

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09515

研究課題名(和文)細胞凝集形成を介した間葉系幹細胞分化開始メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanisms of mesenchymal cell differentiation through cellular aggregate formation

研究代表者

二藤 彰(Nifuji, Akira)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：00240747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：硬組織分化は細胞凝集から始まる。多分化能を持つ間葉系細胞(C1、F1G5、10T1/2)を用い、どの細胞においても細胞密度の増加とともに分化系譜特異的な分子の発現が上昇することを観察した。細胞周期G0期ないしG1期早期特異的なプローブを用い1細胞レベルでの増殖と分化の関係を調べたところ、分化初期では必ずしもプローブ陽性と分化シグナルは重ならないが、分化が進むにつれて重なるようになる。増殖と分化は分化初期には背反ではないことが示された。つまり細胞接触が必ずしも分化を起こすのではなく、凝集塊形成による更なる分化促進シグナルによって分化が進む可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞凝集塊は、発生における組織形成に必須であると考えられている。また癌組織も進行とともに細胞凝集をつくることが知られている。細胞密度が増える過程での増殖から分化への過程についてはまだ不明な点が多い。本研究では、細胞周期のG0期ないしG1期早期特異的なプローブを用いて、3D凝集塊の形成(sphere)での分化形質発現を解析するユニークな解析法を確立した。増殖から分化への移行過程の結果は、凝集塊形成を介した発生分化機構研究のみならず、癌などの疾病研究にも応用出来るという点で、新たなアプローチを提供できると考えている。

研究成果の概要(英文)：The differentiation of hard tissue starts from condensed blastema formation. Using in vitro cellular differentiation of mesodermal cell lines (C1, F1G5, 10T1/2 cells), we observed that expression of lineage specific transcription factors was up-regulated along with increase in cell density. To investigate relationship between proliferation and differentiation, we infected a vector expressing G0 or G1 cell cycle stage specific fluorescent probe and isolated stable cell lines expressing the probe. We found that differentiation marker expressions and expression of the probe were not always merged at the early stage of differentiation. However, after induction of full differentiation in sphere formation, many cells expressed both signals. Thus it suggests that so-called cellular contact inhibition does not induce differentiated phenotype, but rather additional factors are required for full differentiation in the mesodermal cell differentiation.

研究分野：発生学

キーワード：細胞分化 細胞凝集 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨や歯の発生においては、将来の原基を生じる部位で細胞増殖が盛んになり、細胞凝集塊を生じる。それからまもなく同領域に、分化形質の発現が始まる。ここでは増殖と分化が sequential あるいは同時に起きていると考えられる。一方、in vitro での骨や歯の分化誘導においても、confluent な状態あるいは3次元的な凝集塊形成が有効な分化誘導方法であると考えられている。細胞密度が増加し細胞凝集塊形成することで、分化特異的分子の遺伝子発現が活性化して分化が始まり、その後選択的な分化成熟にシフトすると考えられる。この過程では細胞密度の増加に伴う増殖の停止 (G0 期) が、遺伝子発現の活性化に関わることが予想されるが、増殖と分化の関係については不明な点が多い。

2. 研究の目的

間葉系細胞分化モデルを用い、その分化過程において増殖と分化の関係は、増殖停止後 sequential に分化が起きているのか、あるいは増殖と分化が同時に起きているか、それは細胞密度の違いに影響を受けるか、3次元的な凝集塊形成が必要かについて調べる。さらに、直接の細胞接触が必要か否かあるいは細胞濃度が重要かという点については、液性因子あるいは膜局在分子シグナルの関与の可能性を検討する。

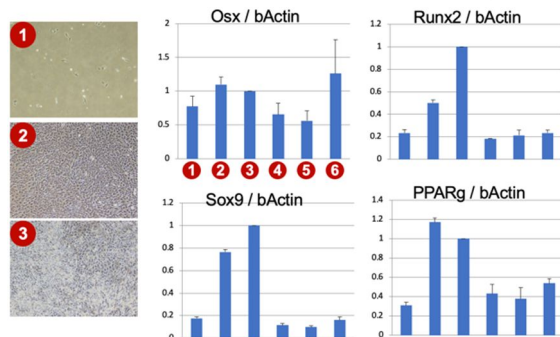
3. 研究の方法

分化モデルとして多分化能を持つ間葉系幹細胞 C1、さらに F1G5, 10T1/2, 線維芽細胞として F12 細胞を用いた。それらについて、cell-cell contact、細胞密度増加による増殖停止、3D 細胞凝集塊形成、分化成熟 (軟骨、骨、脂肪分化それぞれ) において分化系列に特徴的な分子の発現は、どう変化するか解析した。また Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) プローブは、生細胞の細胞周期の進行をリアルタイムに観察することが出来る蛍光プローブであるが、その一つ mVenus-p27K⁻ プローブを用い、蛍光で G0 期ないし G1 期早期の細胞周期にある細胞を可視化した。その上で、細胞周期と分化過程関係を検討するため、分化系列特異的な分子の遺伝子発現ならびにタンパク発現、と mVenus-p27K⁻ プローブの局在の関係を調べた。

4. 研究成果

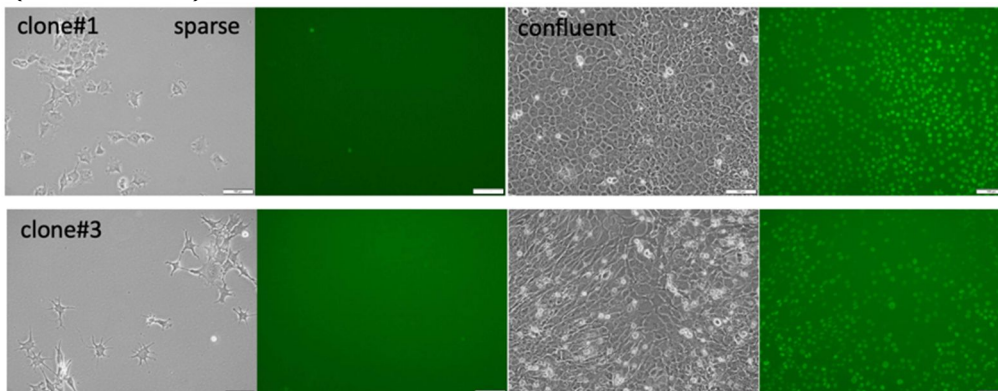
(1) 細胞密度依存的な分化特異的遺伝子の変化

間葉系幹細胞を用い、細胞密度が低く細胞間接触がごくわずかしかなない状態、細胞間接触が見られる状態、細胞密度が濃い状態で遺伝子発現を調べた。骨芽細胞特異的な分子として runx2, osterix、軟骨細胞特異的な分子として Sox9、脂肪細胞特異的な分子として PPARgamma、について間葉系 10T1/2 細胞で調べたところ、どれも細胞密度依存的な発現の上昇が認められた。



(2) Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) プローブ発現細胞の樹立

Fucci プローブのひとつ mVenus-p27K⁻ プローブ蛍光で G0 期ないし G1 期早期の細胞周期にある細胞を可視化できる。この mVenus-p27K⁻ 発現レトロウィルスを幹細胞 C1 に感染させたのち、抗生剤で選択し、いくつかのクローン由来のラインを樹立した。そのうちの2つのラインについて次にしめす。どちらのクローンも細胞密度が低い状態では、G1 期早期と思われる細胞 (mVenus 陽性) がほとんどみられず、密度が濃くなると陽性細胞が増える。

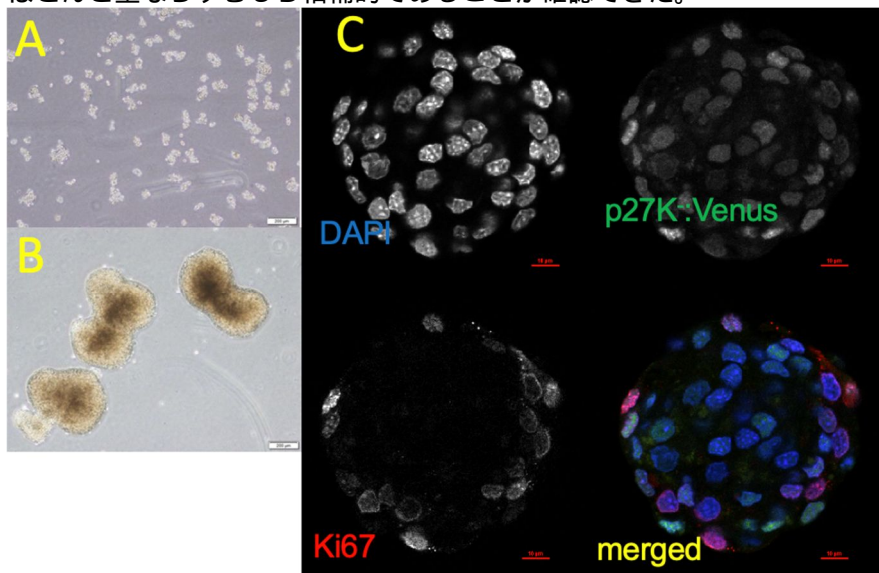


(3) mVenus-p27K⁻ プローブ蛍光と分化系列分子の発現の相関

間葉系幹細胞 C1 において mVenus-p27K⁻ プローブ蛍光と分化系列分子の発現を調べ、増殖と分化の関係を調べた。下記に示すように免疫染色で、Runx2, Osterix, mVenus-p27K⁻ を調べたところ、Runx2 と mVenus 陽性に共陽性の細胞が見られる一方、Osterix については、必ずしも mVenus 陽性に重ならず、むしろその周囲にみられた。細胞密度と、増殖、分化の関係を cell aggregate を含む monolayer で確認したところ、monolayer で低い発現が cell aggregate へ向かって移行的に Runx2 発現と mVenus が上昇し、しかも cell aggregate 状態では非常に高い発現であることを観察した。

(4) 細胞凝集塊形成時の増殖と分化の相関

C1 において細胞凝集塊形成での細胞分化動態を観察する方法として、whole mount immunohistochemistry を行った。下記に示すように小さい細胞凝集塊が、大きな細胞凝集塊になると、周囲に mVenus-p27K⁻ 陽性細胞が出現する。しかもそれは Ki67 陽性シグナルともほとんど重ならずむしろ相補的であることが確認できた。



細胞凝集塊での Runx2 発現を調べるために、増殖培地で凝集塊を形成すると分化に伴い、mVenus-p27K⁻ 陽性細胞が増加し、それに伴い Runx2 発現も増加する。多くの細胞で双方のシグナルが重なるが、重ならない細胞も凝集塊内部で観察された。

(5) 細胞接着と細胞形態に関わるシグナルの影響についての解析

細胞間情報伝達に必要な Notch-Delta シグナルと 3 次元的組織形成に必要な Hippo-Yap シグナル経路を調節することで C1 の細胞周期と分化形質、そして細胞凝集がどう変化するかを調べた。前者のシグナルについては -secretase inhibitor である、DAPT、ならびに LY-411575 を用い、また後者のシグナル経路については selective and ATP-competitive MST1/2 inhibitor である XMU-MP-1 を用いた。cell aggregate を含む monolayer において DAPT、ならびに LY-411575 で処理すると、細胞凝集そのものに大きな形態的变化は認められないが、G1 期早期の細胞 (mVenus 陽性) が減少していた。更にそれに伴い runx2 発現細胞が減少していた。またその効果は inhibitor の濃度依存性であるように見えた。一方、XMU-MP-1 処理では mVenus 陽性が増加していたが、必ずしも runx2 発現細胞は増加していなかった。

(6) 他の間葉系幹細胞における解析

分化能間葉系細胞株 C1、10T1/2 細胞に加えて間葉系細胞株として、F1G5 細胞、F12 細胞を用いた実験を行った。それらの細胞において C1 と同様に、細胞密度が低く細胞接触が少ない場合と、細胞密度が高い場合について分化形質の発現を解析した。それぞれについて、Runx2 についての発現解析を行ったところ、F12 細胞以外は細胞密度に伴い発現が上昇した。Sox9 についても同様の結果が得られた。線維芽細胞としての特徴が強い F12 細胞については、密度依存性の発現誘導は認められなかったことから、分化系列への特異的分子の発現誘導は細胞密度だけでは十分でない可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 二藤 彰 | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 腱・靭帯付着部 enthesis の維持機構 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 整形・災害外科 | 6. 最初と最後の頁 1063-67 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18888/se.0000001386 | 査読の有無 無 |
| 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 Ideno Hisashi, Nakashima Kazuhisa, Komatsu Koichiro, Araki Ryoko, Abe Masumi, Arai Yoshinori, Kimura Hiroshi, Shinkai Yoichi, Tachibana Makoto, Nifuji Akira | 4. 巻 137 |
| 2. 論文標題 G9a is involved in the regulation of cranial bone formation through activation of Runx2 function during development | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Bone | 6. 最初と最後の頁 115332 ~ 115332 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2020.115332 | 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 Shimada Akemi, Ideno Hisashi, Arai Yoshinori, Komatsu Koichiro, Wada Satoshi, Yamashita Teruhito, Amizuka Norio, Poschl Ernst, Brachvogel Bent, Nakamura Yoshiki, Nakashima Kazuhisa, Mizukami Hiroaki, Ezura Yoichi, Nifuji Akira | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Annexin A5 Involvement in Bone Overgrowth at the Enthesis | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research | 6. 最初と最後の頁 1532 ~ 1543 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbmr.3453 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Hayashi N, Sato T, Kokabu S, Usui M, Yumoto M, Ikami E, Sakamoto Y, Nifuji A, Hayata T, Noda M, Yoda T | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 Possible association of oestrogen and Cryba4 with masticatory muscle tendon aponeurosis hyperplasia | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oral Diseases | 6. 最初と最後の頁 274 ~ 281 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.12876 | 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20件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 小松浩一郎、出野 尚、新井嘉則、和田悟史、中島和久、山下照仁、江面陽一、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 Annexin A5は腱・靭帯附着部 (enthesis) 石灰化を負に制御する |
| 3. 学会等名 第142回薬理学会関東部会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小松浩一郎、出野 尚、新井嘉則、和田悟史、中島和久、山下照仁、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 Annexin A5欠損マウスでは腱・靭帯附着部(enthesis)の石灰化が促進される |
| 3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、新井嘉則、立花 誠、木村 宏、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 G9aはRunx2の機能調節を介してマウス頭蓋の骨形成を制御する |
| 3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、新井嘉則、木村 宏、眞貝洋一、立花 誠、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 G9aはRunx2の活性化を介してマウス頭蓋の骨形成を制御する |
| 3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小松浩一郎、出野 尚、中島和久、新井嘉則、江面陽一、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 アネキシンA5と荷重負荷による腱・靭帯付着部におけるANK及びEnpp1の制御 |
| 3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、新井嘉則、江面陽一、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 Annexin A5は力学的負荷によるANK発現制御を介して enthesisの石灰化に関与する |
| 3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中島和久、小松浩一郎、出野 尚、山下照仁、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 AdenovirusによるcDNA発現は破骨細胞前駆細胞の分化・融合を抑制する |
| 3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ideno H, Komatsu K, Nakashima K, Arai Y, Ezura Y, Nifuji A |
| 2. 発表標題 Anxa5 protects hyper-mineralization at the enthesis by differential regulation of pyrophosphate regulators |
| 3. 学会等名 annexins-2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、新井嘉則、江面陽一、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 Anxa5 regulation of extracellular phosphate/pyrophosphate level by differential expression of pyrophosphate regulators |
| 3. 学会等名 第13回ALPS研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、雨宮俊彦、今西康雄、新井嘉則、江面陽一、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 Anxa5 protects jaw bone overgrowth, excessive tooth attrition and widening of periodontal ligament space, induced by mechanical loading |
| 3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中島和久、小松浩一郎、出野 尚、山下照仁、宇田川信之、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 タンパク質の過剰発現は破骨細胞前駆細胞の分化・融合を抑制する |
| 3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、新井嘉則、立花 誠、木村 宏、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 G9aはRunx2の機能を調節してマウス頭蓋の骨形成を制御する |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、雨宮俊彦、新井嘉則、江面陽一、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 Annexin A5はenthesesの細胞外ピロリン酸と力学的負荷に対する反応の調節により石灰化を制御する |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hisashi Ideno, Yoshinori Arai, Koichiro Komatsu, Kazuhisa Nakashima, Satoshi Wada, Teruhito Yamashita, Ernst Poschl, Bent Brachvogel, Yoichi Ezura, Akira Nifuji |
| 2. 発表標題 Annexin A5 prevents force-mediated bone ridge overgrowth at the enthesi |
| 3. 学会等名 第40回米国骨代謝学会（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小松浩一郎、出野 尚、中島和久、山下照仁、宇田川信之、立花 誠、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素G9aは破骨細胞分化を負に制御する |
| 3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hisashi Ideno, Koichiro Komatsu, Kazuhisa Nakashima, Yoshinori Arai, Yoichi Ezura, Akira Nifuji |
| 2. 発表標題 Anxa5 suppresses excessive entheses calcification induced by mechanical loading, possibly through regulating extracellular pyrophosphate |
| 3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小松浩一郎、出野 尚、中島和久、山下照仁、宇田川信之、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素 G9a の破骨細胞分化制御への関与 |
| 3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中島和久、小松浩一郎、出野 尚、山下照仁、宇田川信之、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 タンパク質の過剰発現は破骨細胞前駆細胞の融合を抑制する |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、新井嘉則、立花 誠、木村 宏、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素G9aによる骨芽細胞分化におけるRunx2の転写活性化能の制御 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 出野 尚、新井嘉則、和田悟史、中島和久、小松浩一郎、山下照仁、江面陽一、二藤 彰 |
| 2. 発表標題 Annexin A5 による力学的負荷を介した腱・靭帯付着部(enthesis)石灰化の制御 |
| 3. 学会等名 第4回日本アネキシン研究会 |
| 4. 発表年 2018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 | 出野 尚 (Ideno Hisashi) (40435699) | 鶴見大学・歯学部・助教 (32710) | |
| 研究分担者 | 江面 陽一 (Ezura Yoichi) (50333456) | 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師 (12602) | |
| 研究分担者 | 中島 和久 (Nakashima Kazuhisa) (90252692) | 鶴見大学・歯学部・講師 (32710) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|