクチン重合阻害剤)によって前処理された骨分化誘導 C-MSCs では、その F-actin の伸展と YAP/TAZ 活性の向上が明らかに抑制された。以上の結果から、骨分化誘導 C-MSCs における豊富な COL1 が、YAP/TAZ メカノトランスダクションを活性化させることが示された。さらに重要なことに、骨分化誘導 C-MSCs における YAP / TAZ の活性は、COL1 発現を上昇させていることを YAP/TAZ siRNAs 導入による阻害実験によって示された。このことは、骨分化誘導 C-MSCs において、COL1 から開始する Integrin β 1-ROCK-F-actin-YAP/TAZ メカノトランスダクションカスケードはポジティブ・フィードバックループを形成し、YAP/TAZ のオートクラインな活性化に關与することが示された。

以上の研究成果は、Stem Cell Research & Therapy に論文発表された。

さらに、C-MSCs を浮遊状態ではなく、ゲル包埋培養することで場の硬さを提供することで、YAP/TAZ ポジティブ・フィードバックループを強く活性化し、in vitro での立体骨様組織が作製できることを見出し、特許出願に至った。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Motoike S, Kajiya M, Komatsu N, Takewaki M, Horikoshi S, Matsuda S, Ouhara K, Iwata T, Takeda K, Fujita T, Kurihara H.

Cryopreserved clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes retain osteogenic capacity and induce bone regeneration.

Stem Cell Res Ther. 2018 Mar 21;9(1):73. (査読有り)

2. Komatsu N, Kajiya M, Motoike S, Takewaki M, Horikoshi S, Iwata T, Ouhara K, Takeda K, Matsuda S, Fujita T, Kurihara H.

Type I collagen deposition via osteoinduction ameliorates YAP/TAZ activity in 3D floating culture clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes.

Stem Cell Res Ther. 2018 Dec 7;9(1):342. (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 加治屋 幹人

歯周病細胞治療における 3次元培養法の現況と展望

日本歯周病学会 60 周年記念大会 (2018 年)
(シンポジスト招待講演)

2. 加治屋 幹人

間葉系幹細胞と集塊培養技術を応用した顎骨再生細胞療法の開発

第 22 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会(2018 年)
(シンポジスト招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：骨様組織及びその製造法
発明者：栗原英見/加治屋幹人/本池総太/小松奈央
権利者：同上
種類：特願
番号：2019-89161
出願年：2019
国内外の別：国内

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

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小松 奈央
ローマ字氏名：Komatsu Nao

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。