

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17034

研究課題名（和文）骨髄間葉系幹細胞におけるレプチン受容体を介したシグナル伝達機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of signaling mechanisms through leptin receptors in bone marrow mesenchymal stem cells

研究代表者

黄地 健仁（Ouchi, Takehito）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：30803564

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：野生型マウスとdb/dbマウスを用いてフローサイトメーターで血球と血管内皮細胞を解析後、LepR(+)細胞を分離した。分離後、生体外で培養し、間葉系幹細胞の性質を解析した。接着培養法で維持培養し、自己複製能とその他機能解析を評価したところ、コロニー形成能と倍加時間、遊走能において差は生じなかった。骨・軟骨への分化能は野生型マウスとdb/dbマウスで著しい差異は認められなかったが、脂肪分化に関してはdb/dbマウスが高い分化能を示した。野生型マウスとdb/dbマウスで造血機能に差異は認められなかったため、JAK2/STAT3の障害と脂肪分化能の特徴は造血作用に影響を及ぼさない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

骨髄移植は口腔粘膜疾患を伴うなど、口腔領域と密接に関連する。骨髄移植は造血幹細胞移植と定義されることが多いが、実際には造血幹細胞に加えてもう一つの幹細胞である間葉系幹細胞を含む。そのため、骨髄移植の成果に間葉系幹細胞が関わっている可能性が十分考えられる。近年、間葉系幹細胞の有効なマーカーとして報告されたLepRに着目し、本研究ではLepRシグナル経路と骨髄幹細胞の関係性に着目した。生体内・外でLepRシグナル経路が骨髄環境にどのように影響をもたらしているかを明らかにすることで、そのシグナル機構の調節により骨髄疾患に対する新たな治療法の開発や予防法の開発へとつながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Blood cells and vascular endothelial cells were analyzed with a flow cytometer using wild-type mice and db/db mice, and then LepR(+) cells were isolated. After LepR(+) cells isolation, the cells were cultured in vitro and the properties of mesenchymal stem cells were analyzed. When the self-renewal ability and other functional analyzes were evaluated by maintenance culture by the adhesive culture method, there was no difference in colony forming ability, doubling time, and migration ability. There was no significant difference in the ability to differentiate into bone and cartilage between wild-type mice and db/db mice, but db/db mice showed high differentiation potential in terms of fat differentiation. No difference in hematopoietic function was observed between wild-type and db/db mice, suggesting that JAK2/STAT3 impairment and adipose differentiation characteristics may not affect hematopoiesis.

研究分野：幹細胞医学

キーワード：間葉系幹細胞 造血幹細胞 LepR JAK2/STAT3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

<学術的背景>

申請者は歯科臨床において骨髄移植に伴った慢性 GvHD の所見の 1 つである難治性口腔粘膜疾患に罹患した多くの患者治療を経験し、その根本的な解決策を探るために骨髄幹細胞メカニズムの解明を目指した研究に取り組むに至った。近年、脂肪細胞によって作り出される Leptin の受容体 (LepR) が MSCs の最も有力な選択マーカーとして報告された (Bo O Zhou et al., Cell Stem Cell, 2014)。しかしながら LepR のどのようなメカニズムが骨髄環境の恒常性などに影響を与えているかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

<目的>

骨髄移植は高頻度に口腔粘膜疾患を伴うなど、口腔領域と密接に関連している。骨髄移植は造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cells: HSCs) 移植と定義されることが多いが、実際には HSCs に加えて、もう一つの骨髄幹細胞である間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) を含む。そのため、骨髄移植の成果に MSCs が関わっている可能性が十分考えられる。HSCs は細胞分離技術が既に確立され細胞分子レベルでの解明が進んでいるが、MSCs 研究は未だ発展途上である。近年 MSCs の有効なマーカーとして Leptin 受容体 (以下 LepR) が報告された。本研究では未だに明らかにされていない MSCs における LepR シグナル経路と骨髄幹細胞の関係性に着目した。申請者がこれまでに習得した細胞分離技術と細胞可視化技術を駆使し、LepR のシグナル経路に異常を持つマウス骨髄から LepR 細胞を採取し、生体内・外で LepR シグナル経路が骨髄環境にどのように影響をもたらしているかを明らかにする。これにより、良好な骨髄内環境を構築する決定因子を解明できる可能性があると考えた。

3. 研究の方法

申請者がこれまでに行ってきた細胞分離・可視化技術を用い、特定の細胞集団を分離し、その細胞の動態を生体内・外で観察した。db/db マウスは LepR の下流シグナル (JAK2/STAT3 経路) に障害をもつものの、細胞表面には LepR 抗原を発現しているため、各種蛍光色素で標識した LepR 抗体を用いることでフローサイトメーターにより細胞分離が可能である。分離後はレンチウイルスを用いて発光・蛍光タンパク質 (ffLuc) を細胞に導入することで細胞を可視化し、in vivo imaging system (IVIS) により発光を捉え、また、フローサイトメーターにより蛍光タンパクと同等波長 (FITC:488nm) で解析した (図1 ffLuc 導入後の可視化細胞の同定)。本研究では野生型マウス (WT マウス) と db/db マウスを用い LepR 細胞を分離した。分離後、MSCs の特徴であるコロニー形成能や分化能、そして HSCs との共培養を生体外で行った。これらの培養技術を駆使し、LepR の下流シグナルである JAK2/STAT3 経路と造血細胞維持機構との関連性を探索した。

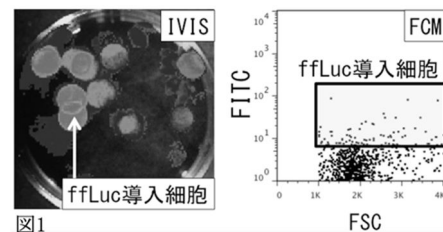


図1

本研究において MSCs と HSCs に関する分離基準は以下の通りとした。

- (1)MSCs に関して:WT マウス由来 LepR 細胞、db/db マウス由来 LepR 細胞を分離
- (2)HSCs に関して:WT マウス由来 HSCs、db/db マウス由来 HSCs を分離

(1)(2)はフローサイトメーターを用いて解析・分離し、細胞の特性評価を検討した。具体的には MSCs はこれまでの既報の選別法に従い、CD45(-)Ter119(-)CD31(-)分画中の LepR(+)細胞とした。一方 HSCs は従来の方法を用いて KSL 細胞(c-Kit(+)/Sca-1(+)/Lineage(-))細胞を用いた。

当初の計画としては以下の通りである。

「(1)(2)間においてフローサイトメーターの分画で同様の所見が観察された場合、db/db マウスは WT マウスと同様の骨髄幹細胞維持状態である可能性が示唆される。」

「(1)(2)間においてフローサイトメーターの分画に差があった場合、骨髄幹細胞維持状態に差があると予想される。」

上記の戦略的解析の結果、後述の通り(1)(2)ともに同様の結果が得られたが、db/db マウスと WT マウス個体の体重の差が明らかなため、何かしらの Unknown factor が存在する可能性を予想し、それを探索する為、詳細な解析を進めることにした。

(1)MSCs に関して:WT マウス、db/db マウス各々から LepR 細胞を分離し、生体外で培養し、MSCs としての性質に差を有しているかを解析した。MSCs の特徴である血清添加培地による接着培養で維持し、自己複製能および間葉系統 (骨/軟骨/脂肪) への分化能を評価した。分化能評価としては、骨/軟骨/脂肪を確定するためにそれぞれ Alizarin-Red S/Toluidine Blue/Oil Red O 染色を行い、視野あたりの面積評価を実施した。また、骨 (Runx2/Osx) 、軟骨 (Type II Collagen/Aggrecan) 、脂肪 (PPAR /Adiponectin) などのマーカーに対し、免疫染色・RT-PCR を実施した。

(2)HSCs に関して:WT マウス、db/db マウス間で KSL 分画を解析した。

次に、生体外での LepR 細胞と HSCs の共培養を実施した。HSCs は培養中の識別を目的に、fLuc により可視化し、生細胞の動態観察を IVIS で行った。条件は以下の通りである。

db/db-LepR 細胞と WT-KSL 細胞の組み合わせで共培養し、HSCs (KSL 細胞) の生存の可否を解析した。

当初の計画としては以下の通りである。

db/db-LepR 細胞と WT-KSL 細胞を組み合わせた共培養により WT-KSL 細胞が生存した場合、骨髄幹細胞の生体外維持において LepR 下流の JAK2/STAT3 経路依存性はなく、他の MSCs マーカー下流シグナル経路が活性化されている可能性が予想された。

一方、共培養により WT-KSL 細胞が生存しない場合、生体外における HSCs 維持には LepR 下流の JAK2/STAT3 経路が関与していると予想された。

4 . 研究成果

間葉系幹細胞の培養法の特徴である血清添加培地による接着培養法で維持培養し、自己複製能とその他機能解析を評価したところ、WT マウス、db/db マウス間でコロニー形成能と倍加時間、

遊走能において大きな差は生じなかった。また、凍結切片を用いた組織評価においても骨髓内の形態は同等であった

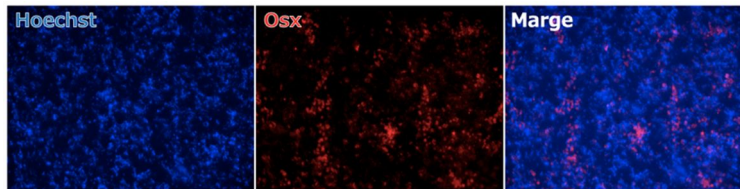


図2

(図2 db/db 骨髓組織内における Osx 陽性細胞)

骨および軟骨への分化能は WT マウスと db/db マウスで著しい差異は認められなかったが、脂肪分化に関しては db/db マウスが高い分化能を示した。以上の結果に加え、造血機能に関しては WT マウスと db/db マウスで差異は認められなかったため、db/db マウスの LepR シグナル経路下流における JAK2/STAT3 経路の障害と高い脂肪分化能の特徴は造血作用に影響を及ぼさない可能性が示唆された。

生体外で db/db-LepR 細胞と WT-KSL 細胞の組み合わせで共培養を実施したところ、WT-KSL 細胞が生存したため、骨髓幹細胞の生体外維持において LepR 下の JAK2/STAT3 経路依存性はなく、他の MSCs マーカー下流シグナル経路が活性化されている可能性が予想された。そこで、同じく下流に JAK2/STAT3 経路をもち、申請者が以前から用いていた MSCs マーカー PDGFR の下流における JAK2/STAT3 経路の活性化を解析したところ、WT-PDGFR 細胞、db/db-PDGFR 細胞集団間の比較検討において、後者の方で JAK2/STAT3 のタンパク発現が高かったため、PDGFR の下流における JAK2/STAT3 経路の活性により、LepR 細胞下流の JAK2/STAT3 経路障害の補償がおこなわれている可能性が示唆された。

過去に Morrison らは PDGFR 細胞が LepR 細胞と骨髓内において同局在すると提言した (Ding.L et al., Nature, 2012)。LepR 細胞と PDGFR 細胞は機能的に同じようなはたらきをしている可能性があるが、下流シグナル経路から捉えた両者の関係性は不明であり、また HSCs との関係性も同様であったが、本研究で WT マウスと db/db マウスを用い、LepR 下流のシグナル経路 (JAK2/STAT3 経路) を様々な条件下で解析し、その一端を明らかにすることができたと考えている。

今後、MSCs 下流の JAK2/STAT3 のさらに詳細な解析を実施するにあたり、JAK2 阻害剤により JAK2/STAT3 を遮断した条件、PDGFR 阻害剤の使用など、様々なシグナル制御の観点からアプローチが必要である。また Robert Kralovics をはじめとした様々なグループが、JAK2 の変異が骨髓疾患に関与していると報告しており、(Robert Kralovics et al., N Engl J Med, 2005)、本研究の結果からも JAK2 の調節機構が良好な骨髓形成をもたらす、また調節機構の破綻が病的な骨髓形成につながっている可能性が示唆された。

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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ouchi T, Morikawa S, Asoda S	4. 巻 4
2. 論文標題 Targeting the Tumor Stroma for Oral Cancer Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Research in Dentistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31031/MRD.2019.04.000586	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 Ouchi T, Nakagawa T	4. 巻 14
2. 論文標題 Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration therapies for periodontitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 72-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.j.reth.2019.12.011	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 Takehito Ouchi, Taneaki Nakagawa	4. 巻 2
2. 論文標題 iPS cell technology for periodontal tissue regeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 30-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21820/23987073.2019.2.30	査読の有無 無
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 Nobuyuki Horie, Takehito Ouchi, Rumiko Nishiyama, Sho Usuda, Satoru Morikawa, Seiji Asoda, Taneaki Nakagawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Experimental Study On Vertical Variations Of Unilateral Extension Base Flexible Removable Dentures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Bulletin of Tokyo Dental College	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔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 黄地健仁, 岡野栄之, 森川暁, 中川種昭
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来LNGFR/THY-1強陽性神経堤様細胞は間葉系幹細胞の性質をもつ
3. 学会等名 第61回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅野崇浩, 黄地健仁, 工藤葉子, 岡村衣里子, 臼田頌, 海住直樹, 新部邦透, 岩崎良太郎, 有馬誠亮, 西山留美子, 鈴木啓介, 鈴木潔, 中川種昭, 堀江伸行
2. 発表標題 ゾレドロン酸およびデノスマブ関連顎骨壊死と有床義歯との関連性に関する臨床的検討
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第127回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黄地健仁, 柳沢託磨, 根岸智史, 岡野栄之, 中川種昭
2. 発表標題 神経堤由来間質細胞から骨分化に関わるマーカーの探索
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------